

# UFAL

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

**ESTUDOS BIOFÍSICOS DO PROCESSO DE INTERAÇÃO DA CASEÍNA E LACTALBUMINA,  
PROTEÍNAS ALERGÊNICAS DO LEITE, COM ANTIBIÓTICOS DE USO VETERINÁRIO**

**MARIA DAYANNE DE ARAÚJO DANTAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

MARIA DAYANNE DE ARAÚJO DANTAS

**ESTUDOS BIOFÍSICOS DO PROCESSO DE INTERAÇÃO DA CASEÍNA E  
LACTALBUMINA, PROTEÍNAS ALERGÊNICAS DO LEITE, COM  
ANTIBIÓTICOS DE USO VETERINÁRIO**

Tese de doutorado 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 doutora em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

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

Maceió – AL  
2019

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecário Responsável: Marcelino de Carvalho

D192e Dantas, Maria Dayanne de Araújo.  
Estudos biofísicos do processo de interação da caseína e lactalbumina, proteínas alergênicas do leite, com antibióticos de uso veterinário / Maria Dayanne de Araújo Dantas. – 2019.  
105 f. : il.

Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.  
Coorientadora: Isis Martins Figueiredo.  
Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Inclui bibliografias.  
Inclui apêndices.

1. Proteínas do leite. 2. Caseína. 3. Lactalbumina. 4. Antibacterianos - Drogas veterinárias. I. Título.

CDU: 615.32/.33:547.962.3



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

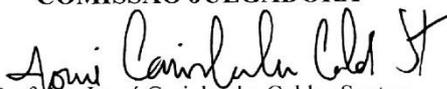


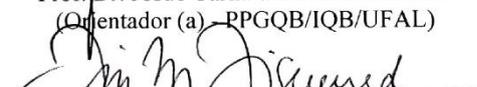
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

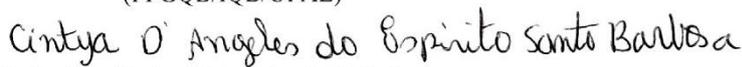
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **MARIA DAYANNE DE ARAÚJO DANTAS** intitulada: “**Estudos biofísicos do processo de interação da caseína e lactalbumina, proteínas alergênicas do leite, com antibióticos de uso veterinário**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 25 de setembro de 2019, às 14h00, na sala de Aulas da Pós-Graduação do IQB

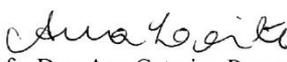
**COMISSÃO JULGADORA**

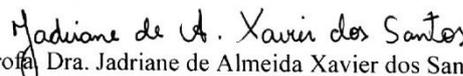
  
Prof. Dr. Josué Carinhonha Caldas Santos  
(Orientador (a) - PPGQB/IQB/UFAL)

  
Profa. Dra. Isis Martins Figueiredo  
(Coorientadora - IFAL)

  
Profa. Dra. Janaina Herbele Bortoluzzi  
(PPGQB/IQB/UFAL)

  
Profa. Dra. Cintya D'Angeles do E. S. Barbosa  
(PPGQB/IQB/UFAL)

  
Profa. Dra. Ana Catarina Rezende Leite  
(IQB/UFAL)

  
Profa. Dra. Jadriane de Almeida Xavier dos Santos  
(IQB/UFAL)

*Dedico este trabalho aos três amores da minha vida, minha mãe Maria de Araújo Dantas, meu esposo Diego Rodrigo Leite da Silva, e minha filha Bianca Dantas Leite que chegará em breve. Toda minha gratidão pela imensurável compreensão, apoio, força, carinho e amor durante esta jornada.*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a Deus pela conclusão de mais uma etapa em minha vida, todas as bênçãos concedidas e conquistas alcançadas.*

*Aos meus orientadores Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Isis Martins Figueiredo, meus agradecimentos pela oportunidade, orientação, confiança, ensinamentos, ajuda e paciência.*

*Aos meus pais José Davi Dantas (in memoriam) e Maria de Araújo Dantas pelo amor, ensinamentos e dedicação.*

*Ao meu amado esposo Diego Rodrigo Leite da Silva por ser meu companheiro em todos os momentos dessa jornada e por acreditar em mim.*

*A todos os amigos do Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica LINQA: Ari, Camila, Emerson, Fátima, Francisco, Jaelson, Karolayne, Maria Célia, Wood, Thamilla, pelo apoio, convivência e momentos de descontração e, especialmente, as meninas Marina, Amanda, Aryanna, Mayara e Janaína, pelo apoio, conselhos e companheirismo durante esta caminhada.*

*A minha amiga e doutoranda Marina de Magalhães Silva a qual me ensinou que desafios podem ser superados, meus sinceros agradecimentos pela amizade, ajuda, conversas e conselhos.*

*A minha amiga e doutoranda Mônica Bezerra dos Santos que me acompanha desde a graduação pela amizade, carinho e conselhos.*

*As minhas colegas de trabalho pelo apoio e torcida, Gisele, Karine, Prazeres e Selma.*

*Ao doutor Humberto de Araújo pela ajuda na realização com os ensaios de eletroforese.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro.*

*A todos que de alguma forma contribuíram com a minha formação acadêmica e para a concretização deste trabalho.*

## RESUMO

A caseína (CAS) e lactalbumina (LAC) são proteínas constituintes do leite de vaca, sendo amplamente utilizadas na alimentação, principalmente na suplementação nutricional e na composição de diferentes alimentos. As tetraciclinas (TCs) e as sulfonamidas (SFs) constituem classes de antibióticos de amplo espectro, sendo empregados na medicina veterinária na criação de animais produtores de alimento como vacas leiteiras, por exemplo. No entanto, o seu uso abundante e inadequado pode resultar na presença de resíduos destes medicamentos em alimentos como o leite, causando efeitos tóxicos, além da possibilidade de reações alérgicas. Este trabalho teve como objetivo estudar a interação da CAS e LAC com os antibióticos da classe das tetraciclinas: tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC) e da classe das sulfonamidas: sulfatiazol (STZ) e sulfametazina (SMZ) empregando diferentes estudos biofísicos. Assim, a partir dos resultados obtidos pôde-se observar que as TCs e as SFs formaram complexos supramoleculares com CAS e LAC caracterizados pelo mecanismo de *quenching* estático. As constantes de ligação ( $K_b$ ) para o sistema CAS-TCs para a TC variaram de  $0,25 (\pm 0,04)$  a  $1,40 (\pm 0,06) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Para o sistema CAS-SFs verificou-se que os valores de  $K_b$  variaram de  $0,16 (\pm 0,05)$  a  $0,49 (\pm 0,04) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  para STZ, e para o sistema LAC-SFs foi observado que os valores de  $K_b$  variaram de  $2,30 (\pm 0,04)$  a  $4,60 (\pm 0,04) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  para STZ. Em todos os casos o número de sítios de ligação foi próximo à unidade. Os dados termodinâmicos calculados indicaram que em todos os sistemas as interações ocorrem espontaneamente ( $\Delta G < 0$ ), e as forças de ligação predominantes são interações eletrostáticas para o sistema CAS-TC, enquanto para os sistemas CAS-SFs e LAC-SFs as forças preferenciais de interação são ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. A partir dos estudos por fluorescência sincronizada e 3D foi possível observar mudanças conformacionais na estrutura da proteína. Considerando os estudos por FRET foi calculada as distâncias intermoleculares para o sistema proteína-ligante, sendo que no sistema CAS-TCs as distâncias intermoleculares variaram de 3,60 a 4,02 nm, enquanto para CAS-SFs de 3,96 a 4,30 nm, e por fim, para LAC-SFs foram de 2,77 a 3,44 nm. Com base nos estudos de competição, para o sistema CAS-TC observou-se que o íon citrato competiu pelo sítio de ligação da caseína, enquanto que para CAS-OTC, houve competição pelo sítio de ligação da proteína com Ca(II), Fe(III) e lactose. Para CAS-CTC, todas as espécies avaliadas influenciaram no processo de interação. Para o sistema CAS-STZ todas as espécies adicionadas interferiram no processo de interação, em contrapartida, para CAS-SMZ, Ca(II), Mg(II) e citrato aumentaram os valores da constante de ligação  $K_b$ . Para LAC-STZ, todas as espécies adicionadas favoreceram a interação, por fim, para LAC-SMZ, Ca(II) e Fe(III) interferiram no processo de interação. Nos estudos por UV-vis verificou-se a formação dos complexos entre CAS, LAC e os diferentes antibióticos, além do mecanismo preferencial de interação. A partir dos estudos por eletroforese para o sistema CAS-TCs foi observado redução da mobilidade eletroforética da caseína em função da presença dos ligantes. Por fim, a partir dos estudos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) observou-se que houve deslocamento para o hidrogênio (H-4a) e do grupo  $((\text{CH}_3)_2\text{N}-)$  da molécula de TC e provavelmente estão envolvidos na interação entre CAS-TC. Portanto, a presença de TCs e SFs em alimentos podem representar um risco para a segurança alimentar, visto que mudanças conformacionais induzidas na estrutura nativa da CAS e da LAC podem potencializar reações alérgicas.

**Palavras-chave:** Interação proteína-ligante. Leite. Caseína. Lactalbumina. Antibióticos de uso veterinário.

## ABSTRACT

Casein (CAS) and lactalbumin (LAC) are proteins constituent of cow's milk, being widely used in food, mainly in nutritional supplementation and in the composition of different foods. Tetracyclines (TCs) and sulfonamides (SFs) are classes of broad-spectrum antibiotics used in veterinary medicine to raise food-producing animals such as dairy cows. However, its abundant and inappropriate use can result in the presence of residues of these drugs in foods such as milk, causing toxic effects, in addition to the possibility of allergic reactions. The objective of this work was to study the interaction of CAS and LAC with TCs: tetracycline (TC), oxytetracycline (OTC) and chlortetracycline (CTC) and SFs: sulfathiazole (STZ) and sulfametazine (SMZ) class using molecular fluorescence, molecular absorption and electrophoresis and  $^1\text{H}$  NMR. Thus, from the obtained results it was observed that TCs and SFs form supramolecular complexes with CAS and LAC characterized by the static *quenching* mechanism. The binding constants ( $K_b$ ) ranged from  $0.25 (\pm 0.04)$  to  $1.40 (\pm 0.06) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , for TC. For the CAS-SFs system,  $K_b$  values ranged from  $0.16 (\pm 0.05)$  to  $0.49 (\pm 0.04) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  for STZ, and for the LAC-SFs system was observed that  $K_b$  values ranged from  $2.30 (\pm 0.04)$  to  $4.60 (\pm 0.04) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  for STZ. In all cases the number of binding sites was close to unity. The calculated thermodynamic data indicated that in all systems interactions occur spontaneously ( $\Delta G < 0$ ), the predominant binding forces are electrostatic interactions for the CAS-TC system, whereas for the CAS-SFs and LAC-SFs the preferred interacting forces are hydrogen bonds, Van der Waals forces. From the studies by synchronized fluorescence and 3D it was possible to observe reduction of peaks 2 and 3 in all cases, which indicates conformational changes in the structure of the protein. From the FRET studies it was possible to calculate the intermolecular distances between the two proteins and the two classes of antibiotics, for the CAS-TCs system the intermolecular distances between the CAS and the TCs ranged from 3.60 to 4.02 nm. For CAS-SFs the intermolecular distances between CAS and SFs ranged from 3.96 to 4.30 nm, whereas for the LAC-SFs system the intermolecular distances ranged from 2.77 to 3.44 nm. With the competition studies for the CAS-TC system it was observed that there was competition for the ovalbumin binding site only for the citrate. For the CAS-OTC system, there was competition for the protein binding site between Ca(II), Fe (III) and lactose, for CAS-CTC, all added species committed with CTC by the protein. For the CAS-STZ system, all added species interfered in the interaction process, in contrast, for CAS-SMZ, Ca(II), Mg(II) and citrate increased the  $K_b$  binding constant values. For LAC-STZ, all added species favored the interaction, finally, for LAC-SMZ, Ca(II) and Fe(III) interfered in the interaction process. Through the UV-vis studies it was verified that complexes were formed between CAS, LAC and the different antibiotics evaluated in this work. From the electrophoresis studies for the CAS-TCs system, a reduction in the electrophoretic mobility of CAS was observed as a function of the presence of the ligands. Finally, from the studies by Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen ( $^1\text{H}$  NMR) it was observed that the hydrogen (H-4a) and the group  $((\text{CH}_3)_2\text{N}-)$  of the TC molecule are those probably more involved in the CAS-TC interaction. Therefore, the presence of TCs and SFs in food may represent a risk to food safety, since conformational changes in the native structure of CAS and LAC in the presence of these were observed, which can act as a foreign body in the human organism and potentiate allergic reactions.

**Keywords:** Protein-binding interaction. Milk. Casein. Milk albumin. Antibiotics for veterinary use.

## LISTA DE FIGURAS

### Seção 1- Introdução geral

Figura 1- Mecanismo de alergia medida por IgE .....	19
Figura 2 - a) estrutura tridimensional da LAC e b) superfície molecular da $\alpha$ - lactalbumina com indicação dos epítomos de ligação a IgE em verde, vermelho e azul.....	21
Figura 3 - Esquema de representação da submicela e micela de caseína .....	23
Figura 4 - Estrutura tridimensional da $\alpha$ -lactalbumina bovina .....	25
Figura 5 - Esquema da estrutura química das tetraciclinas (totalmente associadas) avaliadas neste estudo .....	27
Figura 6 - Distribuição das espécies de tetraciclina em função do pH a) tetraciclina (TC) (R1 = H, R2 = H), b) oxitetraciclina (OTC) (R1 = OH, R2 = H) e c) clorotetraciclina (CTC) (R1 = H, R2 = Cl) .....	28
Figura 7 - Estrutura química das sulfonamida selecionadas para avaliação com as proteínas caseína e $\alpha$ -lactalbumina: a) sulfatiazol (STZ) e b) sulfametazina (SMZ).....	28
Figura 8 - Equilíbrio de dissociação das sulfas e distribuição das espécies em função do pH para b) STZ e c) SMZ.....	29

### Seção 2 – Etapa 1 (Avaliação da interação da caseína, proteína alergênica do leite, com tetraciclinas empregando técnicas espectroscópicas e eletroforese)

Figura 1 - a) Perfil espectral da titulação espectrofluorimétrica da CAS com TC, b) Linearização da equação de $K_{SV}$ , c) Linearização para cálculo da constante $K_b$ e número de sítios de ligação(n).....	41
Figura 2 - Efeito do NaCl na interação do complexo CAS-tetraciclinas pH = 6,8 (tampão fosfato 10 mM) a 30°C .....	47
Figura 3 - Estudo de UV-vis do processo de interação das tetraciclinas com a CAS .....	48
Figura 4 - Efeito da adição da TC (0 - 84 $\mu$ M) no espectro de fluorescência sincronizada da CAS (2,5 $\mu$ M) a 30 °C. (a) $\Delta\lambda = 15$ nm e (b) $\Delta\lambda = 60$ nm.....	49
Figura 5 - Espectros de fluorescência tridimensional (3D) para (a) CAS (2,5 $\mu$ M), (b) CAS + TC (25 $\mu$ M) em tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C .....	50
Figura 6 - Sobreposição espectral da emissão de fluorescência da CAS com o espectro de absorção de TC, OTC e CTC. Condições: CAS (2,5 $\mu$ M), TC, OTC e CTC (2,5 $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH = 6,8 e 30°C, $\lambda_{exc} = 280$ nm.....	53
Figura 7 - Efeito da presença de espécies competidoras no processo de interação entre CAS e tetraciclinas. Condições: CAS (2,5 $\mu$ M), competidores ( $\mu$ M): Ca(II) = 62,5, Mg(II) = 1,3, lactose = 295, citrato = 20 e Fe(III) = 1,0; tetraciclinas (0 - 75 $\mu$ M), tampão fosfato 10mM a pH 6,8, e 30°C. ....	54

Figura 8- Espectro de emissão de ANS-CAS sob diferentes concentrações de: a) TC, b) OTC e c) CTC. Condições: ANS= (60  $\mu$ M), CAS = (5  $\mu$ M), TC, OTC e CTC = (0–60  $\mu$ M), tampão fosfato a 10 mM a pH 6,8 e 30°C,  $\lambda_{exc}$  = 280 nm ..... 56

Figura 9 - Comparação das constantes de ligação ( $K_b$ ) do processo de interação das tetraciclinas com a CAS na ausência e na presença do processo de pasteurização ..... 57

Figura 10 - Efeito da adição das tetraciclinas (TC, OTC e CTC) a caseína na mobilidade eletroforética por Native-PAGE. 1) marcador molecular (Jena Bioscience), 2) CAS, 3) CAS + TC (6,8 mM), 4) CAS + OTC (6,8 mM), 5) CAS + CTC (6,8 mM), 6) CAS + TC (13,6 mM) 7) CAS+ OTC (13,6 mM) e 8) CAS + CTC (13,6 mM)..... 58

Figura 11 - (a) Expansão do espectro de RMN 1H (400 MHz) da tetraciclina na ausência e na presença de diferentes concentrações de CAS. Expansão de diferentes regiões (b, c, d, e) dos espectros de RMN 1H (400 MHz) para TC na presença e ausência da caseína em pH 6,8. .... 61

### **Seção 3 – Etapa 2 (Avaliação da interação da caseína e lactalbumina, proteínas alergênicas do leite, com sulfonamidas empregando técnicas espectroscópicas.**

Figura 1 – a, d) Perfil espectral da titulação espectrofluorimétrica da CAS (2,5  $\mu$ M) e da LAC (5,0  $\mu$ M) com sulfatiazol (STZ), b,c) Linearização da equação de Stern-Volmer, c,f) Linearização para cálculo da constante de ligação ( $K_b$ ) e número de sítios de ligação ( $n$ )... 82

Figura 2 - Efeito da adição de NaCl (0-100 mM) na interação dos complexos entre a) CAS e STZ, b) CAS e SMZ, c) LAC e STZ e d) LAC e SMZ. Condições: CAS (2,5  $\mu$ M), LAC (5,0  $\mu$ M), Sulfas 0-200  $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C ..... 86

Figura 3 - Estudo por UV-vis do processo de interação de STZ e SMZ com CAS e LAC. Condições: CAS (5,0  $\mu$ M), LAC (5,0  $\mu$ M), sulfas (12,5  $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C ..... 88

Figura 4 – Titulação empregando fluorescência sincronizada para o resíduo de tirosina referentes a) CAS e C) LAC e o resíduo de triptofano de b) CAS e d) LAC com adição de STZ (0-200  $\mu$ M). ..... 89

Figura 5 - Espectros de fluorescência tridimensional (3D) para a) CAS, b) CAS + STZ, c) LAC e d) LAC + STZ. Condições: CAS (2,5  $\mu$ M), LAC (5,0  $\mu$ M), STZ (25 e 50  $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 a 30°C ..... 91

Figura 6 - Sobreposição espectral da emissão de fluorescência da CAS com o espectro de absorção de a) STZ, b) SMZ, e sobreposição espectral da emissão de fluorescência da LAC com o espectro de absorção de c) STZ, d) SMZ. .... 94

Figura 7 - Efeito da presença de espécies competidoras no processo de interação entre os sistemas CAS-sulfas e LAC-sulfas..... 95

Figura 8 - Espectro de emissão dos sistemas proteína-ANS sob diferentes concentrações de: CAS-ANS frente a) STZ e b) SMZ, e LAC-ANS para c) STZ e d) SMZ..... 97

Figura 9 - Comparação das constantes de ligação ( $K_b$ ) do processo de interação de STZ e SMZ com a) CAS e b) LAC na ausência e na presença do processo térmico ..... 98

## LISTA DE TABELAS

### Seção 1- Introdução geral

Tabela 1- Características das principais proteínas alergênicas do leite..... 20

Tabela 2 - Aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas da CAS e LAC..... 24

### Seção 2 – Etapa 1 (Avaliação da interação da caseína, proteína alergênica do leite, com tetraciclinas empregando técnicas espectroscópicas e eletroforese)

Tabela 1- Parâmetros de ligação e termodinâmicos da interação da CAS com tetraciclinas em diferentes condições de temperatura ..... 43

Tabela 2 – Comparação de trabalhos na literatura com diferentes proteínas do leite ..... 45

Tabela 3 - Valores de absorvância para TC, OTC e CTC e complexos CAS-tetraciclinas..... 49

Tabela 4 - Constante de Stern-Volmer no estudo de fluorescência sincronizada ..... 50

Tabela 5 - Parâmetros relacionados a fluorescência 3D para interação entre CAS e Tetraciclinas avaliadas ..... 51

Tabela 6 - Parâmetros de FRET da interação entre tetraciclinas e CAS ..... 52

Tabela 7 - Deslocamento químico da RMN <sup>1</sup>H de TC na ausência e presença de diferentes concentrações de CAS ..... 59

Tabela 8- Avaliação da influência do processo de interação entre CAS e tetraciclinas na atividade antibacteriana *in vitro*. ..... 62

### Seção 3 – Etapa 2(Avaliação da interação da caseína e lactalbumina, proteínas alergênicas do leite, com sulfonamidas empregando técnicas espectroscópicas)

Tabela 1 - Constante de Stern-Volmer, de ligação e parâmetros termodinâmicos da interação da CAS e LAC com sulfonamida em diferentes condições de temperatura..... 83

Tabela 2- Comparação de trabalhos na literatura com diferentes ligante e  $\alpha$ -lactalbumina bovina ..... 84

Tabela 3. Valores de absorvância para as sulfonamidas avaliadas, CAS, LAC e complexos CAS-sulfonamidas e LAC-sulfonamidas ..... 88

Tabela 4 - Valores de  $K_{SV}$  da titulação por fluorescência sincronizada entre CAS, LAC e as sulfonamidas avaliadas ..... 90

Tabela 5 -Parâmetros relacionados a fluorescência 3D para interação entre CAS, LAC e sulfonamidas avaliadas ..... 92

Tabela 6 - Parâmetros de FRET da interação entre sulfonamidas com CAS e LAC ..... 94

Tabela 7 - Avaliação da atividade antibacteriana no processo de interação entre CAS e sulfas ..... 99

Tabela 8 - Avaliação da atividade antibacteriana no processo de interação entre LAC e sulfas ..... 99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A – Absorvância
- AA – Aminoácidos
- ANS – Ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato
- ANVISA - Agência nacional de vigilância sanitária
- CAS – Caseína
- CTC – Clorotetraciclina
- D<sub>2</sub>O – Água deuterada
- F - Fluorescência na presença do ligante
- F<sub>0</sub> - Fluorescência na ausência do ligante
- IgE – Imunoglobulina E
- K<sub>b</sub> – Constante de ligação
- K<sub>SV</sub> – Constante de Stern-Volmer
- KDa – Quilo Dalton
- LAC – alfa-lactalbumina
- LMR - Limite máximo de resíduos
- LogP – Coeficiente de Partição
- MAPA - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento
- MIC – Concentração Inibitória Mínima
- Native*-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida nativa
- n* – Número de sítios de ligação do complexo
- nm – Nanômetros
- OTC – Oxitetraciclina
- PAMVet - Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos
- pH – Potencial Hidrogeniônico
- pI – Ponto isoeletrônico
- pK<sub>a</sub> – Constante de dissociação
- PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
- RMN - Ressonância magnética nuclear
- SFs- Sulfonamidas
- SMZ-Sulfametazina
- STZ-Sulfatiazol
- TC – Tetraciclina

TCs – Tetraciclina

Tir – Tirosina

TMSP – Trimetilsililpropionato de sódio

Trp – Triptofano

UHT - Ultra alta temperatura

UV– Ultravioleta

UV-vis – Ultravioleta-visível

$\mu\text{M}$  – Micromolar

$\mu\text{L}$  – Microlitros

$\Delta G$  – Energia livre de Gibbs

$\Delta H$  – Variação de entalpia

$\Delta S$  – Variação de entropia

3D – Tridimensional

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	16
<b>1.1</b>	<b>Química supramolecular e interação proteína-ligante</b> .....	17
<b>1.2</b>	<b>Alergia e características dos alérgenos alimentares</b> .....	18
<b>1.3</b>	<b>Proteínas alimentares do leite</b> .....	22
1.3.1	Caseína .....	23
1.3.2	Alfa-lactalbumina .....	24
<b>1.4</b>	<b>Resíduos de antibióticos em alimentos</b> .....	26
1.4.1	Tetraciclinas: aplicação medicina veterinária.....	26
1.4.2	Sulfonamidas: aplicação medicina veterinária .....	28
<b>1.5</b>	<b>Estratégias para monitorar interação proteínas alimentares e antibióticos</b> .....	30
1.5.1	Espectroscopia de absorção no UV-visível .....	31
1.5.2	Espectroscopia de fluorescência molecular .....	31
1.5.3	Grau de hidrofobicidade em proteínas – emprego da sonda ANS .....	32
1.5.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	33
1.5.5	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	34
1.5.6	Avaliação da atividade antibacteriana .....	34
<b>2</b>	<b>POR QUE REALIZAR ESTUDOS DE INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS ALIMENTARES E ANTIBIÓTICOS DE USO VETERINÁRIO?</b> .....	35
<b>2.1</b>	<b>Justificativa</b> .....	35
<b>2.2</b>	<b>Contribuições deste trabalho para sociedade</b> .....	35
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS DA ETAPA 1</b> .....	36
<b>3.1</b>	<b>Geral</b> .....	36
<b>3.2</b>	<b>Específicos</b> .....	36
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTAL GERAL</b> .....	37
<b>4.1</b>	<b>Reagentes e soluções</b> .....	37
<b>4.2</b>	<b>Procedimentos experimentais</b> .....	37
4.2.1	Espectroscopia de fluorescência molecular .....	37
4.2.2	Espectroscopia de absorção molecular (UV-vis).....	39
4.2.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida (Native PAGE) .....	39
4.2.4	Interação proteína-ligante por RMN <sup>1</sup> H .....	40

4.2.5	Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i> .....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO (ETAPA 1) – AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA CASEÍNA, PROTEÍNA ALERGÊNICA DO LEITE, COM TETRACICLINAS EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E ELETROFORESE</b> .....	<b>41</b>
<b>5.1</b>	<b>Mecanismo de interação e parâmetros termodinâmicos</b> .....	<b>41</b>
<b>5.2</b>	<b>Avaliação do processo de interação por UV-vis</b> .....	<b>47</b>
<b>5.3</b>	<b>Avaliação de mudanças conformacionais na estrutura da proteína</b> .....	<b>49</b>
5.3.1	Fluorescência sincronizada.....	49
5.3.2	Fluorescência tridimensional (3D) .....	50
5.3.3	Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) .....	52
<b>5.4</b>	<b>Estudos de competição no processo de interação</b> .....	<b>53</b>
5.4.1	Avaliação de espécies comuns presentes no leite.....	53
5.4.2	Avaliação da hidrofobicidade da caseína .....	55
<b>5.5</b>	<b>Influência da temperatura de pasteurização do leite</b> .....	<b>56</b>
<b>5.6</b>	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida (native-PAGE)</b> .....	<b>58</b>
<b>5.7</b>	<b>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H)</b> .....	<b>59</b>
<b>5.8</b>	<b>Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i></b> .....	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES DA ETAPA 1</b> .....	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>64</b>
	<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>75</b>
	<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>76</b>
	<b>APÊNDICE C</b> .....	<b>77</b>
	<b>APÊNDICE D</b> .....	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>ETAPA 2 - AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA CASEÍNA E LACTALBUMINA, PROTEÍNAS ALERGÊNICAS DO LEITE, COM SULFONAMIDAS EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS</b> .....	<b>79</b>
<b>8.1</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>79</b>
8.1.1	Geral .....	79
8.1.2	Específicos.....	79
<b>9</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>80</b>
9.1	Mecanismo de ligação e parâmetros termodinâmicos.....	80
<b>9.2</b>	<b>Avaliação da interação por UV-vis</b> .....	<b>87</b>

<b>9.3</b>	<b>Avaliação de alterações conformacionais nas estruturas da CAS e LAC</b> .....	89
9.3.1	Fluorescência sincronizada .....	89
9.3.2	Fluorescência tridimensional .....	90
<b>9.4</b>	<b>Ensaio de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)</b> .....	92
<b>9.5</b>	<b>Ensaio de competição</b> .....	95
9.5.1	Avaliação da influência de espécies competidoras no processo de interação .....	95
9.5.2	Avaliação do índice de hidrofobicidade das proteínas caseína e lactalbumina.....	96
<b>9.6</b>	<b>Influência do tratamento térmico no processo de interação</b> .....	97
<b>9.7</b>	<b>Avaliação da atividade antibacteriana</b> .....	98
<b>10</b>	<b>CONCLUSÕES DA ETAPA 2</b> .....	100
<b>11</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	101
<b>12</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	102
	<b>APÊNDICE A</b> .....	106
	<b>APÊNDICE B</b> .....	107
	<b>APÊNDICE C</b> .....	108

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As proteínas alimentares do leite de vaca como a caseína e a lactalbumina são naturalmente alergênicas e podem provocar reações alérgicas em indivíduos sensíveis a estas proteínas. Os antibióticos das classes das tetraciclina e das sulfonamidas são extensamente utilizados como medicamentos de uso veterinário em vacas leiteiras devido a seus amplos espectros de ação e baixos custos. Desta maneira, seu uso inadequado pode resultar na presença de resíduos destes medicamentos nos alimentos derivados da vaca, como leite e carne podendo resultar em efeitos tóxicos e reações alérgicas aos consumidores destes alimentos. O leite é um alimento versátil podendo ser utilizado de forma direta ou empregado na preparação de uma ampla variedade de alimentos, atendendo toda classe populacional.

Na literatura tem sido reportado diversos estudos de interação proteína-ligante entre as proteínas lácteas (caseína e lactalbumina) com diferentes ligantes (epigallocatequina-3-galato, procianidinas, naringerina, tetraciclina,  $\beta$ -caroteno, diacetilcurcumina, antocianinas, compostos fenólicos, vitamina D<sub>3</sub>, cinamaldeído, entre outros) os quais podem alterar a estrutura nativa das proteínas, e deste modo, pode potencializar reações alérgicas. Desse modo, se faz necessário estudos de interação da caseína e da lactalbumina com medicamentos de uso veterinário, uma vez que na literatura há uma escassez de estudos de interação com proteínas lácteas e medicamentos de uso veterinário, como as tetraciclina e sulfonamidas.

Devido ao aumento da prevalência de doenças alérgicas no mundo, especialmente em crianças e adultos jovens, um estudo desenvolvido por Moreira et al. (2018) avaliou o perfil dos pacientes registrados no ambulatório de Alergia e Imunologia do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA) de Maceió/AL, no período de outubro de 2016 a setembro de 2017. Dos 205 pacientes selecionados para este estudo 46,8% tiveram o diagnóstico de alergia alimentar, sendo a alergia à proteína do leite de vaca (APLV) a principal responsável (51,5%), seguida da alergia ao ovo (13,4%). Desta forma, tornam-se necessário estudos de interação com proteínas do leite visando a segurança alimentar dos seres humanos.

Diversas estratégias empregando técnicas instrumentais têm sido empregadas para estudos de interação proteína-ligante *in vitro* tais como: fluorescência molecular, UV-visível, infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), eletroforese, espectrometria de massas, dicroísmo circular (CD), ressonância magnética nuclear (RMN), entre outras (DONG; MA; LIU, 2013). Este estudo foi dividido em duas etapas: na primeira etapa foi avaliada a interação entre a caseína micelar com os antibióticos da classe das tetraciclina (tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina) simulando as condições do alimento (leite) visando

investigar os principais aspectos que regem este processo de interação intermolecular *in vitro*, empregando técnicas espectroscópicas, eletroforese e avaliação da atividade antibacteriana. Na segunda etapa deste trabalho foi avaliada a interação *in vitro* da caseína micelar e a  $\alpha$ -lactalbumina com os medicamentos da classe das sulfonamidas (sulfatiazol e sulfametazina) simulando as condições do alimento, empregando técnicas espectroscópicas, eletroforese e ensaios biológicos para avaliação dos parâmetros que regem o processo de interação *in vitro*. Nesta etapa não foram realizados ensaios de eletroforese em gel e RMN devido à baixa solubilidade da  $\alpha$ -lactalbumina.

De forma geral, as contribuições deste estudo para a sociedade estão pautadas na segurança alimentar com a conscientização e uso racional dos medicamentos de uso veterinário por parte dos criadores de animais produtores de leite, visto que a exposição humana a resíduos destes fármacos em alimentos como leite e derivados representam um risco a segurança alimentar.

### **1.1 Química supramolecular e interação proteína-ligante**

A química supramolecular foi definida em 1978 pelo químico francês Jean-Marie Lehn como a “*química além da molécula*”. Neste contexto, enquanto a *química molecular* está baseada na formação de ligações covalentes, a *química supramolecular* está relacionada as associações moleculares organizadas através de interações intermoleculares de natureza não covalente, tais como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, entre outras (SAVYASACHI et al., 2017).

As interações intermoleculares são a base dos processos biológicos entre substratos e enzimas, DNA e fármacos, reconhecimento celular e indução de sinais através de neurotransmissores, além das interações macromolécula-ligante, especialmente as interações proteína-ligante (LEHN, 1996), que são a base deste trabalho. As proteínas são macromoléculas que desempenham uma grande variedade de funções biológicas, incluindo estrutural (citoesqueleto), mecânica (músculo), catalítica (enzimas) além de funções de sinalização celular (hormônios) (LODISH et al., 2005). Em geral, as proteínas realizam suas funções biológicas por meio da interação com outras moléculas, incluindo proteínas e peptídeos, ácidos nucleicos, substratos e moléculas pequenas (carboidratos) dentre outras (DU et al., 2016).

Estudos de interação proteína-ligante são a base central para o entendimento de muitos processos biológicos como catálise enzimática, sinalização receptor-molécula e transporte (ALLISON et al., 2014). Mudanças conformacionais induzidas pela ligação proteína-ligante podem alterar a estrutura da proteína de forma que sua estrutura e função sejam diferentes

daquelas no estado livre (HU; LI, 2014). Portanto, é de grande importância estudos de interação entre proteínas e ligantes *in vitro* para o entendimento de alterações estruturais e funcionais resultantes destes processos. Devido ao aumento mundial da incidência de doenças alérgicas, principalmente em crianças e adultos, é necessário estudos de interação com proteínas alimentares tendo em vista a segurança alimentar.

## **1.2 Alergia e características dos alérgenos alimentares**

A alergia alimentar é uma reação de hipersensibilidade mediada pela imunoglobulina E (IgE) provocada por uma resposta imunológica que ocorre em indivíduos sensíveis a exposição a um determinado alimento (DYER; GUPTA, 2013). A prevalência mundial de reações adversas à alimentos tem aumentado, especialmente nos primeiros anos de vida. Dentre os fatores ambientais que contribuem para o aumento dos casos de alergia destacam-se: alterações na microbiota intestinal (uso excessivo de antibióticos, medicamentos inibidores do ácido gástrico, aumento de partos cesáreos), exposição a alimentos processados, ultra processados, além das baixas taxas de aleitamento materno (YU, MALLAPATY; MILLER, 2018). Nas crianças os quatro alimentos responsáveis pelo aparecimento de reações alérgicas são: leite, ovo, amendoim e trigo, e as manifestações clínicas variam desde reações cutâneas localizadas até um reação de hipersensibilidade grave (anafilaxia) e de rápida progressão, que pode causar risco de vida (JORGE et al., 2017; GONZALES-GONZÁLEZ et al., 2018).

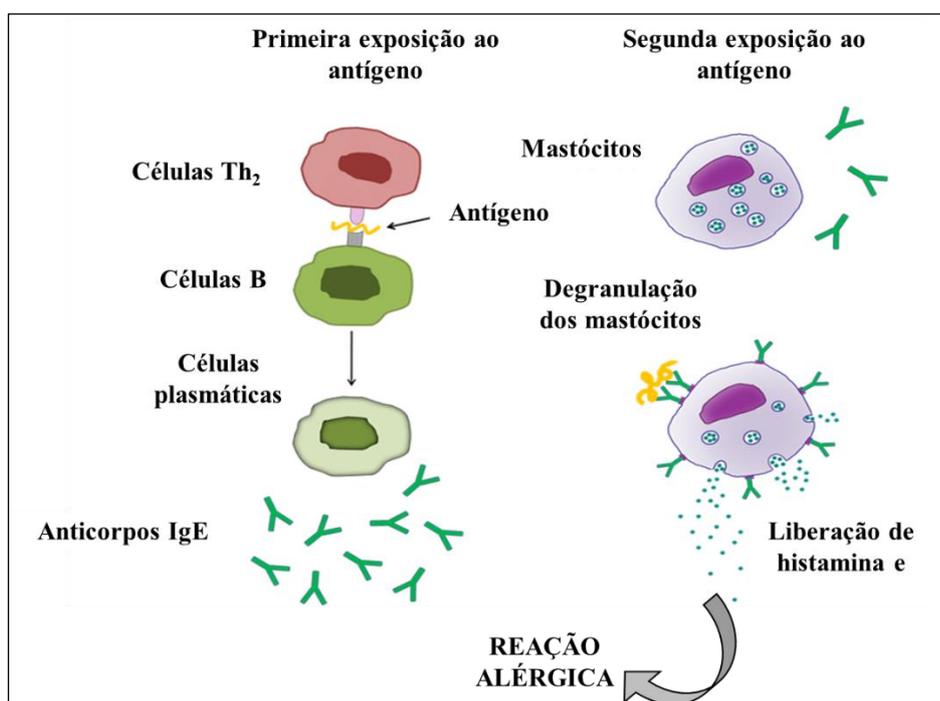
A patogênese da alergia alimentar é dividida em duas fases: a primeira fase corresponde a etapa de sensibilização, a qual ocorre quando a pessoa é exposta pela primeira vez a um determinado alimento através do trato gastrointestinal, pele ou mucosa, e o sistema imunológico produz uma grande quantidade de anticorpos IgE específicos para aquele alimento pelas células B. Nesta fase, o indivíduo não apresenta qualquer tipo de sintomas. A segunda fase é a etapa da indução da reação alérgica, que ocorre após um segundo contato com o alimento, através da ligação do alérgeno alimentar (em geral proteínas) aos mastócitos ou basófilos, através dos IgE específicos, anteriormente produzidos. Este processo leva à degranulação dos mastócitos, libertação de pequenos grânulos que contêm substâncias químicas denominadas mediadores inflamatórios (histamina, citocinas, leucotrienos, prostaglandinas, entre outros), desencadeando uma reação alérgica que provoca sintomas como urticária com coceira associadas, chiado no peito, falta de ar (dispneia), vômito, diarreia e dor abdominal (MATSUO; YOKOOJI; TAOGOSHI, 2015). A Figura 1 apresenta o mecanismo genérico de alergia medida por IgE.

A maioria dos alérgenos alimentares são glicoproteínas solúveis em água com massa molar entre 10-70 kDa, resistentes à degradação pelo cozimento e digestão (EKEZIE; CHENG;

SUN, 2018). São reconhecidos pelas imunoglobulinas E (IgE) desencadeando respostas imunológicas que resultam em manifestações clínicas características (CASTRO et al., 2012).

De acordo com Gonzales-González et al. (2018), 90% das reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis são ocasionadas por oito alimentos: leite, ovos, amendoim, nozes, peixe, crustáceos (camarão lagosta, caranguejo, entre outros), soja e trigo. Dentre esses alimentos, a alergia as proteínas do leite de vaca é a mais frequente, visto que, no Brasil crianças demonstraram uma sensibilização de 9,6% para os alérgenos do leite (JÚNIOR; BURNS; LOPEZ, 2014; BALDAÇARA et al., 2013)

**Figura 1- Mecanismo de alergia medida por IgE.**



Fonte: Adaptado de BARMAN, 2015.

No leite de vaca podem ser encontradas pelo menos vinte proteínas, as caseínas e as proteínas do soro são responsáveis por aproximadamente 80 e 20%, respectivamente, do conteúdo proteico total deste alimento. Contudo, as principais proteínas alergênicas do leite são as caseínas, a  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina. As caseínas são compostas por quatro frações de proteínas ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseínas) que correspondem a 29, 8, 27 e 10% das proteínas lácteas, sendo termoestáveis e alergênicas. As principais proteínas do soro do leite são  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, que correspondem a 5 e 10% do total de proteínas deste alimento, como característica são proteínas termolábeis e termoestáveis, respectivamente, além de alergênicas (KATTAN et al., 2011). A Tabela 1 apresenta as principais proteínas alergênicas do leite vaca (*Bos domesticus*) e suas características, bem como suas propriedades físico-químicas.

**Tabela 1- Características das principais proteínas alergênicas do leite.**

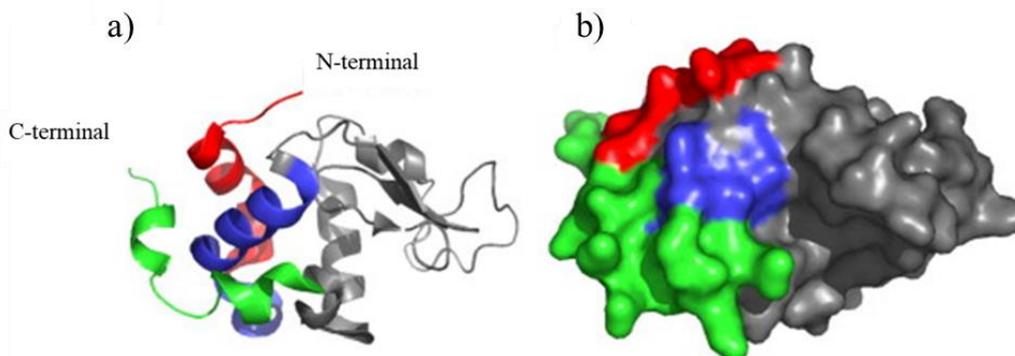
Fração	Proteína	Alérgeno	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Massa molar (kDa)	Nº de AA	pI	Atividade alergênica (% pacientes)	Epítotos de ligação a IgE (nº de AA)
Soro	$\alpha$ -lactalbumina	Bos d4	1,0 - 1,5	14,2	123	4,8	12	1-19, 15-34, 45-64, 60-79, 90-109, 105-123
	$\beta$ -lactoglobulina	Bos d5	3,0 – 4,0	18,3	162	5,3	19	1-16, 56-70, 76-90, 136-150
Caseínas	$\alpha$ <sub>s1</sub> -caseína	Bos d9	12,0 – 15,0	23,6	199	4,9 - 5,0	26	6-20, 11-35, 126-140, 171-185 16-35, 28-50, 73-92 17-36, 39-48, 69-78, 83-102, 109-120, 122-132, 139-154, 159-174, 173-194, 181-199
	$\alpha$ <sub>s2</sub> -caseína	Bos d10	3,0 – 4,0	25,2	207	5,2 - 5,4	-	31-44, 43-56, 83-100, 93-108, 105-114, 117-128, 143-158, 157-172, 165-188, 191-200
	$\beta$ -caseína	Bos d11	9,0 – 11,0	24,0	209	5,1 - 5,4	35	25-50, 52-74, 121-140, 154-173
	$\kappa$ -caseína	Bos d12	3,0 – 4,0	19,0	169	5,4 - 5,6	26	9-26, 21-44, 47-68, 67-78, 95-116, 111-126, 137-148, 149-166

AA = aminoácidos / pI = ponto isoeletrônico// Bos d = *Bos domesticus* (gênero de mamíferos da família dos bovídeos) // Epítoto = região da proteína alimentar à qual a IgE se liga// IgE = imunoglobulina E

Fonte: Adaptado de HOCHWALLNER et al., 2014; MATSUO; YOKOOJI; TAOGOSHI, 2015.

O fracionamento do leite produz duas frações de proteínas, as caseínas e as do soro do leite. As caseínas incluem  $\alpha_{s1}$ - (Bos d 9),  $\alpha_{s2}$ - (Bos d 10),  $\beta$ - (Bos d 11) e  $\kappa$ - (Bos d 12). As principais proteínas alergênicas do soro do leite são a  $\alpha$ -lactalbumina (Bos d4) e  $\beta$ -lactoglobulina (Bos d 5). A prevalência da reatividade da IgE para as proteínas do leite demonstrada em pacientes com suspeita de alergia ao leite de vaca variou de 12 (Bos d4) a 35% (Bos d11), o qual indica que os pacientes com alergia as proteínas do leite de vaca são mais sensíveis a  $\beta$ -caseína. Quanto a região da proteína à qual a IgE se liga, a lactalbumina apresenta seis peptídeos reativos a IgE (HOCHWALLNER et al., 2014), deste total, três peptídeos AA (1-19; 15-34 e 105-123), estão localizados na superfície da proteína (Figura 2).

**Figura 2 - a) estrutura tridimensional da LAC e b) superfície molecular da  $\alpha$ -lactalbumina com indicação dos epítomos de ligação a IgE em verde, vermelho e azul.**



Fonte: Adaptado de Hochwallner et al., 2010.

Para a  $\alpha_{s1}$ -caseína, a região C-terminal é a região de ligação imunodominante à IgE (AA 181-199), além dos peptídeos localizados nos aminoácidos (19-30; 93-98 e 141-150) (NAKAJIMA-ADACHI et al., 1998). De acordo com Busse et al. (2001) a  $\alpha_{s2}$ -caseína apresenta 10 epítomos sequenciais de ligação a IgE, e deste total quatro foram detectados em 77% dos pacientes, dos quais AA (83-100; 143-158; 157-172 e 165-188).

Quanto a  $\beta$ -caseína, Cerecedo et al. (2008) identificaram quatro epítomos e deste total, três estavam associados aos sintomas de alergia alimentar, AA (25-50; 52-74; 154-73). Por fim, para a  $\kappa$ -caseína foram identificados oito peptídeos principais que se ligam a IgE, três localizados nas regiões dos AA (9-26; 21-44 e 47-68), foram reconhecidos por 93% dos pacientes com alergia ao leite de vaca (CHATCHATEE et al., 2001).

Devido ao aumento da prevalência de doenças alérgicas no mundo, especialmente em crianças e adultos jovens, um estudo desenvolvido por Moreira et al. (2018) avaliou o perfil dos pacientes registrados no ambulatório de Alergia e Imunologia do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA) de Maceió/AL, no período de outubro de 2016 a setembro

de 2017. Para este estudo foram selecionados 205 pacientes, onde 46,3% eram do sexo feminino e 53,6% do masculino. A idade variou entre 07 meses a 85 anos, com média de 16,4 anos e a faixa etária mais prevalente de 0 a 9 anos (50,2 %). Destes 46,8% tiveram o diagnóstico de alergia alimentar com idade média de 12,6 anos. A alergia à proteína do leite de vaca (APLV) foi a principal responsável (51,5%), seguida da alergia ao ovo (13,4%). Desta forma, tornam-se necessário estudos com proteínas alimentares do leite visando a segurança alimentar dos seres humanos.

### **1.3 Proteínas alimentares do leite**

As proteínas alimentares são macromoléculas indispensáveis ao corpo humano, como provedora de calorias, fornecedoras dos aminoácidos responsáveis pelo crescimento e pela manutenção do organismo. Suas principais fontes são o leite, as carnes (incluindo peixes e aves), os ovos, os cereais, as leguminosas e as oleaginosas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Dentre as principais fontes alimentares de proteínas, o leite é a primeira a ser introduzida na alimentação. Este é constituído de 3,6% de proteínas, onde a caseína é a proteína majoritária deste alimento, seguido das proteínas do soro do leite ( $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina) (REBOUILLAT & ORTEGA-REQUENA, 2015).

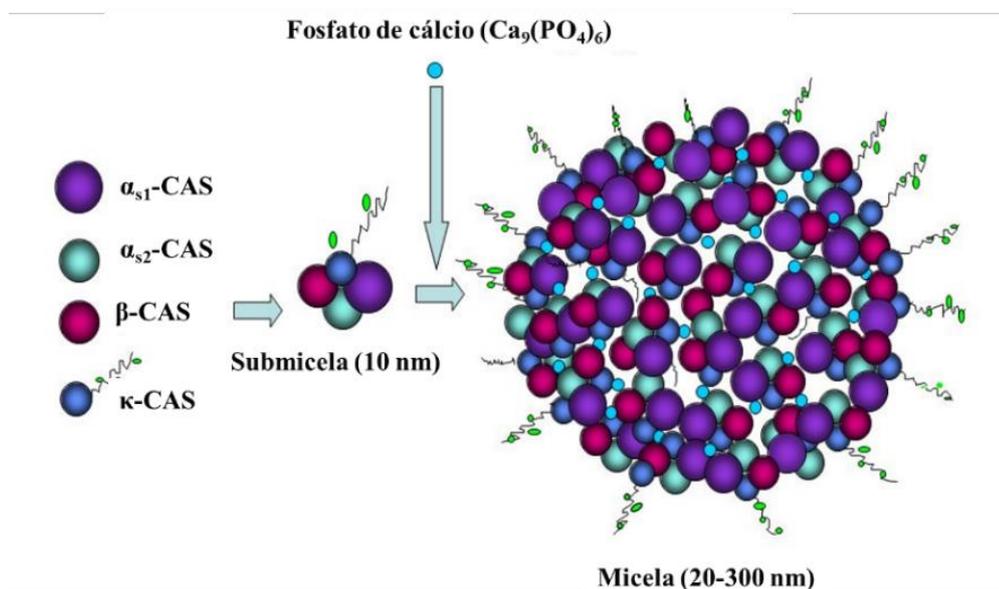
Em geral, o leite de vaca industrializado antes de chegar até os consumidores passa por algumas etapas de processamento como tratamentos térmicos e centrifugação. Os tratamentos térmicos mais utilizados são: pasteurização (aquecimento do leite a 70-80°C por 15-20 s), esterilização (110-120°C por 10-20 min) e ultra alta temperatura (UHT, 135-145°C por 0,5-4 s). A pasteurização aumenta a alergenicidade do leite, conforme indicado por estudos de ligação de IgE, possivelmente devido à agregação e ativação dos mastócitos (VERHOECKX et al., 2015). Além disto, alimentos processados possuem estrutura tridimensional das proteínas alimentares modificadas, o qual pode alterar o potencial imunogênico dos epítomos das proteínas e desta forma, potencializar reações alérgicas a indivíduos (hiper)sensíveis ao alimento. Os epítomos podem tornar-se mais expostos ou ocultos através do desdobramento das estruturas proteicas. Por fim, as alterações induzidas pelo processamento de alimentos podem afetar a digestibilidade, a cinética de absorção, bem como sua apresentação ao sistema imunológico e, desta forma, influenciar na sua alergenicidade (RAHAMAN; VASILJEVIC; RAMCHANDRAN, 2016).

### 1.3.1 Caseína

A caseína (CAS) está presente no leite na forma de agregados supramoleculares denominados micelas cuja definição é agregada moleculares formados por regiões estruturais hidrofílica e hidrofóbica, que se associam dinamicamente e espontaneamente em solução aquosa (MANIASSO, 2001). São formadas por submicelas das diferentes caseínas ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -) nas seguintes proporções 38, 10, 35 e 12% unidas por ligação de fosfato de cálcio, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, formando uma micela com o diâmetro variável de 20 a 300 nm (ANTONOV; MOLDENAERS; CARDINAELS, 2017; REBOUILLAT & ORTEGA-REQUENA, 2015).

A Figura 3 mostra a representação esquemática das submicelas e micela da CAS. As diferentes caseínas ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -) possuem 199, 207, 209 e 169 resíduos de aminoácidos, com massas moleculares de 23,6; 25,2; 24,0 e 19,0 kDa, respectivamente, como observado na Tabela 1 (Pág. 20) (TSABOURI et al., 2014). Na Tabela 2 estão apresentados os aminoácidos que constituem as cadeias polipeptídicas das quatro caseínas e da  $\alpha$ -lactalbumina.

**Figura 3 - Esquema de representação da submicela e micela de caseína.**



Fonte: adaptado de REBOUILLAT & ORTEGA-REQUENA, 2015.

**Tabela 2 - Aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas das caseínas e  $\alpha$ -lactalbumina.**

Aminoácido	Número de resíduos de aminoácido					Carga (pH = 7,0)
	$\alpha$ s1-CAS	$\alpha$ s2-CAS	$\beta$ -CAS	$\kappa$ -CAS	$\alpha$ -lactalbumina	
Ácido Aspártico	7	4	4	4	9	-
Asparagina	8	14	5	8	12	0
Treonina	5	15	9	15	7	0
Serina	16	17	16	13	7	0
Ácido Glutâmico	25	24	19	12	8	-
Glutamina	14	16	20	15	5	0
Prolina	17	10	35	20	2	0
Glicina	9	2	5	2	6	0
Alanina	9	8	5	14	3	0
Cisteína	0	2	0	2	8	0
Valina	11	14	19	11	6	0
Metionina	5	4	6	2	1	0
Isoleucina	11	11	10	12	8	0
Leucina	17	13	22	8	13	0
Tirosina	10	12	4	9	4	0
Fenilalina	8	6	9	4	4	0
Lisina	14	24	11	9	12	+
Histidina	5	3	5	3	13	+
Triptofano	2	2	1	1	4	0
Arginina	6	6	5	5	1	+

Fonte: adaptado de ANTUNES, 2003. / HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2018.

A CAS é utilizada na indústria alimentícia na fabricação de queijos, iogurtes, achocolatados, entre outros, além de ser empregada na fabricação de colas, plásticos, produtos farmacêuticos e odontológicos (CHANG et al., 2018), sendo uma proteína versátil. Devido a sua ampla utilização na produção de diversos alimentos torna-se necessário estudos de interação com diferentes ligantes (medicamentos de uso veterinário) com esta proteína.

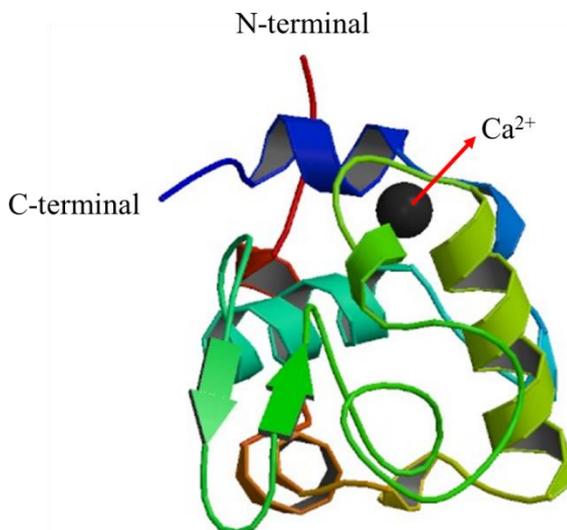
### 1.3.2 Alfa-lactalbumina

A alfa-lactalbumina (LAC) é a segunda proteína do soro mais abundante no leite bovino. A concentração de LAC varia de 1,0 a 1,5 g L<sup>-1</sup> no leite bovino, que representa 20% das proteínas do soro e corresponde a aproximadamente 3,4% do conteúdo proteico total deste alimento. É uma proteína globular constituída de 123 resíduos de aminoácidos (Tabela 1, pág. 20) com massa molar de 14,2 kDa. Sua estrutura é constituída de dois domínios: um grande domínio de  $\alpha$ -hélice e um pequeno domínio de folha- $\beta$  conectados por uma ligação de cálcio (VELICKOVIC et al., 2018).

O domínio helicoidal possui três  $\alpha$ -hélices principais (resíduos 5-11, 23-24 e 86-98) e duas 3d<sub>10</sub> hélices (extensões de  $\alpha$ -hélices encontradas nos terminais N ou C) menores (resíduos 18-20 e 115-118). A estrutura do domínio da folha beta é composta de três cadeias antiparalelas (resíduos 41-44, 47-50 e 55-56), de uma  $\alpha$ -hélice menor (resíduo 77-80) com algumas voltas. Além disto, possui quatro pontes dissulfeto e uma região hidrofóbica, sendo os dois domínios

conectados pelo íon cálcio (DELAVARI et al., 2015). A Figura 4 apresenta a estrutura tridimensional da  $\alpha$ -lactalbumina bovina.

**Figura 4 - Estrutura tridimensional da  $\alpha$ -lactalbumina bovina.**



Fonte: *Protein Data Bank (PDB)* em <http://www.rcsb.org/structure/1HFZ>

Devido ao seu alto conteúdo nutricional e propriedades relativas à solubilidade e à capacidade para formar emulsões e espumas, esta proteína é amplamente empregada nas indústrias de alimentos, de suplementos alimentares e de nutrição. Adicionalmente, a LAC bovina possui uma elevada similaridade com a lactalbumina humana (homologia de 74%), sendo empregada no preparo de formulações para recém-nascidos no período neonatal, prematuros e para a terapia nutricional na infância (SOUSA et al., 2014). Além de ser utilizada como suplemento dietético (*Whey Protein*) por praticantes de atividade física com objetivo de aumento de massa muscular (CASTRO et al., 2017).

Como descrito anteriormente, as proteínas citadas possuem naturalmente epítomos alergênicos, os quais podem provocar reações alérgica em indivíduos sensíveis. Além disso, estudos de interação proteína-ligante reportados na literatura mostram que a interação entre as proteínas lácteas (caseína e lactalbumina) com diferentes ligantes (Tabela 2 - Seção 2, pag. 45 e Seção 3, pag. 84) podem alterar a estrutura nativa da proteína, e dessa forma, pode potencializar reações alérgicas. Em vista disso, é necessário estudos de interação da caseína e da lactalbumina com diferentes ligantes.

## 1.4 Resíduos de antibióticos em alimentos

Na criação de animais produtores de alimentos como galinhas e gado são empregados medicamentos antibióticos para controlar, prevenir/tratar infecções e melhorar o crescimento e eficiência alimentar. As tetraciclina e as sulfonamidas são os antibióticos mais utilizados em animais produtores de alimentos. (RAMA et al., 2017; ZHANG et al., 2014). De acordo com Pacheco-Silva et al. (2014), o uso inadequado de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos, como carne, leite, ovos e mel, pode resultar na presença de resíduos nestes, o que pode causar efeitos tóxicos, reações alérgicas além da resistência à antibióticos aos consumidores.

O Brasil possui dois programas nacionais que monitoram a presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que analisa alimentos como carne, leite, ovos, mel e pescado. E o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (Pamvet) coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o qual realiza análise em leite ultra alta temperatura (UHT), em pó e pasteurizado, os quais preconizam o Limite Máximo de Resíduo (LMR) das tetraciclina e sulfonamidas que podem ser encontradas no leite em  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (PACHECO-SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014)

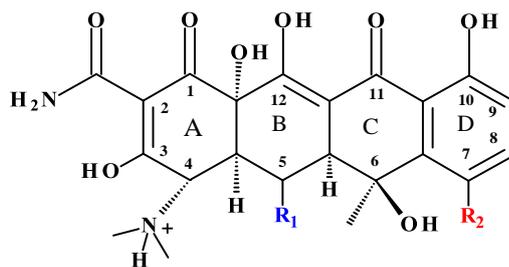
Diversos estudos têm sido reportados na literatura com a presença de resíduos de antibióticos no leite. Granja et al. (2012) e Martins et al. (2016) analisaram a presença de resíduos de sulfonamidas e tetraciclina em leite produzidos no Brasil, os quais estão acima do limite estabelecido. O número total de amostras analisadas por Granja et al. (2012) não foi informado, apenas o tipo de leite foi descrito, o qual foi utilizado leite integral produzidos em várias partes do Brasil. Martins et al. (2016) analisaram 604 amostras de leite (UHT) e leite pasteurizado. Desta forma, devido a presença de antibióticos no leite torna-se necessário estudos de interação com proteínas alimentares e medicamentos de uso veterinário.

### 1.4.1 Tetraciclina: aplicação medicina veterinária

As tetraciclina são antibióticas de uso humano e veterinário, que podem ser empregadas na prevenção e tratamento de doenças em animais produtores de alimentos como gado e aves, e também para promover o crescimento destes animais, devido ao seu amplo espectro de ação contra bactérias (Gram positivas e negativas) e relativo baixo custo. Dentre as tetraciclina mais utilizados para a criação de animais destinados à alimentação humana estão a tetraciclina, oxitetraciclina, clorotetraciclina e doxiciclina (NEBOT et al., 2014; SHALABY

et al., 2011). As tetraciclinas apresentam diferentes funções químicas em sua estrutura, e a depender do pH do meio podem estar sob diferentes formas, em função do grau de protonação. 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 5).

**Figura 5 – Esquema da estrutura química das tetraciclinas (totalmente associadas) avaliadas neste estudo.**



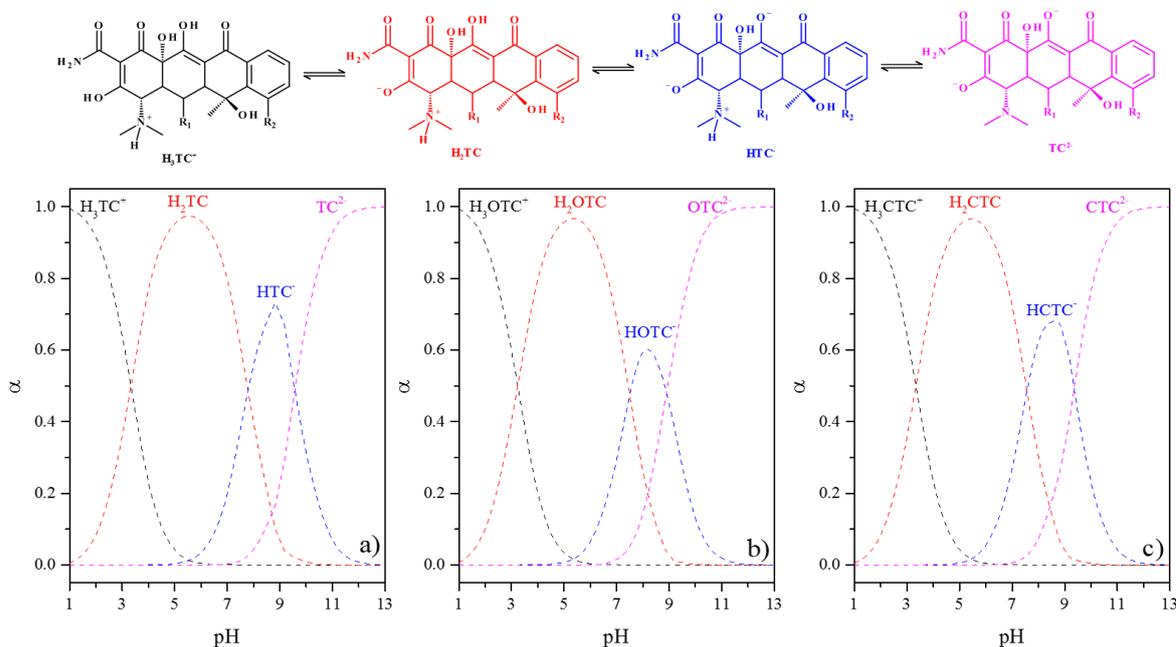
Composto	Radical		Constante de dissociação ácida		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a3</sub>
Tetraciclina (TC)	H	H	3,30	7,60	9,30
Oxitetraciclina (OTC)	OH	H	3,32	7,30	9,10
Clortetraciclina (CTC)	H	Cl	3,28	7,80	9,60

**Fonte:** Adaptado de RIVERA-UTRILLA, 2013.

De acordo com Zhou et al. (2014), os valores de pK<sub>a</sub> relativos aos três primeiros prótons para as tetraciclinas avaliadas são indicados na Figura 5 (tabela interna). Com base nos três diferentes valores de pK<sub>a</sub> associados as moléculas de tetraciclinas é possível que em solução existam até quatro espécies diferentes em função do pH, com distintos graus de protonação, sendo: H<sub>3</sub>TC<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>TC, HTC<sup>-</sup> e TC<sup>2-</sup> (Figura 6).

Cada uma destas espécies possui comportamento e carga diferentes. Assim, é importante em estudos de interação entre macromoléculas e ligante compreender o comportamento ácido-base da molécula derivado de um ácido e sua respectiva carga em um determinado pH. Desta forma, a espécie totalmente associada da TC (H<sub>3</sub>TC<sup>+</sup>) será predominante em valores de pH < 3, com carga positiva e atuando como ácido de Bronsted-Lowry. A forma neutra (H<sub>2</sub>TC) será predominante entre o pH 3,5-6,5; enquanto a forma aniônica (HTC<sup>-</sup>) será predominante na faixa de pH 8-9, sendo ambas, H<sub>2</sub>TC e HTC<sup>-</sup>, espécies anfipróticas, comportando-se como ácido ou base em solução aquosa. Finalmente, a espécie dianiônica (TC<sup>2-</sup>) será predominante para pH > 10 e atuará como base de Bronsted-Lowry. Este mesmo raciocínio pode ser utilizado para todas as tetraciclinas em função do pH do meio, com pequenas variações em função das diferenças de pK<sub>a</sub>. Conseqüentemente, a interação das tetraciclinas com variadas macromoléculas dependerá do seu estado de protonação (KULSHRESTHA; GIESE; AGA, 2004).

**Figura 6. Distribuição das espécies de tetraciclina (TC) em função do pH, a) tetraciclina (TC) ( $R_1 = H, R_2 = H$ ), b) oxitetraciclina (OTC) ( $R_1 = OH, R_2 = H$ ) e c) clorotetraciclina (CTC) ( $R_1 = H, R_2 = Cl$ ).**



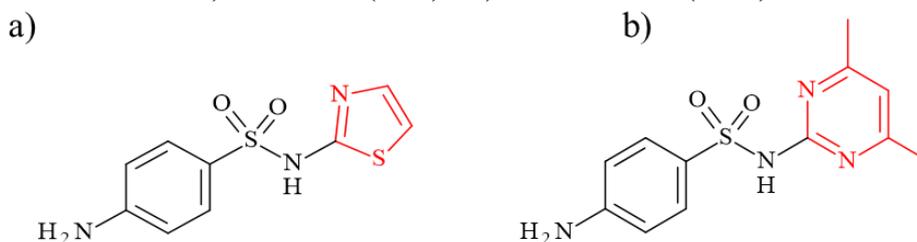
Fonte: DANTAS, 2015.

Outra classe de medicamentos antibióticos utilizados na medicina veterinária em animais produtores de alimento como vacas leiteiras são as sulfonamidas.

#### 1.4.2 Sulfonamidas: aplicação na medicina veterinária

As sulfonamidas são medicamentos antibióticos derivadas do ácido sulfanílico (ácido *p*-aminobenzeno sulfônico), empregadas na medicina veterinária devido a sua ampla ação contra infecções causadas por bactérias (Gram positivas e negativas), alguns protozoários e seu baixo custo (ARMENTANO et al., 2018). Na Figura 7 estão apresentadas as sulfonamidas utilizadas neste trabalho, o sulfatiazol (STZ) e a sulfametazina (SMZ).

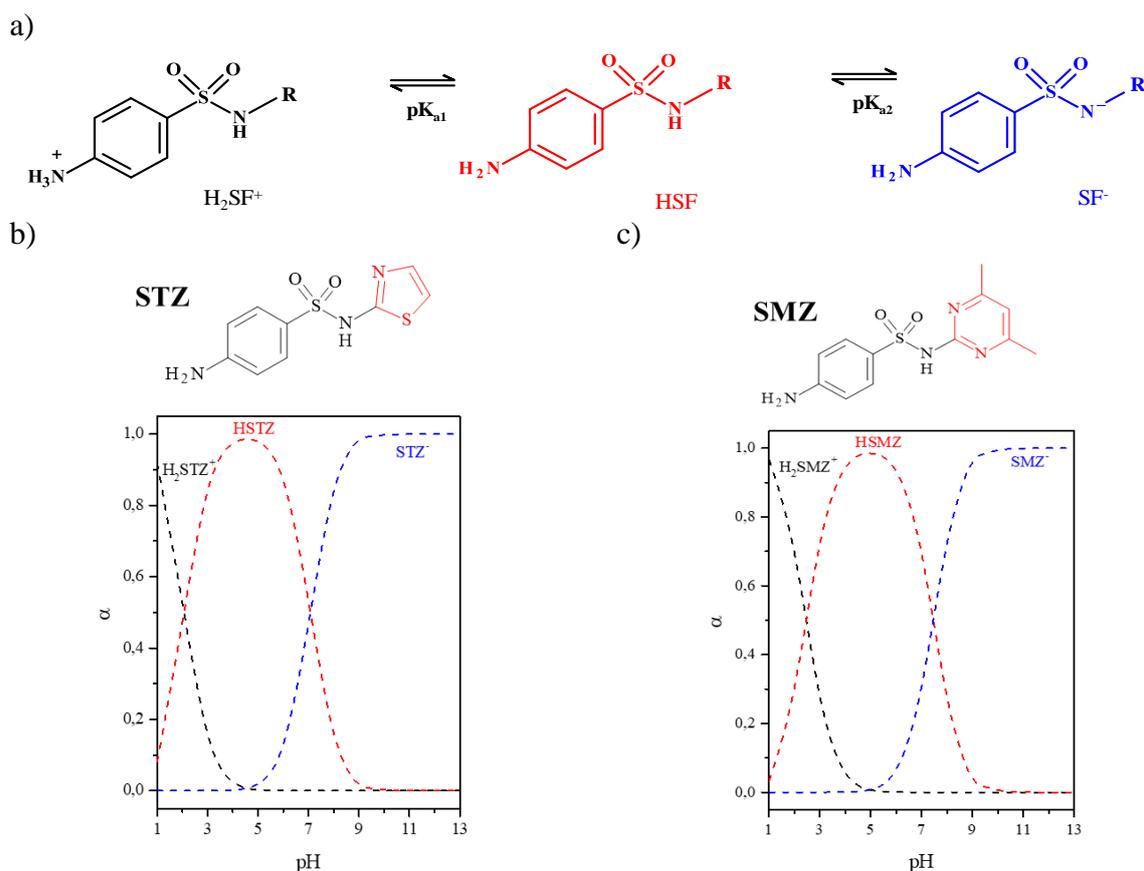
**Figura 7 - Estrutura química das sulfonamidas selecionadas para avaliação com as proteínas caseína e  $\alpha$ -lactalbumina: a) sulfatiazol (STZ) e b) sulfametazina (SMZ).**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Sulfatiazol (STZ) e sulfametazina (SMZ) são empregadas como agentes terapêuticos na criação de animais produtores de alimento como aves, porcos e gado para controle e prevenção de doenças (FERNANDES et al., 2015). As moléculas avaliadas (STZ e SMZ) são derivadas de ácido fraco, e a depender do pH do meio podem estar na forma protonada ou desprotonada. Dessa maneira, a carga global da molécula será diferente em função do pH do meio, e a interação com proteínas pode apresentar diferenças em função da concentração hidrogeniônica do meio. De acordo com Hoff et al. (2008), os valores de  $pK_a$  relativos aos dois primeiros prótons para as sulfonamidas avaliadas são: STZ ( $pK_{a1}=2,06$  e  $pK_{a2}=7,07$ ), SMZ ( $pK_{a1}=2,46$ ;  $pK_{a2}=7,45$ ). Baseado nestes valores de  $pK_a$ , as sulfas podem ser encontradas em solução em três formas distintas:  $H_2SF^+$  (carga positiva,  $pH < pK_{a1}$ ),  $HSF$  (carga neutra,  $pK_{a1} < pH < pK_{a2}$ ) e  $SF^-$  (carga negativa,  $pH > pK_{a2}$ ), conforme Figura 8.

**Figura 8 - a) Equilíbrio de dissociação das sulfonamidas e distribuição das espécies de sulfonamidas em função do pH para b) STZ e c) SMZ.**



Fonte: LYRA, 2017.

Como já mencionado, o uso indiscriminado de antibióticos em animais produtores de alimento pode acarretar na presença destes medicamentos em alimentos. O qual pode resultar em efeitos prejudiciais à saúde humana como reações alérgicas e resistência à antibióticos aos

consumidores de alimentos provenientes de animais tratados com antibióticos. Além disso, a interação de proteínas alimentares com antibióticos pode alterar a sua estrutura conformacional e influenciar o potencial alergênico e propriedades biológicas dos antibióticos (GAO et al., 2017). Bi et al. (2016) estudaram a interação entre as proteínas lácteas alimentares ( $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -lactalbumina) de forma isolada com o antibiótico tetraciclina, neste estudo foram empregadas técnicas espectroscópicas de absorção no UV-visível, fluorescência molecular, dicroísmo circular e modelagem molecular. A partir deste estudo os autores concluíram que as estruturas secundárias de ambas proteínas ( $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -lactalbumina) foram alteradas após interação com a tetraciclina, com redução nas estruturas  $\alpha$ -hélices. Dantas et al. (2017) avaliaram a interação entre a proteína do ovo ovalbumina e três tetraciclinas (tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina) em diferentes condições de pH e temperatura, utilizando técnicas espectroscópicas de absorção no UV-visível, fluorescência molecular, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e eletroforese. Similarmente, Lyra et al. (2017) avaliaram a interação entre diferentes sulfonamidas e ovalbumina empregando técnicas espectroscópicas de absorção no UV-visível, fluorescência molecular, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e avaliação da atividade antibacteriana. Os autores de ambos os estudos concluíram que houve alterações na estrutura conformacional da ovalbumina. Em contrapartida, Lu et al. (2018) avaliaram o efeito de interações covalentes com o ácido clorogênico na capacidade alergênica da ovalbumina, onde foi verificado redução da capacidade alergênica da ovalbumina atribuída a mudanças na estrutura proteica após interação com o ácido clorogênico, e desta forma, levado a proteção do epítopo de IgE na ovalbumina.

Em todos esses estudos os autores concluíram que as estruturas das macromoléculas foram alteradas na presença dos medicamentos. Portanto, torna-se necessário estudar o efeito de resíduos (concentrações na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de medicamentos veterinários (antibióticos) em proteínas alimentares.

### **1.5 Estratégias para monitorar interação proteínas alimentares e antibióticos**

Diversas estratégias empregando técnicas instrumentais são empregadas para o estudo da interação entre proteína-ligante *in vitro* 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  $^1\text{H}$ ), eletroforese em gel de poliacrilamida (*native-PAGE*) e avaliação da atividade antibacteriana para avaliação da interação entre CAS e as tetracilinas nomeadamente tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC). Para estudos utilizando a proteína  $\alpha$ -lactalbumina com os antibióticos sulfatiazol (STZ) e sulfametazina (SMZ) foram empregadas as técnicas espectroscópicas de absorção no UV-visível e fluorescência molecular, além de ensaios para a avaliação da atividade antibacteriana. Este estudo possibilitou o cálculo dos valores das constantes de ligação, modo de interação, número de sítios de ligação, dados termodinâmicos, além de outros parâmetros associados a estas técnicas. Deste modo, alguns aspectos sobre estas técnicas empregadas nos estudos de interação macromolécula-ligante foram descritas abaixo.

#### 1.5.1 Espectroscopia de absorção no UV-visível

A espectroscopia de absorção no UV-visível é uma técnica empregada para avaliar mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, além de informações sobre a formação de complexos proteína-ligante (KHATUN; RIYAZUDDEEN; QAIS, 2018).

O monitoramento das proteínas através desta técnica ocorre pela observação das duas bandas de absorção destas macromoléculas uma em  $\sim 210\text{-}230$  nm que corresponde as características da estrutura  $\alpha$ -hélice, e outra banda de absorção em  $270\text{-}280$  nm que corresponde as transições eletrônicas  $\pi\text{-}\pi^*$  dos resíduos dos aminoácidos triptofano e tirosina. Em geral, a ligação de uma molécula pequena (ligante) a macromolécula resulta em alterações no microambiente dos resíduos dos aminoácidos triptofano e tirosina (SIDDIQI et al., 2017). Dessa forma, é possível observar alterações na estrutura da proteína na presença de ligantes por UV-vis tendo como base o aumento (efeito hiperacrômico) ou diminuição (efeito hipocrômico) da intensidade de absorção e/ou deslocamento do máximo de absorção para maiores comprimento de onda (efeito batocrômico) e menores comprimentos de onda (efeito hipsocrômico) (ARIGA et al., 2017; XING et al., 2013).

#### 1.5.2 Espectroscopia de fluorescência molecular

A espectroscopia de fluorescência molecular é uma técnica amplamente empregada para investigação da conformação de proteínas, dinâmica e interações intermoleculares entre diferentes ligantes e macromoléculas. Isto é possível devido as proteínas possuírem a propriedade de fluorescência intrínseca a qual está relacionada com os resíduos dos aminoácidos triptofano (Trp) e tirosina (Tir) denominados fluoróforos (RUDRA et al., 2018).

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).

Há dois mecanismos principais para a redução de fluorescência o *quenching* estático e o *quenching* dinâmico. 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). É representado pela constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ). 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). 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).

No *quenching* dinâmico, em maiores temperaturas do sistema há um aumento das constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), o que indica que a transferência de energia no estado excitado e os tempos efetivos de colisão entre as moléculas são efetivos. No entanto, no *quenching* estático o aumento da temperatura leva a redução das constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) uma vez que a estabilidade de complexo supramolecular proteína-ligante é diminuída em temperaturas elevadas (BAGHERI et al., 2018).

Nos estudos empregando proteínas as medidas da intensidade do sinal de fluorescência podem fornecer informações a respeito da interação com pequenas moléculas como: mecanismo preferencial de interação *quenching* (dinâmico, estático ou ambos), estequiometria proteína-ligante, constantes de ligação ( $K_b$ ), parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta G$ ), forças intermoleculares envolvidas no processo de interação proteína-ligante, distâncias intermoleculares, entre outras parâmetros (ANSARI et al., 2018). Assim, neste estudo foram utilizadas as seguintes estratégias empregando a espectroscopia de fluorescência molecular: medidas de fluorescência no estado estacionário, estudo do mecanismo de *quenching*, fluorescência tridimensional, fluorescência sincronizada e transferência de energia ressonante (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), para avaliação da interação das proteínas lácteas (caseína e  $\alpha$ -lactalbumina) com as tetraciclina e sulfonamidas.

### 1.5.3 Grau de hidrofobicidade em proteínas – emprego da sonda ANS

A hidrofobicidade pode ser entendida como a aglomeração de solutos apolares em ambientes aquosos. Nas proteínas este conceito corresponde a porção superficial apolar que está em contato com a água circundante, e desta maneira, as interações hidrofóbicas são de

grande importância na conformação das proteínas, a qual pode ser determinada a partir da utilização de uma sonda hidrofóbica (CARDAMONE; PURI, 1992).

Em geral, as sondas mais utilizadas para avaliação espectrofluorimétrica da hidrofobicidade de diversas proteínas são sondas aniônicas da classe do ácido sulfônico aromático, como o 1-anilino-naftaleno-8-sulfonato (ANS), a sua forma dimérica (bis-ANS<sub>2</sub>) e o 6-p-toluidinilnaftaleno-2-sulfonato (TNS) (HASKARD; LI-CHAN, 1998). O ácido 1-anilino-naftaleno-8-sulfônico (ANS) é sensível a polaridade do ambiente, em meio aquoso apresenta baixa intensidade de fluorescência, entretanto, ao se ligar a regiões hidrofóbicas da proteína ocorre aumento da intensidade de emissão (ALI; AL-LOHEDAN, 2016). Desta forma, a sonda fluorescente ANS pode ser utilizada para monitorar possíveis alterações na superfície da proteína induzidas por mudanças na sua hidrofobicidade (RANJBAR et al., 2013). Quando um ligante é capaz de se ligar ao mesmo sítio do ANS, ele é deslocado e a intensidade de fluorescência é reduzida (SANTANA et al., 2019).

#### 1.5.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida é uma técnica simples que emprega a corrente elétrica para promover a separação de moléculas carregadas, como proteínas e ácidos nucleicos. A migração das macromoléculas ocorre por diferença de carga elétrica e por massa molar, de forma que moléculas menores migram mais rapidamente que as maiores, pode ser aplicada a proteínas com massas moleculares que variam de 10 a 10.000 kDa (DRESLER; KLIMENTOVA; STULIK, 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

Na separação eletroforética realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (*native-PAGE*), a qual foi utilizada neste trabalho, as proteínas da amostra são separadas de acordo com sua carga líquida nativa e sua massa molar sob condições não redutoras, ou seja, na ausência de agentes redutores como  $\beta$ -mercaptoetanol (reductor das ligações dissulfeto) e dodecil sulfato de sódio (adiciona carga negativa e atua como agente desnaturante) (PESIC et al., 2011). Nesta técnica a interação proteína-ligante é observada através de alterações no perfil de migração eletroforética da proteína, no qual um aumento ou redução na mobilidade eletroforética da macromolécula na presença do ligante em comparação com a proteína livre (controle) indica que ocorreu interação entre a proteína e o ligante e mudanças na superfície da macromolécula (TRNKOVÁ et al., 2011).

### 1.5.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica muito eficiente para obter informações acerca das interações proteína-ligante. Alguns parâmetros físicos podem ser empregados para estudar as interações de pequenas moléculas com proteínas em solução utilizando RMN tais como: as alterações do deslocamento químico ( $\delta$ ), as diferenças dos tempos de relaxação ( $T_1$ ), mudanças do efeito Overhauser nuclear (NOE) o qual é definido como a mudança na área do sinal proveniente de um núcleo causada pela saturação do sinal de um segundo núcleo. Essa alteração resulta da transferência de polarização entre núcleos acoplados dipolarmente via mecanismos de relaxação spin-rede ( $T_1$ ). Na espectroscopia de RMN macromolecular, os NOEs são amplamente empregados na determinação dos sítios ativos de ligação através da transferência de magnetização receptor-ligante (FIGUEIREDO; MARSAIOLI, 2007), e a diferença de transferência de saturação (STD), entre outros (BECKER et al., 2018).

O deslocamento químico ( $\delta$ ), foi o parâmetro utilizado neste trabalho, uma vez que é simples de se obter no processo de avaliação da interação proteína-ligante, o qual é expresso em partes por milhão (ppm) e corresponde à medida da diferença entre a frequência de ressonância entre a amostra ( $\nu$ ) e um padrão interno ( $\nu^0$ ). Neste estudo espectros de RMN de hidrogênio do ligante na ausência e na presença da proteína são comparados. Alterações do deslocamento químico do ligante após adição da macromolécula são utilizadas para identificar o sítio de ligação preferencial (CALA; GUILLIÈRE; KRIMM, 2014).

### 1.5.6 Avaliação da atividade antibacteriana

O uso inadequado de antibióticos na medicina humana e veterinária tem sido considerado um dos fatores que mais contribui para a resistência bacteriana, constituindo um sério problema de saúde pública global, ameaçando a segurança alimentar e a saúde dos seres humanos e animal (LOUREIRO et al., 2016; CANIÇA et al., 2019). Diversas classes de antibióticos podem formar complexos com íons metálicos, o que pode dificultar (ou aumentar) a atividade antibacteriana (POOLE, 2017). As tetraciclinas podem formar complexos com uma diversidade de íons metálicos como: Ca(II), Mg(II), Zn(II), Fe(II e III), Al(III), Cd(II), Co(II) e Pb(II) (PULICHARLA et al., 2017). As sulfonamidas podem formar complexos com íons metálicos como por exemplo, Cu(II), Zn(II) Co(II), Ni(II), e Cd(II) (ROCHA et al., 2011).

Complexos supramoleculares contendo ciclodextrinas e antibióticos podem aumentar a atividade antibacteriana destes medicamentos (WONG et al., 2017). Diante disto, avaliou-se a

atividade antibacteriana dos antibióticos das classes das tetraciclinas na ausência e na presença da proteína caseína. Os antibióticos da classe das sulfonamidas tiveram sua atividade antibacteriana testadas na ausência e na presença das proteínas caseína e lactalbumina. Neste estudo empregou-se a técnica de microdiluição em caldo que consiste na diluição consecutiva dos antibióticos frente aos microrganismos a serem testados, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (ALVES et al., 2008).

## **2 POR QUE REALIZAR ESTUDOS DE INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS ALIMENTARES E ANTIBIÓTICOS DE USO VETERINÁRIO?**

### **2.1 Justificativa**

Antibióticos das classes das tetraciclinas e das sulfonamidas são amplamente empregados como medicamentos de uso veterinário em animais produtores de alimentos, devido a seus amplos espectros de ação e baixos custos. Assim, seu uso indiscriminado pode resultar na presença de resíduos destes medicamentos nos alimentos derivados da vaca, como leite e carne, e dessa maneira, resultar em efeitos tóxicos e reações alérgicas aos consumidores. O leite é um alimento que pode ser utilizado de forma direta ou empregado na preparação de diversos alimentos, sendo distribuído em toda classe populacional. As proteínas caseína e lactalbumina, são alérgenos naturais presentes no leite e são amplamente empregadas na preparação de alimentos. Desta forma, a presença de antibióticos como tetraciclinas e sulfonamidas no leite pode interagir com a caseína e lactalbumina alterando suas estruturas nativas, o que pode potencializar a capacidade alergênica destas proteínas. Portanto, torna-se necessário o estudo da interação entre a caseína/ lactalbumina e tetraciclinas/sulfonamidas, visto a uma escassez de estudos de interação com proteínas alimentares e medicamentos de uso veterinário, logo faz-se necessário um entendimento mais aprofundado destes processos nas condições do alimento.

### **2.2 Contribuições deste trabalho para sociedade**

As contribuições deste trabalho para a sociedade estão pautadas na segurança alimentar com a conscientização aos produtores de leite para o uso racional dos medicamentos veterinários, visto que a exposição humana a resíduos destes compostos em alimentos como leite e derivados constituem um risco potencial para a saúde dos consumidores.

### 3 OBJETIVOS DA ETAPA 1

#### 3.1 Geral

Avaliação da interação entre a proteína majoritária do leite bovino caseína com os antibióticos da classe das tetraciclinas (tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina) simulando as condições do alimento (leite) visando investigar os principais aspectos que regem este processo de interação intermolecular *in vitro*.

#### 3.2 Específicos

- a)* Determinar a estequiometria dos complexos proteína-ligante, parâmetros de ligação ( $K_{SV}$ ,  $K_d$  e  $K_b$ ) e termodinâmicos ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S$ ), assim como, avaliação do mecanismo preferencial de *quenching*, mudanças na estrutura da proteína por UV-vis, fluorescência sincronizada e fluorescência tridimensional, e calcular as distâncias intermoleculares entre TC, OTC, CTC e caseína,
- b)* Avaliar a influência de espécies comuns presentes no leite no processo de interação entre caseína e tetraciclinas, além do índice de hidrofobicidade da proteína, e influência da temperatura de pasteurização;
- c)* Avaliar o efeito da interação entre caseína e tetraciclinas através do perfil de migração eletroforética (Native-PAGE);
- d)* Aplicar técnicas de RMN de  $^1H$  para avaliar o deslocamento químico para a molécula de tetraciclina (ligante selecionado como modelo) frente a caseína;
- e)* Avaliar a influência do processo de interação com a CAS nas propriedades antimicrobianas de TC, OTC e CTC frente a diferentes cepas bacterianas Gram positivas e Gram negativas.

## 4 EXPERIMENTAL GERAL

### 4.1 Reagentes e preparo das soluções

A caseína (*caseína sódica de leite de vaca*), a lactalbumina bovina, os antibióticos tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC), clorotetraciclina (CTC), sulfatiazol (STZ) e sulfametazina (SMZ), o ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato (ANS) e cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company (EUA). Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) foi obtido da Vetec (Brasil). Acetato de magnésio ( $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ), citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) e lactose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ) foram obtidos da Merck (USA) e empregados para os estudos de interação. A solução estoque da caseína ( $6,0 \mu\text{M}$ ) e da lactalbumina ( $20 \mu\text{M}$ ) foram preparadas em tampão fosfato ( $10 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 6,8$ ) e as soluções de trabalho a partir de diluições apropriadas. As concentrações de ambas proteínas foram determinadas pela aplicação da lei de Beer para absorção em  $280 \text{ nm}$  utilizando coeficiente de extinção molar de  $32920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (AUDIC & CHAUFER, 2005) para a caseína e de  $28540 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (CHAUDHURI & CHATTOPADHYAY, 2014) para a lactalbumina. A solução estoque das tetraciclinas (TC, OTC e CTC) foram preparadas pela dissolução direta em tampão fosfato ( $10 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 6,8$ ). A solução estoque das sulfonamidas ( $10 \text{ mM}$ ) (STZ e SMZ) foram preparadas pela dissolução direta de quantidade apropriada em DMSO em seguida, estocadas sob refrigeração a  $4^\circ \text{ C}$ . As soluções de trabalho dos antibióticos foram preparadas em tampão fosfato ( $10 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 6,8$ ). Em todos os experimentos foi utilizada água ultrapura ( $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ), a partir de um sistema de purificação Master System MS2000 (Gehaka, Brasil) para o preparo das soluções.

### 4.2 Procedimentos experimentais

#### 4.2.1 Espectroscopia de fluorescência molecular

As medidas de fluorescência molecular foram realizadas em espectrofluorímetro Shimadzu (modelo 5301PC, Japão) usando cubetas de quartzo de  $10 \text{ mm}$  de caminho óptico, altura de  $45 \text{ mm}$ , largura de  $12,5 \text{ mm}$  e profundidade de  $12,5 \text{ mm}$  com quatro faces polidas e volume de  $3,5 \text{ mL}$ . Para os ensaios empregando tetraciclinas foi medido o espectro de emissão de fluorescência da CAS ( $2,8 \mu\text{M}$ ) na ausência e na presença das tetraciclinas ( $1,40$  a  $84 \mu\text{M}$ ). No estudo de interação com as sulfonamidas a titulação espectrofluorimétrica foi realizada com CAS ( $2,5 \mu\text{M}$ ) e LAC ( $5,0 \mu\text{M}$ ) na ausência e na presença das sulfas ( $5,0$  a  $200 \mu\text{M}$ ). Em ambos casos, os espectros foram registrados de  $300$  a  $450 \text{ nm}$  empregando  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ . Para os

ensaios empregando CAS as fendas espectrais (*slits*) de excitação e emissão foram de 3 e 5 nm, e para os ensaios empregando LAC as fendas espectrais (*slits*) de excitação e emissão foram de 5 e 5 nm, respectivamente. As titulações foram realizadas nas temperaturas de 23, 30 e 37°C para obtenção dos parâmetros termodinâmicos do processo de interação proteína-ligante. A avaliação da influência da força iônica no meio foi efetuada à partir da variação da concentração de NaCl (0-100 mM).

Os resíduos dos aminoácidos Trp foram monitorados utilizando-se  $\Delta\lambda=60$  nm, enquanto para os resíduos de Tir se empregou  $\Delta\lambda=15$  nm (LOU et al., 2017). Para ambos os resíduos foi avaliado o processo de interação dentro da faixa espectral de 250 a 450 nm. As medidas foram realizadas na ausência e na presença dos ligantes, para as tetraciclinas a faixa avaliada foi (1,40 a 84  $\mu\text{M}$ ) e para as sulfonamidas (5,0 a 200  $\mu\text{M}$ ), e a concentração das proteínas CAS (2,5  $\mu\text{M}$ ) e LAC (5,0  $\mu\text{M}$ ).

Estudos empregando fluorescência tridimensional (3D) foram realizados para avaliar possíveis mudanças conformacionais nas estruturas secundárias das proteínas (LAGE et al., 2018). Para os estudos empregando os ligantes da classe das tetraciclinas, foram obtidos espectros de emissão em 3D da fluorescência intrínseca da CAS (2,5  $\mu\text{M}$ ) na ausência e na presença de TC, OTC e CTC a (25  $\mu\text{M}$ ). No caso dos ligantes (STZ e SMZ) os espectros de emissão em 3D da fluorescência intrínseca da CAS (2,5  $\mu\text{M}$ ) na ausência e na presença de STZ e SMZ a (25  $\mu\text{M}$ ) e da LAC (5,0  $\mu\text{M}$ ) e STZ e SMZ (50  $\mu\text{M}$ ) foram obtidos. Em ambos os casos, foram empregadas as faixas de comprimento de excitação de 220-380 nm e de emissão de 250-450 nm.

Para avaliação da distância intermolecular entre fluoróforo e *quencher* foram realizadas medidas de fluorescência molecular das proteínas CAS e LAC e do sistema proteína-ligante, bem como, o perfil de absorção molecular dos ligantes (tetraciclinas e sulfonamidas). Para o estudo empregando tetraciclinas as proporções da CAS e das TCs foi de 1:1, sendo a concentração empregada da CAS (2,5  $\mu\text{M}$ ) e das tetraciclinas (TC, OTC e CTC todas a 2,5  $\mu\text{M}$ ). Nos ensaios empregando sulfonamidas as proporções das proteínas CAS e LAC, e das sulfas foi de 1:5, sendo a concentração da CAS fixada em 2,5  $\mu\text{M}$ ) e das sulfonamidas (STZ e SMZ a 12,5  $\mu\text{M}$ ). Para a LAC a concentração utilizada foi de 5,0  $\mu\text{M}$  e as sulfonamidas (STZ e SMZ a 25  $\mu\text{M}$ ) (ROY et al., 2017).

O ensaio de competição com a sonda ANS foi realizado para avaliar os efeitos dos ligantes (tetraciclinas e sulfonamida) sobre a interação das proteínas (CAS e LAC) e inferir sobre sítios hidrofóbicos superficiais de ambas proteínas (SANTANA et al., 2019). Para os

estudos empregando tetraciclinas, foi realizada uma titulação do sistema CAS (5  $\mu\text{M}$ ) e ANS (60  $\mu\text{M}$ ) na presença de diferentes concentrações das tetraciclinas avaliadas (0 - 60  $\mu\text{M}$ ). No ensaio empregando sulfonamidas a titulação do sistema Caseína (5  $\mu\text{M}$ ) e lactalbumina (5  $\mu\text{M}$ ) e ANS (60  $\mu\text{M}$ ) foi realizada na presença de diferentes concentrações das sulfas STZ e SMZ (0 - 30  $\mu\text{M}$ ). Para o sistema CAS-ANS empregou-se  $\lambda_{\text{ex}} = 392$  nm empregando *slits* de excitação e emissão igual a 5 e 5 nm, respectivamente. Para o sistema LAC-ANS utilizou-se,  $\lambda_{\text{ex}} = 361$  nm para o sistema empregando *slits* de excitação e emissão igual a 10 e 5 nm, respectivamente.

O estudo de competição em ambas as etapas foi realizado simulando as condições do leite. Neste experimentos se empregou Ca(II) (62,5  $\mu\text{M}$ ), Mg(II) (11,3  $\mu\text{M}$ ), citrato (20  $\mu\text{M}$ ) e lactose (295  $\mu\text{M}$ ) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; KALYANKAR et al., 2016). Para os íons Fe(III), foi utilizada a concentração estimada (1,0  $\mu\text{M}$ ) a partir do rótulo de leite comercial enriquecido com este mineral.

#### 4.2.2 Espectroscopia de absorção molecular (UV-vis)

As medidas de absorção molecular foram realizadas em um espectrofotômetro Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) com duplo feixe equipado com cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm e 3,5 mL de volume. Os espectros de absorção molecular da CAS (2,5  $\mu\text{M}$ ) e das tetraciclinas livres (2,5  $\mu\text{M}$ ), e dos respectivos complexos proteína-ligante foram obtidos. Para a avaliação da interação com as sulfas os espectros de absorção molecular da CAS (5,0  $\mu\text{M}$ ), LAC (5,0  $\mu\text{M}$ ) e das sulfonamidas livres (12,5  $\mu\text{M}$ ) foram monitorados. Nos dois casos, os espectros das macromoléculas e dos complexos proteína-ligante foram registrados no intervalo de 220-450 nm.

#### 4.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (Native PAGE)

O ensaio eletroforético (PAGE nativa) foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira da Universidade Federal de Alagoas (Maceió, AL - Brasil). Foi empregando gel de poliacrilamida a 12% (m/m), o pH das amostras foi fixado em 6,8; a concentração da CAS foi mantida constante (27  $\mu\text{M}$ ), enquanto as tetraciclinas foram avaliadas em dois níveis de concentração, 6,75 e 13,5 mM. As amostras foram analisadas sob condições não-redutoras a uma tensão constante (85 V) usando o sistema Mini Protean<sup>®</sup> (Tetra Cell, Bio Rad). O gel sem desnaturação foi realizado na ausência de dodecilsulfato de sódio (SDS) e

agente redutor (DANTAS et al., 2017). Os marcadores de massa molecular das proteínas (Jena Bioscience) foram empregados nos experimentos.

#### 4.2.4 Interação proteína-ligante por RMN $^1\text{H}$

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das diferentes tetraciclinas na ausência e na presença da CAS foram obtidos por meio de um espectrômetro Bruker 400 MHz ( $B_0 = 9,4\text{T}$ ) equipado com sonda de detecção indireta de 5 mm (WANG, Y et al., 2013). As soluções estoques da CAS e tetraciclina (0,5 mM) foram preparadas em tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$  a 99,9%). Para análise, mante-se fixa a concentração da tetraciclina (0,5 mM) e variou-se a CAS (5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ ), utilizando 10  $\mu\text{L}$  de trimetilsililpropionato de sódio (TMSP) a 2,5 mM como padrão interno, para um volume final de 600  $\mu\text{L}$ .

#### 4.2.5 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003), com modificações, em colaboração com o Prof. Dr. Osmar Nascimento Silva da Universidade Católica Dom Bosco (Campo Grande, MS - Brasil). As tetraciclinas na presença e ausência da caseína, e as sulfonamida na ausência e na presença das proteínas (CAS e LAC) foram testados contra as cepas de *E. coli* ATCC8739 e *S. aureus* ATCC25923. Primeiramente as células foram semeadas em ágar Müller-Hinton (MH) por 24 h a 37°C, para isolamento das colônias. As placas com as colônias isoladas foram armazenadas em geladeira por no máximo sete dias. Uma colônia isolada foi colocada para crescer em 5,0 mL de caldo MH sob agitação durante 18 h a 37°C. A concentração celular foi determinada pela medida da densidade óptica (D.O.) e a mesma foi ajustada para  $1 \times 10^5$  células a cada 50  $\mu\text{L}$ . Foram realizadas diluições seriadas de cada sistema em um volume de 50  $\mu\text{L}$ , em seguida, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana contendo  $1 \times 10^5$  células na metade da fase logarítmica de crescimento em cada poço. As amostras foram incubadas por 24 h a 37°C, em um leitor de microplaca com agitação constante (Bio-Tek PowerWave HT - USA). O crescimento bacteriano foi avaliado por medidas da absorvância a 595 nm a cada 30 min. A menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento bacteriano foi definida como a concentração inibitória mínima (CIM).

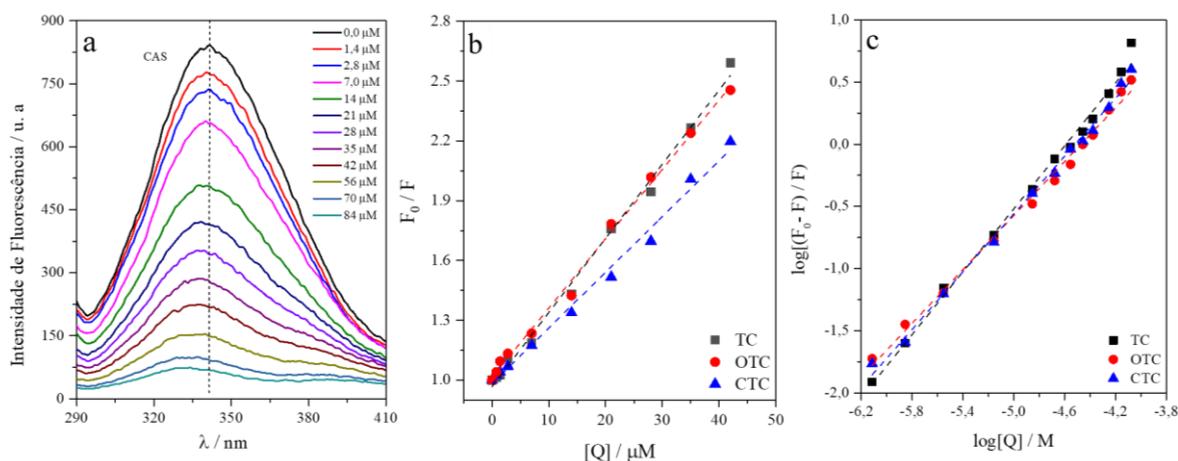
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO (Etapa 1) - AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA CASEÍNA, PROTEÍNA ALERGÊNICA DO LEITE, COM TETRACICLINAS EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E ELETROFORESE.

Nesta etapa do trabalho foi realizada uma avaliação sistemática da interação *in vitro* da proteína alimentar caseína com medicamentos veterinários, levando em consideração o efeito da variação estrutural dos antibióticos (TC, OTC e CTC) nos parâmetros de ligação, termodinâmicos e alterações conformacionais da CAS, as quais, podem levar a potencialização da capacidade alergênica desta proteína.

### 5.1 Mecanismo de interação e parâmetros termodinâmicos

A interação entre TC, OTC e CTC e a CAS, foi avaliada utilizando titulação espectrofluorimétrica no estado estacionário com base na fluorescência intrínseca da proteína (KHAN et al., 2012). O espectro de fluorescência da CAS na ausência e na presença de quantidades crescentes de TC é mostrado na Figura 1a. Perfis similares foram obtidos para OTC e CTC e estão apresentadas no APÊNDICE A (pág. 75).

**Figura 1 - a) Perfil espectral da titulação espectrofluorimétrica da CAS (2,8  $\mu\text{M}$ ) com TC, b) Linearização da equação de Stern-Volmer, c) Linearização para cálculo da constante de ligação ( $K_b$ ) e número de sítios de ligação ( $n$ ). Condições: tampão fosfato 10 mM a pH = 6,8 e 30°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

As subunidades da caseína micelar  $\alpha_{S1}$ -caseína e  $\alpha_{S2}$ -caseína possuem, cada uma, dois resíduos de Trp nas posições 164/199 e 109/193, respectivamente, enquanto que as subunidades  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína, apresentam um resíduo de Trp nas posições 143 e 73, respectivamente (DEZHAMPANAH et al., 2017; YAZDI & CORREDIG, 2012). Dentre os aminoácidos aromáticos, os resíduos de Trp são os principais responsáveis pela fluorescência intrínseca da proteína. Adicionalmente, a CAS possui um total de 34 resíduos de tirosina (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A caseína apresentou uma banda intensa e larga em 342 nm quando excitada a 280 nm, após adição de TC ao sistema ocorreu diminuição da intensidade de fluorescência e variação do comprimento de onda do máximo de emissão de 342 para 334 nm. A redução da intensidade do sinal e o deslocamento do comprimento de onda máximo para o azul foi atribuído a mudanças conformacionais na estrutura da proteína (LI et al, 2016). Para avaliar o mecanismo de interação entre a CAS e as tetraciclinas a equação de Stern-Volmer foi aplicada:

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

onde  $F_0$  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 ( $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $\tau_0$  é o tempo de vida médio ( $10^{-8} \text{ s}$ ),  $[Q]$  é a concentração do ligante (*quencher*) e  $K_{sv}$  é a constante de *quenching* de Stern-Volmer (BRANDÃO et al., 2017). A constante de ligação  $K_b$  foi calculada de acordo com a equação 2:

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

em que  $K_b$  é a constante de ligação,  $n$  o número de sítios de ligação na proteína (CHEN et al., 2015). As Figuras 1b e 1c mostram a linearização das equações (1) e (2), respectivamente, para calcular os parâmetros de ligação relacionados a  $K_{sv}$ ,  $K_b$  e  $n$  quanto a formação do complexo supramolecular formado em diferentes temperaturas (23, 30 e 37 °C). Os resultados deste estudo estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1 - Parâmetros de ligação e parâmetros termodinâmicos da interação da CAS com tetraciclinas em diferentes condições de temperatura.**

Ligante	T (°C)	Constante de Stern-Volmer			Constante de ligação			Parâmetros termodinâmicos		
		$K_{SV}$ ( $10^4 M^{-1}$ )	r	$K_q$ ( $10^{12} M^{-1} s^{-1}$ )	$K_b$ ( $10^6 M^{-1}$ )	N	R	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
TC	23	6,97 ± 0,05	0,9741	6,97	1,40 ± 0,06	1,31 ± 0,05	0,9889	- 27,42	- 15,57	+ 40,05
	30	5,87 ± 0,04	0,9873	5,87	1,23 ± 0,05	1,31 ± 0,02	0,9910	- 27,70		
	37	5,24 ± 0,05	0,9975	5,24	0,25 ± 0,04	1,12 ± 0,04	0,9883	- 27,99		
OTC	23	6,47 ± 0,04	0,9531	6,47	0,12 ± 0,03	1,09 ± 0,03	0,9971	- 28,85	- 91,58	- 211,94
	30	5,88 ± 0,02	0,9868	5,88	0,05 ± 0,02	1,01 ± 0,04	0,9964	- 27,36		
	37	5,76 ± 0,02	0,9863	5,76	0,02 ± 0,04	0,94 ± 0,04	0,9902	- 25,88		
CTC	23	4,77 ± 0,02	0,9798	4,77	0,39 ± 0,06	1,19 ± 0,06	0,9874	- 31,71	- 64,97	- 112,35
	30	4,61 ± 0,03	0,9771	4,61	0,22 ± 0,05	1,14 ± 0,05	0,9883	- 30,93		
	37	3,91 ± 0,04	0,9947	3,91	0,12 ± 0,05	1,08 ± 0,05	0,9843	- 30,14		

Legenda: TC = tetraciclina / OTC = oxitetraciclina / CTC = clorotetraciclina / T = temperatura /  $K_{SV}$  = Constante de Stern-Volmer /  $K_q$  = constante de velocidade de *quenching* bimolecular difusional / r = coeficiente de correlação / n = número de sítios de ligação /  $\Delta G$  = energia livre de Gibbs /  $\Delta H$  = variação de entalpia /  $\Delta S$  = variação da entropia.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Segundo Albani (2007), o perfil exponencial do gráfico de Stern-Volmer (Figura 1b) indica que todos os resíduos de Trp da caseína estão acessíveis as tetraciclinas ou a fluorescência da proteína é dominada por um único resíduo. O processo de *quenching* dinâmico é caracterizado quando os valores de  $K_{SV}$  aumentam com a temperatura, pois, temperaturas mais elevadas levam a um maior coeficiente de difusão e, desta forma, maior número de colisões entre o fluoróforo (proteína) e o *quencher* (tetraciclinas). Porém, quando os valores de  $K_{SV}$  diminuem com o aumento da temperatura, é um indicativo de *quenching* estático, uma vez em temperaturas mais elevadas a estabilidade do complexo fluoróforo-*quencher* é afetada, neste caso particular, o complexo proteína-ligante. De acordo com os resultados (Tabela 1), os valores da constante de *quenching* ( $K_{SV}$ ) diminuíram com o aumento da temperatura independente do ligante. Desta forma, o processo de interação entre as três tetraciclinas e a CAS ocorreu preferencialmente através do mecanismo de *quenching* estático (ARROYO-MAYA et al., 2017). Adicionalmente, foram calculados os valores de  $K_q$  e se observou que todos são maiores que  $2,0 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  confirmando o *quenching* estático (ABDELHAMEED et al., 2017).

Os valores da constante de ligação ( $K_b$ ) da CAS com um ligante específico, e o número de sítios ocupados ( $n$ ) pelo ligante na estrutura da proteína são parâmetros importante para o estudo da interação proteína-ligante. Os valores de  $K_b$  (Tabela 1) variaram de  $0,12$  a  $1,40 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , para a OTC e TC, respectivamente a  $23^\circ\text{C}$ . Assim, a interação entre a CAS e as tetraciclinas seguiu a seguinte ordem de afinidade:  $\text{TC} > \text{CTC} > \text{OTC}$ . Esses valores foram maiores quando comparados com outros estudos de interação com tetraciclinas e outras proteínas, por exemplo, Bi et al. (2016), estudou a interação entre TC com  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -lactalbumina por técnicas espectroscópicas, obtendo valores de  $K_b$  de  $1,34$  a  $4,07 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Dantas et al. (2017), avaliaram a interação entre ovalbumina com TC, OTC e CTC, e os valores de  $K_b$  variaram de  $2,11$  a  $58,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Estes resultados indicam que as tetraciclinas possuem maior afinidade pela caseína quando comparada a outras proteínas alimentares como  $\beta$ -caseína, e  $\alpha$ -lactalbumina e ovalbumina. O número de sítios de ligação em todas as condições foi próximo à unidade, indicando que a existência de apenas um sítio de ligação preferencial na estrutura do sistema proteico.

Adicionalmente, são apresentados na Tabela 2 os valores das constantes de ligação referentes a interação de diferentes caseínas com outros ligantes, e observa-se que a CAS possui maior afinidade pelas tetraciclinas nas condições avaliadas.

**Tabela 2 – Comparação de trabalhos na literatura com diferentes proteínas do leite**

Ligante	Caseína	pH	K <sub>b</sub> (10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup> )	Houve alteração da estrutura nativa da proteína?	Forças de interação	Referência
Epigallocatequina-3-galato	α-CAS	7,0	0,84	-	Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas	Bohin et al., 2014
Procianidinas	β-CAS		1,39			
	α-CAS		0,18			
	β-CAS		0,21			
Naringerina	β-CAS	7,0	28,7	-	Forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas	Moeiniafshari et al., 2015
Tetraciclina	β-CAS	6,6	1,72	Sim. A porcentagem de α-hélice foi reduzida.	Interações eletrostáticas.	Bi et al., 2016
	α-LAC		0,09		Forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio,	
β-caroteno	α-CAS	7,0	1,57	Sim. A conformação da proteína tornou-se menos enovelada.	Forças de Van der Waals	Allahdad et al., 2018
	β-CAS		0,04	Sim. A estrutura da proteína tornou-se mais dobrada.		
	K-CAS		3,01	Sim. A conformação da proteína tornou-se menos enovelada.		
Diacetilcurcumina	β-CAS	7,0	4,40	Sim	Interações hidrofóbicas	Mehranfar, 2013
Antocianinas ( <i>Aornia mealnocarpa</i> )	β-CAS	-	0,05	Sim	Interações hidrofóbicas	Wei et al., 2018
TC			123		Interações eletrostáticas	
OTC	CAS micelar	6,8	5,00	Sim	Ligações de hidrogênio e Forças de Van der Waals	Este trabalho
CTC			22,0			

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

A partir dos valores de  $K_b$  obtidos em diferentes temperaturas foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos e assim, determinar as principais forças envolvidas na interação entre CAS e as diferentes tetraciclinas, além de verificar a espontaneidade do processo de interação. A ligação de pequenas moléculas com proteínas ocorre geralmente através de interações não-covalentes como interações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligação de hidrogênio e forças de Van der Waals. Considerando que não ocorra variação significativa da capacidade calorífica do sistema estas forças podem ser avaliadas a partir dos parâmetros termodinâmicos (BARRECA et al., 2017; MONDAL et al., 2017), os quais foram calculados de acordo com a linearização da equação de Van't Hoff (RABBANI et al., 2017), e estão apresentados no APÊNDICE B (Pág. 76).

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

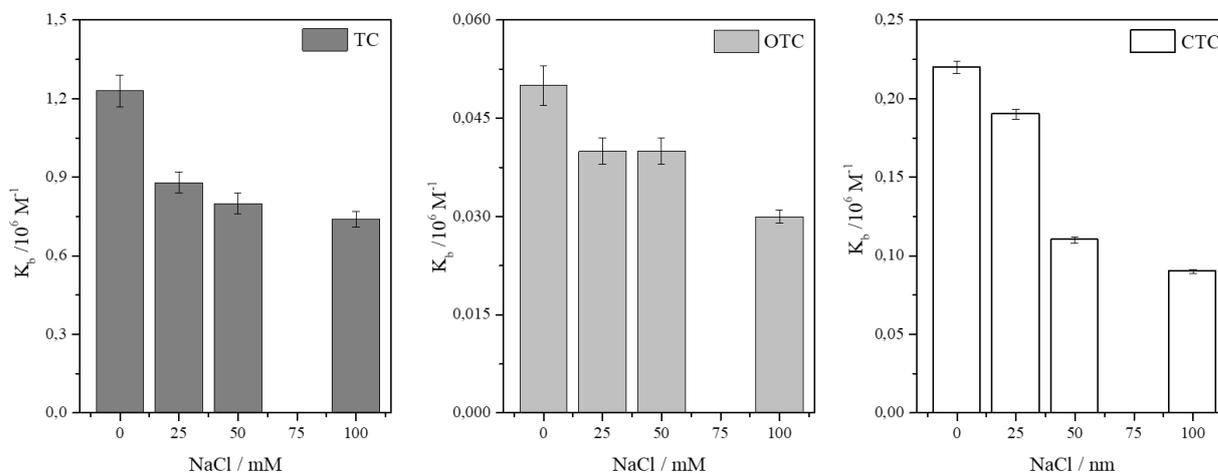
onde T é a temperatura em Kelvin (K) e R é a constante do gás ideal. A energia livre de Gibbs foi calculada pela equação (4):

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

Considerando os valores negativos de  $\Delta G$  obtidos (Tabela 1, pág. 43) o processo de interação avaliado foi termodinamicamente espontâneo para todas as tetraciclinas. A principal relação entre as forças envolvidas no processo de interação e os valores de variação de entalpia e entropia são:  $\Delta H > 0$  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) (POURESCHI et al., 2017). Sistemáticamente, os valores de  $\Delta H$  foram negativos, indicando processos de interação exotérmico para todas as tetraciclinas. As interações eletrostáticas são responsáveis por estabilizar o complexo formado entre TC e CAS, uma vez que  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S > 0$ , enquanto para OTC e CTC com a proteína avaliada as interações ocorrem preferencialmente por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, em razão de  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$ .

A influência da força iônica foi avaliada para confirmar as interações eletrostáticas que atuam na ligação CAS-tetraciclinas, uma vez que o aumento da força iônica do meio leva ao desfavorecimento da interação entre as cargas (LIANG; CHENG; HAN, 2008). Para avaliar este processo entre CAS e as tetraciclinas selecionadas foi avaliada a variação de  $K_b$  em função da concentração de NaCl (0-100 mM) no meio (Figura 2).

**Figura 2 - Efeito do NaCl (0 -100 mM) na interação do complexo CAS-tetraciclinas pH = 6,8 (tampão fosfato 10 mM) a 30°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

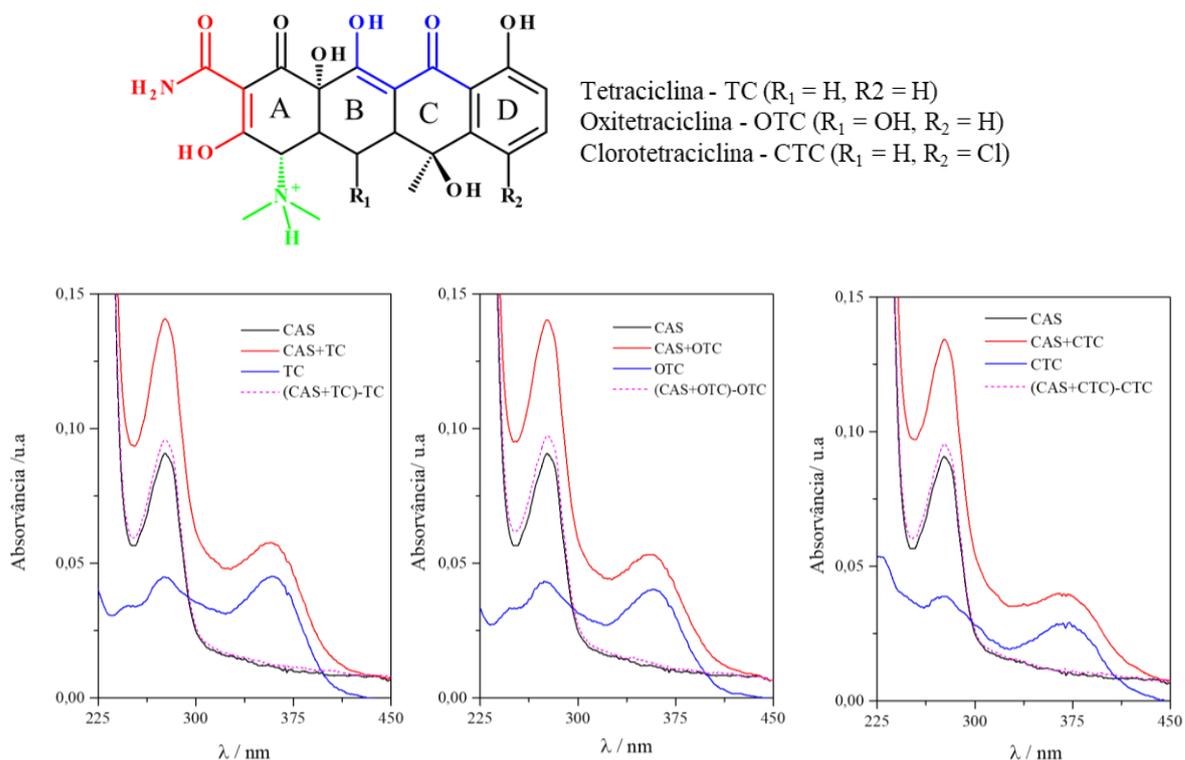
A partir dos resultados (Figura 2) foi possível observar que com o aumento da força iônica houve uma diminuição da constante de ligação independente da tetraciclina adicionada em relação a condição na ausência de NaCl. Confirmando que os complexos tetraciclinas-CAS também são estabilizados por interações eletrostáticas. Este comportamento pode estar relacionado com às forças atrativas das tetraciclinas que, em pH 6,8 tem preferencialmente carga neutra (HSU et al., 2018) e a micela da CAS apresenta-se superficialmente carregada negativamente (KALYANKAR et al., 2016).

## 5.2 Avaliação do processo de interação por UV-vis

A técnica de espectroscopia de absorção UV-vis pode ser empregada para avaliar alterações na estrutura  $\alpha$ -hélice da proteína, detectar a formação de complexos proteína-ligante, além de poder determinar o mecanismo de *quenching* (RANJBAR et al., 2013) Desta forma, para observar possíveis alterações na estrutura da caseína na presença de diferentes tetraciclinas, e a formação de complexos CAS-tetraciclinas realizou-se estudos por UV-vis. Neste estudo, avaliou-se o efeito da adição das três tetraciclinas (TC, OTC e CTC) a CAS. Os resultados estão apresentados nas Figura 3.

As tetraciclinas possuem duas regiões cromóforas; a primeira está localizada no anel A e a segunda nos anéis BCD, levando a três bandas de absorção de UV, em 365, 270 e 217 nm, respectivamente, conforme representado na Figura 3. A transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  sobre o anel tricarbônico (sistema A) contribui apenas para a banda de absorção a 270 nm, enquanto a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  do cromóforo BCD contribui para todas as outras bandas de absorção (KANG et al., 2011).

**Figura 3 - Estudo de UV-vis do processo de interação das tetraciclínas com a CAS. Condições: CAS (2,5  $\mu$ M), tetraciclínas (2,5  $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

A absorção da CAS é devida aos resíduos de triptofano e tirosina, principalmente, e estes aminoácidos preferencialmente apresentam transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Quando a CAS é adicionada ao meio contendo as tetraciclínas, um aumento nas bandas de absorção em 277 e 374 nm ocorre devido à formação do complexo proteína-ligante. Por meio dos estudos por UV-vis (Figura 3) observou-se que a adição de TC a caseína (CAS + TC) resultou num aumento da intensidade de absorvância (efeito hiperacrômico) acompanhado de um deslocamento para menores comprimentos de onda em comparação ao espectro da CAS livre, o qual sugere mudanças conformacionais no esqueleto polipeptídico da proteína após interagir com a tetraciclina (LOU et al., 2017). Também foi possível verificar que o espectro de absorção resultante da subtração do espectro do complexo supramolecular e da TC livre [(CAS + TC) - TC] não é sobreponível ao espectro da TC livre, o qual confirma a formação de complexo entre CAS e TC, e corrobora para o mecanismo de interação por *quenching* estático (MAKARSKA-BIALOKOZ, 2018). Estes resultados concordam com os resultados obtidos através dos estudos por fluorescência molecular. Resultados similares foram obtidos para OTC e CTC sumarizadas nas Figuras 3b e 3c. Na Tabela 3 estão apresentadas as variações dos valores de absorvâncias.

**Tabela 3 - Valores de absorvância para TC, OTC e CTC e complexos CAS-tetraciclinas. Condições: CAS (2,5 µM), TC, OTC e CTC (2,5 µM), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C.**

Ligante	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$A_{\text{ligante}}$	$A_{\text{proteína}}$	Comparação		
				$A_{\text{ligante}} + A_{\text{proteína}}$	$A_{\text{complexo}}$	$\Delta A^*$
TC	277 (P)	0,045	0,091	0,136	0,141	+ 0,005
	360 (L)	0,045	0,012	0,057	0,012	+ 0,045
OTC	277 (P)	0,043	0,090	0,133	0,140	+ 0,007
	360 (L)	0,040	0,012	0,052	0,012	+ 0,040
CTC	277 (P)	0,039	0,091	0,130	0,134	+0,040
	372 (L)	0,029	0,010	0,039	0,011	+0,028

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

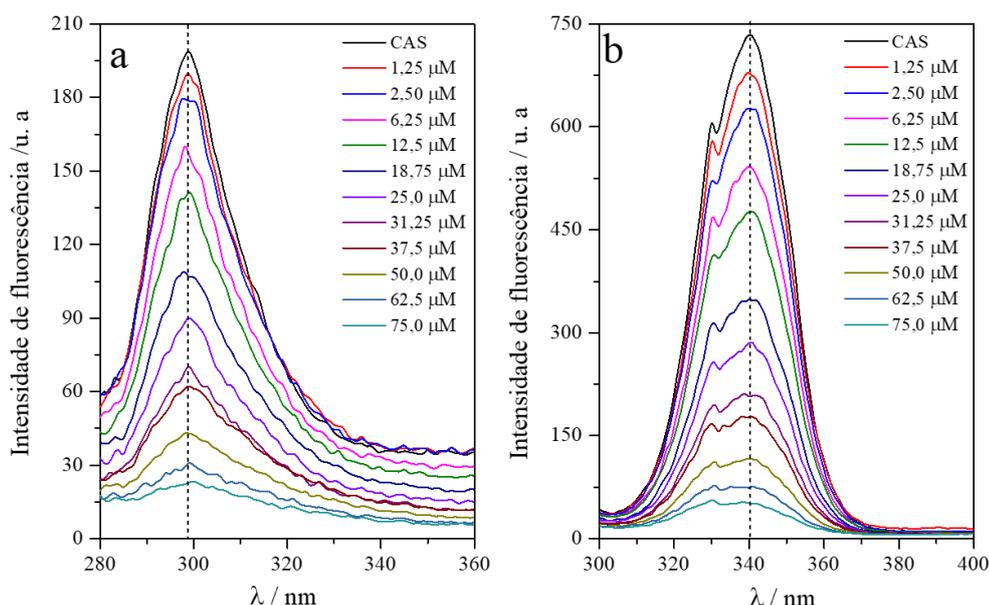
Fonte: elaborado pela autora, 2019.

### 5.3 Avaliação de mudanças conformacionais na estrutura da proteína

#### 5.3.1 Fluorescência sincronizada

Estudos por fluorescência sincronizada foram realizados para observar mudanças na polaridade do microambiente dos fluoróforos (Tir e Trp) presentes na CAS na ausência e na presença das tetraciclinas. Diferenças entre os comprimentos de onda de excitação e de emissão são utilizados como parâmetros para avaliar mudanças na polaridade em torno dos resíduos de tirosina e triptofano. Quando um  $\Delta\lambda$  entre o comprimento de excitação e emissão é igual a 15 nm fornece informações acerca do resíduo de Tir, enquanto quando  $\Delta\lambda = 60$  nm corresponde ao resíduo de Trp (SIDDIQI et al., 2017). A constante Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) nas diferentes condições foi utilizada como parâmetro de avaliação. Os resultados para a TC são apresentados na Figura 4. Resultados similares foram obtidos para OTC e CTC no processo de interação e estão apresentadas no APÊNDICE C (pág. 77).

**Figura 4 - Efeito da adição da TC (0 - 84 µM) no espectro de fluorescência sincronizada da CAS (2,5 µM) a 30 °C. (a)  $\Delta\lambda = 15$  nm e (b)  $\Delta\lambda = 60$  nm.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

A partir destes estudos observou-se que não houve variação do máximo de emissão para o resíduo de Tir independente da tetraciclina avaliada. No entanto, ocorreu mudança no máximo de emissão para o resíduo de triptofano da CAS (+2 nm) para TC e CTC. Estes resultados mostraram que as tetraciclinas avaliadas alteraram a estrutura da CAS quando comparada com a estrutura nativa. Desta forma, os resíduos de Trp da CAS tornaram-se expostos a um microambiente mais polar após a interação com TC e CTC (BYADAGI et al., 2017). Por fim, a CTC apresentou os maiores valores de  $K_{SV}$  (Tabela 4), possivelmente devido a uma maior alteração da conformação da CAS em comparação as tetraciclinas avaliadas.

**Tabela 4 - Constante de Stern-Volmer no estudo de fluorescência sincronizada.**

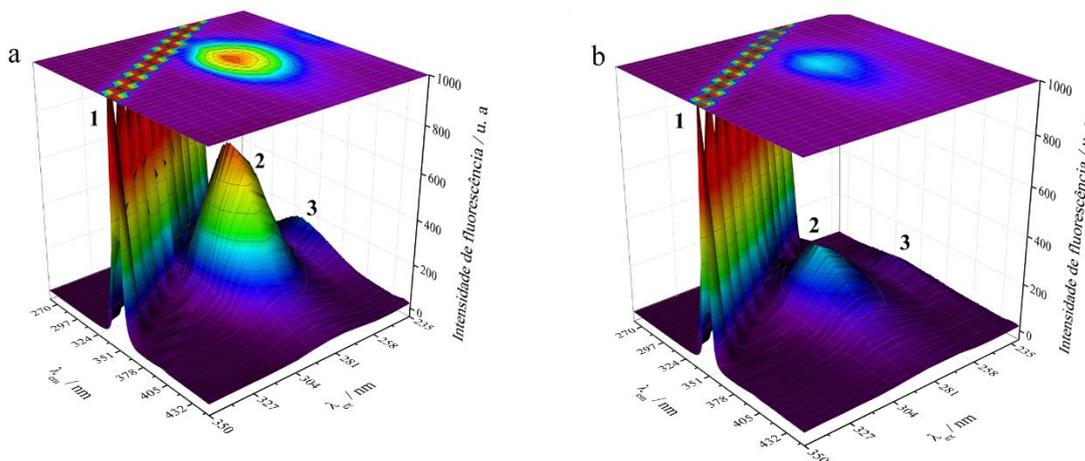
TC			OTC		CTC	
$\Delta\lambda$ (nm)	$K_{SV}$ ( $10^4 M^{-1}$ )	Variação do $\lambda_{max}$ (nm)	$K_{SV}$ ( $10^4 M^{-1}$ )	Variação do $\lambda_{max}$ (nm)	$K_{SV}$ ( $10^4 M^{-1}$ )	Variação do $\lambda_{max}$ (nm)
15	$5,14 \pm 0,04$	0	$5,64 \pm 0,05$	0	$5,80 \pm 0,06$	0
60	$5,67 \pm 0,01$	+2	$5,78 \pm 0,02$	0	$6,03 \pm 0,03$	+2

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

### 5.3.2 Fluorescência tridimensional (3D)

Para avaliar mudanças na conformação da estrutura secundária da CAS induzidas pela interação com as tetraciclinas realizou-se estudos por fluorescência tridimensional na ausência e na presença dos ligantes simulando as condições do leite (pH 6,8) (WANG et al., 2015). Os resultados para a TC estão apresentados na Figura 5. Resultados similares foram obtidos para OTC e CTC (APÊNDICE D, pág. 78). Os parâmetros relacionados aos espectros 3D obtidos referentes à posição e intensidade dos picos de máxima emissão de fluorescência e efeito Stokes para interação entre CAS e as três tetraciclinas estão sumarizados na Tabela 5.

**Figura 5 - Espectros de fluorescência tridimensional (3D) para (a) CAS (2,5  $\mu$ M), (b) CAS + TC (25  $\mu$ M) em tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C.**



Legenda: 1 = dispersão Rayleigh, 2 = emissão dos resíduos de Trp e Tir e 3 = fluorescência de excitação dos estados eletrônicos mais excitados dos resíduos de aminoácidos aromáticos na proteína.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Os gráficos de fluorescência 3D da CAS livre e após a adição de TC apresentou três picos. O pico 1 corresponde à dispersão Rayleigh, caracterizada pela re-emissão de radiação ( $\lambda_{ex} = \lambda_{em}$ ) pelo solvente. O pico 2 corresponde a emissão dos resíduos de Trp e Tir (LI et al., 2015; SHARMA et al., 2014), e o terceiro pico, que tinha sido creditado a emissão do esqueleto polipeptídico da proteína, foi recentemente contradito. O pico 3 também foi atribuído à fluorescência de excitação dos estados eletrônicos mais excitados dos resíduos de aminoácidos aromáticos na proteína (BORTOLOTTI et al., 2016; DAS et al., 2019).

De acordo com os resultados (Figura 5) houve redução na intensidade de fluorescência dos picos 2 e 3 para da CAS independente da tetraciclina adicionada. Após a adição de TC, as intensidades de fluorescência dos picos 2 e 3 foram reduzidas em 58 e 51%, respectivamente, indicando mudanças no microambiente dos resíduos Tir e Trp e modificação na estrutura nativa da proteína (SURYAWANSHI et al., 2016). Mudanças espectrais similares foram observadas nos espectros 3D para CAS na presença de OTC e CTC e estão sumarizadas no APÊNDICE D (pág. 78). Para a OTC os picos 2 e 3 foram reduzidos em 46 e 41%, respectivamente. No caso da CTC, os picos 2 e 3 foram reduzidos em 59 e 60%, respectivamente.

**Tabela 5 - Parâmetros relacionados a fluorescência 3D para interação entre CAS e tetraciclinas avaliadas. Condições: CAS (2,5  $\mu$ M), TC, OTC e CTC (25  $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C.**

Proteína	Ligante	Pico	Posição ( $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ )	Deslocamento Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	Intensidade de fluorescência (u. a)
CAS	-	1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-
		2	285 / 339	54	653 (100%)
		3	238 / 338	100	186 (100 %)
	TC	1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-
		2	285 / 339	54	277 (58%)
		3	238 / 334	96	91 (51%)
	OTC	1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-
		2	285 / 338	53	354 (46%)
		3	238 / 338	100	109 (41%)
	CTC	1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-
		2	285 / 339	54	270 (59%)
		3	238 / 338	100	76 (60%)

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Por fim, através dos estudos empregando fluorescência sincronizada e 3D, foi possível observar que ocorreu alterações na estrutura nativa da CAS após interação com as tetraciclinas, o que pode potencializar possíveis reações alérgicas para os consumidores deste alimento.

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

Estudos de FRET foram empregados para determinar a distância entre os resíduos de triptofano da CAS (doador) e as TC, OTC e CTC (receptores) no processo de transferência de energia em função da interação. A distância ( $r_0$ ) entre o doador e o receptor pode ser calculada utilizando a equação (5):

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

onde  $F_0$  e  $F$  são a intensidade de fluorescência do doador na ausência e na presença do ligante, respectivamente,  $E$  é a fração de energia transferida do doador para o receptor,  $r_0$  é a distância entre o ligante e o doador, e  $R_0$  é distância crítica, quando 50% da energia de emissão do doador é transferida para o receptor. A distância crítica ( $R_0$ ) é descrita como:

$$R_0^6 = \frac{8.8 \times 10^{-12} k^2 \Phi J}{N^4} \quad \text{equação (6)}$$

sendo  $k^2$  a orientação dipolo do doador e do receptor,  $N$  é o índice de refração médio,  $\Phi$  é o rendimento quântico de fluorescência da proteína e  $J$  representa a área de sobreposição do espectro de emissão normalizado do doador em relação ao espectro de absorção de receptor. Neste caso,  $K^2 = 2/3$ ,  $N = 1,53$  e  $\Phi = 1,49$  para caseína (MEHRANFAR et al., 2013). A área de sobreposição ( $J$ ) pode ser calculada pela equação:

$$J = \frac{\sum F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda)\Delta\lambda} \quad \text{equação (7)}$$

Nesta equação,  $F(\lambda)$  é a fluorescência do doador, e  $\varepsilon(\lambda)$  é o coeficiente de absorção molar do receptor, que pode ser obtido através da lei de Beer (WANG et al., 2017). Inicialmente, foi avaliada a área de sobreposição dos espectros de fluorescência da CAS livre e o espectro de absorção molecular da TC, OTC e CTC, a área de sobreposição espectral entre CAS e as tetraciclinas está apresentado na Figura 6. Os parâmetros calculados relacionados ao processo de FRET estão apresentados na Tabela 6.

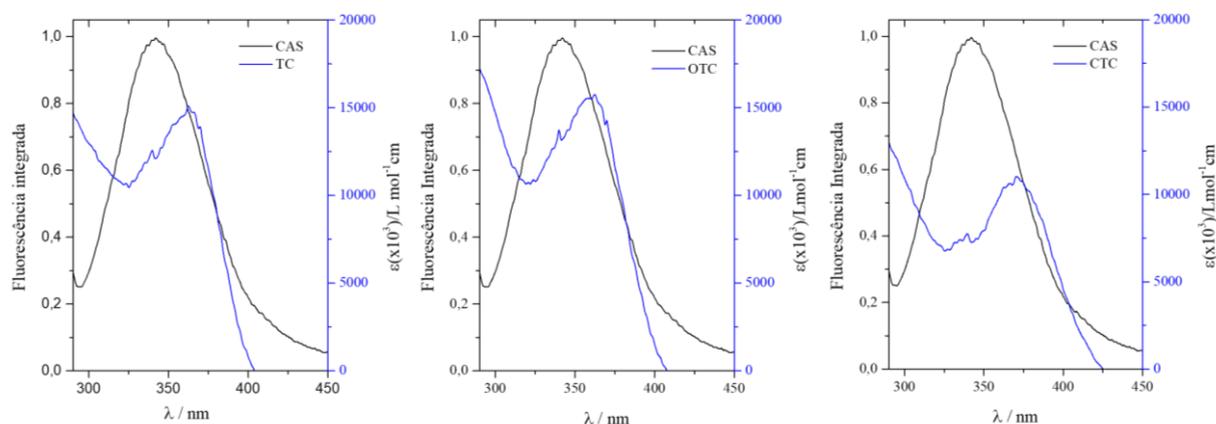
**Tabela 6 - Parâmetros de FRET da interação entre tetraciclinas e CAS.**

Ligante	$J$ ( $10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	E (%)	$R_0$ (nm)	$r_0$ (nm)
TC	1,42	9,4	2,47	3,60
OTC	1,53	7,0	2,50	3,85
CTC	1,13	4,1	2,38	4,02

Legenda:  $J$  = área de sobreposição do espectro de emissão normalizado doador em relação espectro de absorção do receptor -  $E$  = fração de energia transferida do doador para o receptor-  $R_0$  = distância crítica quando 50% da energia de emissão do doador é transferida para o receptor -  $r_0$  = distância entre o ligante e o doador.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

**Figura 6 - Sobreposição espectral da emissão de fluorescência da CAS com o espectro de absorção de TC, OTC e CTC. Condições: CAS (2,5  $\mu$ M), TC, OTC e CTC (2,5  $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH = 6,8 e 30°C,  $\lambda_{ex}$  = 280 nm.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 6), a energia transferida (E) variou de 4,1% a 9,4%, indicando que menos de 50% de energia foi transferida, o que implica que  $R_0 < r_0$ . Os valores das distâncias de  $r_0$  da TC, OTC e CTC variaram de 3,60 a 4,02 nm. A TC apresentou os maiores valores de  $K_b$  e menor distância crítica, indicando elevada afinidade com a CAS. Assim, a distância crítica  $r_0$  entre as tetraciclinas e os resíduos de Triptofano da CAS foi inferior a 8 nm, indicando que houve transferência de energia entre a CAS e as tetraciclinas após o processo de interação (CHEN et al., 2015). Desta forma, os valores das distâncias críticas obtidos neste estudo são concordantes com trabalhos de Moeniafshari et al. (2015) que avaliaram a interação entre naringerina com  $\beta$ -CAS encontrando valor de  $r_0 = 2,68$  nm. De maneira similar, Bi et al. (2016) avaliaram a interação entre tetraciclina com  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -CAS, obtendo valores de  $r_0 = 3,19$  e 3,70, respectivamente.

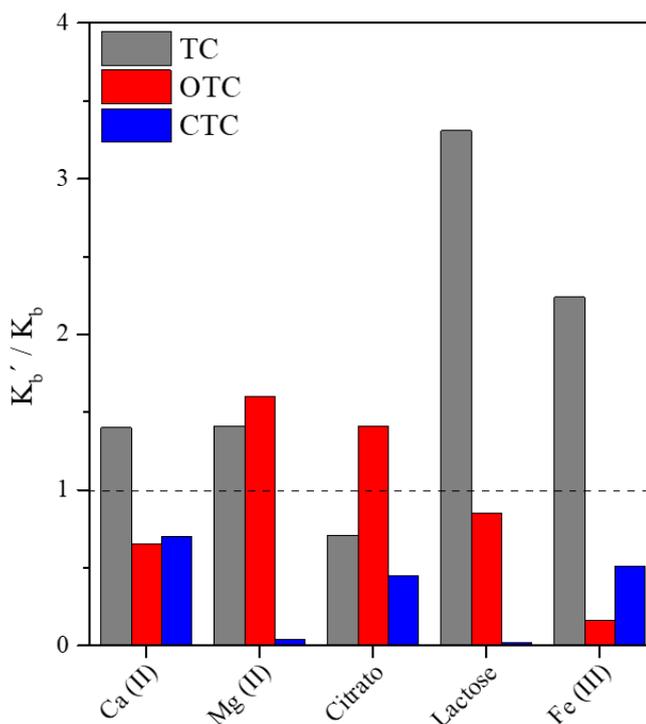
## 5.4 Estudos de competição no processo de interação

### 5.4.1 Avaliação de espécies comuns presentes no leite

O leite é considerado um alimento de alto valor nutricional por possuir uma mistura de nutrientes vitais para o funcionamento adequado do corpo, como água, gordura, proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e sais minerais (SOUZA et al., 2018). Desta forma, a influência de algumas espécies encontradas naturalmente no leite de vaca ou acrescentada comercialmente, como é o caso do ferro, foram avaliadas no processo de interação. A influência de Ca(II), Mg(II), citrato, Fe(III) e lactose na interação de CAS com as tetraciclinas e a CAS foi avaliada. Para tal, a concentração de cada espécie competidora utilizada foi baseada nas condições do leite *in natura* utilizando as concentrações dos competidores nas seguintes

concentrações: Ca(II) (62,5  $\mu\text{M}$ ), Mg(II) (11,3  $\mu\text{M}$ ), citrato (20  $\mu\text{M}$ ) e lactose (295  $\mu\text{M}$ ) conforme descritas por Kalyankar et al. (2016). Para os íons Fe(III), utilizou-se a concentração de 1,0  $\mu\text{M}$ , estimada a partir do rótulo de leite comercial enriquecido com este mineral. Neste processo, as seguintes possibilidades podem ocorrer: i) as espécies competem pelo mesmo sítio com o ligante na proteína; ii) formação de complexos competidor-tetraciclina, os quais interagem menos ou mais com a proteína e iii) ambos os processos ocorrem simultaneamente. A razão da constante de ligação na presença do competidor ( $K_b'$ ) e na ausência ( $K_b$ ) foi utilizada como parâmetro para comparação. Assim, quando  $K_b'/K_b > 1$ , a formação do complexo é favorecida, e contrariamente, quando  $K_b'/K_b < 1$ , a formação do complexo proteína-tetraciclina é desfavorecida. Os resultados estão apresentados na Figura 7.

**Figura 7 - Efeito da presença de espécies competidoras no processo de interação entre CAS e tetraciclina. Condições: CAS (2,5  $\mu\text{M}$ ), competidores ( $\mu\text{M}$ ): Ca(II) = 62,5, Mg(II) = 1,3, lactose = 295, citrato = 20 e Fe(III) = 1,0; tetraciclina (0 - 75  $\mu\text{M}$ ), tampão fosfato 10mM a pH 6,8, e 30°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Na Figura 7 é mostrado que a adição de Ca(II), Mg(II), lactose e Fe(III) favoreceram o processo de interação entre a CAS e TC. Para a OTC a adição dos íons Mg(II) e citrato levou a um aumento na constante de ligação, isto possivelmente pode estar associado a mudanças conformacionais na proteína induzidas pela ligação destas espécies competidoras a grupos presentes na sua cadeia polipeptídica, como grupos fosfatos e tióis, favorecendo a formação dos complexos (YANG et al., 2015). Em contraste, a adição de citrato desfavoreceu a formação de

complexos entre CAS e TC. E para a OTC a adição de Ca(II), lactose e Fe(III) levou a uma diminuição no valor da constante. Adicionalmente, para CTC todas as espécies competidoras adicionadas desfavoreceram a interação com a proteína. Provavelmente devido a formação de complexos metálicos entre as tetraciclinas e as espécies avaliadas, visto que estas possuem grupos funcionais doadores de elétrons, como átomos de oxigênio no sistema cetó-fenólico (C10-C12), oxigênio enólico no C3 e os átomos de nitrogênio presentes em C4 e o grupo carboxamida do anel A (Figura 5, pág. 27), logo possuem excelente capacidade de formar complexos com uma variedade de íons metálicos, incluindo Ca(II), Mg(II), Cu(II), Zn(II), Fe(II e III), Al(III), Cd(II), Co(II) e Pb(II) (GUERRA et al., 2016; PULICHARLA et al., 2017).

Quando a adição de uma espécie aumenta a constante de ligação, pode ser um indicativo que houve alteração da estrutura da proteína, e esta se tornou mais favorável para interagir com o ligante (YANG et al., 2015). Logo, o aumento da constante de ligação dos sistemas de interação na presença de espécies competidoras pode indicar que a estrutura da CAS foi alterada tornando-a mais favorável para interagir com os ligantes. Entretanto, quando a adição de uma espécie diminui a constante de ligação, pode indicar competição entre a espécie adicionada e o ligante pelo mesmo sítio de ligação da macromolécula ou a espécie adicionada interage com o ligante desfavorecendo a interação CAS-ligante (LI; ZHANG; JI, 2014).

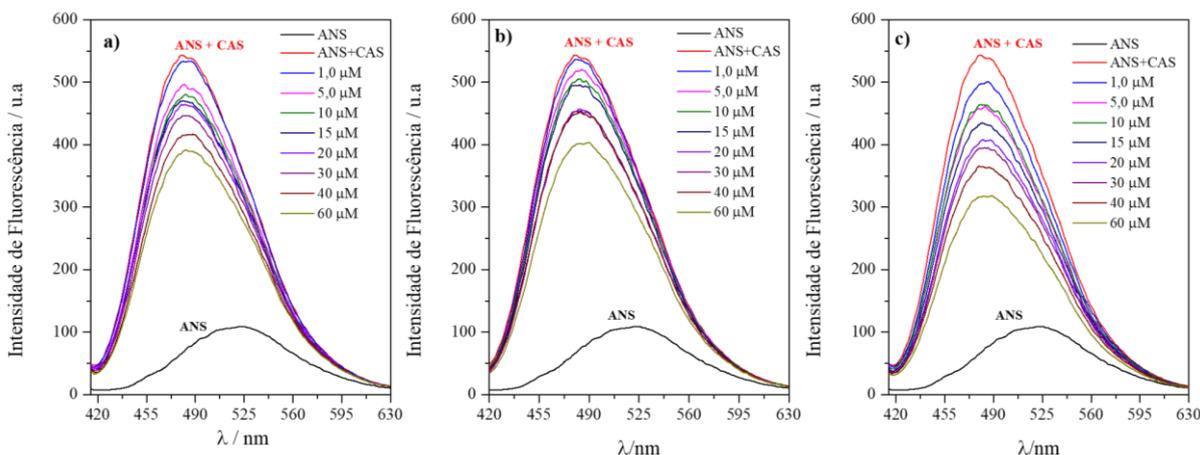
#### 5.4.2 Avaliação da hidrofobicidade da caseína

A sonda fluorogênica ANS (ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato) é a mais utilizada para avaliação da hidrofobicidade de proteínas devido a sua sensibilidade a polaridade do ambiente. Em meio aquoso apresenta baixa fluorescência intrínseca, contudo, ao se ligar a regiões hidrofóbicas da proteína tem sua intensidade de emissão de fluorescência aumentada (RANJBAR et al., 2013).

Desta forma, a sonda ANS foi empregada como uma espécie competidora no processo de interação entre a CAS e as tetraciclinas, com o objetivo de avaliar se o sítio preferencial de ligação ocorre em regiões hidrofóbicas da proteína. Para isso, investigou-se o efeito da adição de diferentes concentrações das tetraciclinas no sistema CAS-ANS, uma vez que se o sítio de ligação das tetraciclinas na macromolécula for próximo ou similar ao da ANS, ocorrerá uma competição e, dessa maneira, os ligantes podem afetar a intensidade de fluorescência do sistema CAS-ANS (GONZALEZ; MIKSOVSKA, 2014). A partir dos resultados (Figura 8), observou-se que a ANS livre apresentou baixa intensidade de fluorescência, contudo, na presença da CAS a intensidade de fluorescência da ANS aumentou. Esta alteração indicou forte ligação entre a

CAS e ANS em função da presença de sítios hidrofóbicos. A adição das tetraciclinas ao sistema CAS-ANS causou uma diminuição na intensidade da fluorescência. Estas observações sugerem que TC, OTC e CTC deslocaram o ANS do seu local de ligação. E desta forma, as tetraciclinas avaliadas competiram com a ANS por sítios hidrofóbicos na CAS (SHAHABADI et al., 2016). Adicionalmente foram calculados os valores de  $K_{SV}$  obtendo-se  $5,65$ ;  $5,16$  e  $9,95 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , para TC, OTC e CTC, respectivamente. O que indica que a CTC foi a tetraciclina que mais deslocou o ANS, ou seja, a CTC compete de forma mais significativa com ANS por sítios hidrofóbicos na caseína, ocasionando uma maior redução na intensidade de fluorescência do sistema CAS-ANS. Este comportamento pode estar associado ao átomo de cloro presente na molécula de CTC, que a torna mais hidrofóbica em comparação com a TC e OTC. Estes resultados estão concordantes com a avaliação da fluorescência sincronizada na qual a CTC foi a tetraciclina que alterou de forma mais significativa a estrutura nativa da caseína. Por fim, a ordem de  $K_{SV}$  obtida em relação ao deslocamento do ANS, foi concordante com os valores de  $\log P$  (coeficiente de partição octanol-água) para TC (-3,46), OTC (-4,42) e CTC (-2,91), indicando realmente que a clorotetraciclina é o composto mais hidrofóbico dentre os avaliados.

**Figura 8- Espectro de emissão de ANS-CAS sob diferentes concentrações de: a) TC, b) OTC e c) CTC. Condições: ANS= (60  $\mu\text{M}$ ), CAS = (5  $\mu\text{M}$ ), TC, OTC e CTC = (0–60  $\mu\text{M}$ ), tampão fosfato a 10 mM a pH 6,8 e 30°C,  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ .**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

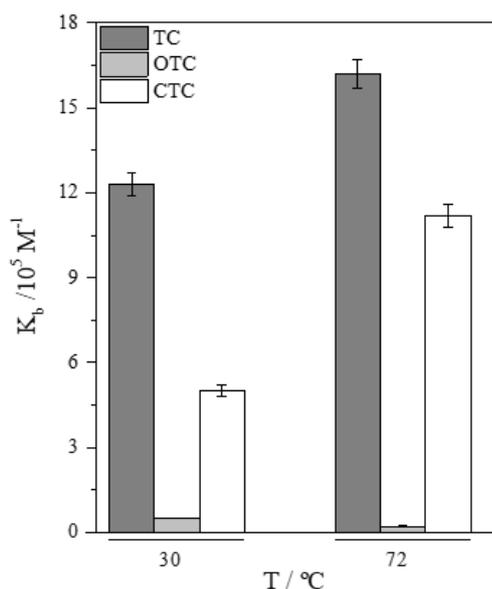
### 5.5 Influência da temperatura de pasteurização do leite

O leite bovino é considerado um alimento de alto valor nutricional para a dieta humana, contudo, é perecível e pode perder rapidamente as propriedades qualitativas e tornar-se inadequado para o consumo. Em função disso, processamentos térmicos como pasteurização, esterilização e tratamento UHT (temperatura ultra alta) são amplamente empregados na

indústria de laticínios, a fim de garantir a segurança alimentar e prolongar a vida útil do leite (MEDIWATHTHE et al., 2018). A pasteurização é o tratamento térmico comercial mais aplicado, no qual o leite é aquecido a 72°C durante 15 s, seguido de resfriamento a 4°C (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Esses tratamentos térmicos aplicados no processamento térmico do leite na indústria de laticínios podem desnaturar as proteínas do leite e ocasionar desdobramento e agregação da estrutura nativa, o qual podem modificar os epítomos alergênicos ou sua acessibilidade e potencializar reações alérgicas aos consumidores deste alimento (BOGAHAWATHTHA; CHANDRAPALA; VASILJEVIC, 2017).

Assim, foi avaliada a influência da temperatura de pasteurização do leite (72 °C) no processo de interação entre CAS-tetraciclina. Para isto, avaliou-se a constante de ligação ( $K_b$ ) na ausência e na presença do aquecimento. A partir deste estudo (Figura 9), observou-se que para a OTC houve redução da constante de ligação. Em contraste, para a TC e CTC houve aumento dos valores de  $K_b$ . Isto possivelmente se deve ao desdobramento parcial da estrutura terciária da proteína, expondo as regiões hidrofóbicas, o qual corroboram com os estudos de competição com a sonda ANS, onde foi possível observar que a interação entre as diferentes tetraciclina avaliadas e a CAS também ocorre em regiões hidrofóbicas da proteína, tornando-a menos protegida, quando comparada com a condição original (BHATTACHARYA; MUKHOPADHYAY, 2012; KANG et al., 2014).

**Figura 9 - Comparação das constantes de ligação ( $K_b$ ) do processo de interação das tetraciclina com a CAS na ausência e na presença do processo de pasteurização. Condições: CAS (2,5  $\mu$ M), tetraciclina (0-75  $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8.**

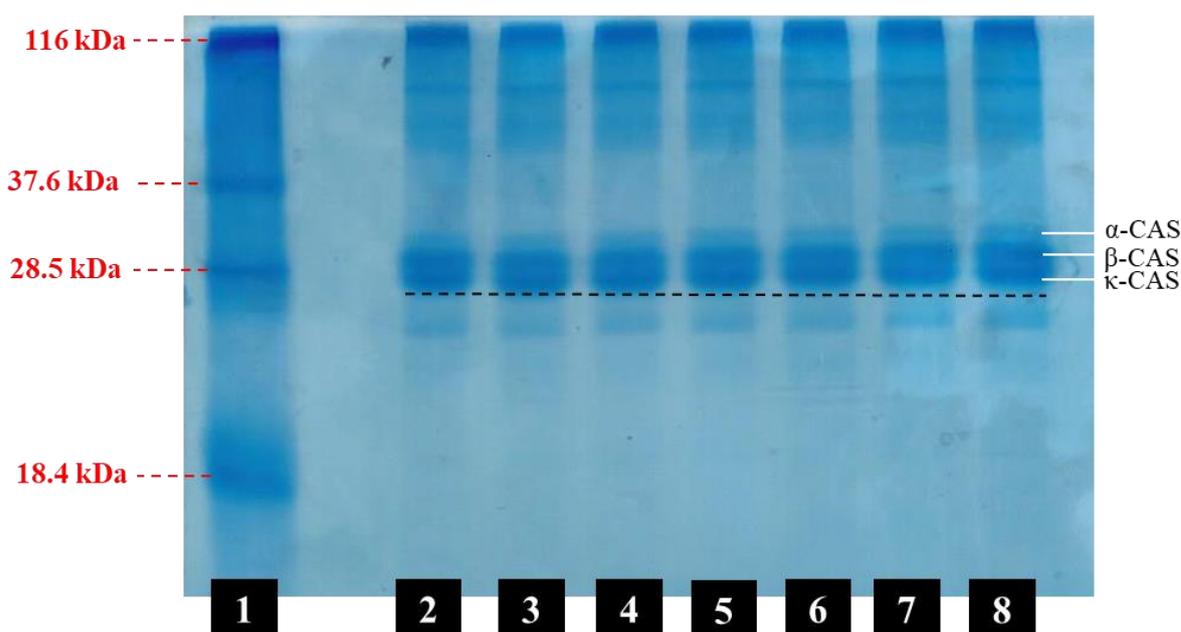


Fonte: elaborado pela autora, 2019.

## 5.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (native PAGE)

Para avaliar o efeito da migração eletroforética da caseína na ausência e na presença das diferentes tetraciclinas realizou-se estudos por eletroforese em gel de poliacrilamida (Native-PAGE). Neste estudo, avaliou-se o efeito da adição das tetraciclinas (TC, OTC e CTC) (6,8 e 13,6 mM, excesso de 250 (6,8 mM) e 500 (13,6 mM) vezes em relação a caseína (27,0  $\mu$ M), no valor de pH fixo (pH = 6,8). Os resultados para este estudo estão apresentados na Figura 10.

**Figura 10 - Efeito da adição das tetraciclinas (TC, OTC e CTC) a caseína na mobilidade eletroforética por Native-PAGE. 1) marcador molecular (Jena Bioscience), 2) CAS, 3) CAS + TC (6,8 mM), 4) CAS + OTC (6,8 mM), 5) CAS + CTC (6,8 mM), 6) CAS + TC (13,6 mM) 7) CAS+ OTC (13,6 mM) e 8) CAS + CTC (13,6 mM).**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 10) existem três bandas referentes as frações proteicas ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\kappa$ -CAS). A adição de TC, OTC e CTC resultou na redução da mobilidade eletroforética da CAS, principalmente nos maiores excessos dos antibióticos. Este comportamento sugere interação entre a caseína e as tetraciclinas, com alteração da estrutura conformacional da proteína, que se tornou mais agregada e com maior massa após interação com as tetraciclinas avaliadas (ZHOU et al., 2015). Estes dados corroboram com a literatura, em que Dantas et al. (2017), avaliaram a interação entre tetraciclinas e ovalbumina, e neste estudo a adição de TC e OTC alteraram a estrutura da proteína com aumento da mobilidade eletroforética. Similarmente, Zhou et al. (2015) avaliaram a interação entre caseína e compostos fenólicos (ácido protocateico e ácido *p*-cumárico) presentes no chocolate, e a partir deste estudo

verificaram que a interação entre compostos fenólicos e caseína alterou a estrutura nativa da CAS com agregação das subunidades ( $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -CAS). Os resultados da eletroforese confirmam os resultados obtidos por fluorescência molecular e UV-vis, assim como confirmam a interação entre as tetraciclinas e a CAS.

### 5.7 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ )

Através dos estudos empregando técnicas de fluorescência molecular e UV-vis foi possível avaliar a interação da CAS com as diferentes tetraciclinas monitorando mudanças na cadeia polipeptídica da proteína na presença do ligante. Contudo, para monitorar possíveis mudanças nos ligantes (tetraciclinas) decorrentes da formação do complexo supramolecular com a macromolécula utilizou-se a espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  que é uma técnica de grande utilidade para estudos de interação proteína-ligante, pois permite mapear o epítipo (superfície de contato) do ligante e a macromolécula (FIGUEIREDO & MARSAIOLI, 2007). Desta forma, foi realizado o monitoramento do deslocamento químico ( $\delta$ ) dos sinais de hidrogênio da tetraciclina (ligante selecionado como modelo) por RMN  $^1\text{H}$  através do perfil espectral. Inicialmente, foram obtidos os espectros de RMN  $^1\text{H}$  da tetraciclina na ausência e presença da CAS em três concentrações diferentes (Figura 11, pág.61). A atribuição dos sinais aos respectivos hidrogênios presentes na molécula de TC está de acordo com Celotti & Fazakerley (1977), e os deslocamentos químicos do ligante na ausência e na presença das diferentes concentrações da CAS estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7 - Deslocamento químico ( $\delta$ ) da TC na ausência e presença de diferentes concentrações de CAS. Condições: TC (0,5 mM) e CAS em tampão fosfato (preparado em  $\text{D}_2\text{O}$ ) e pH 6,8.**

Hidrogênio	TC <sup>a</sup>	TC <sup>b</sup>	TC (0,5 mM) + CAS X ( $\mu\text{M}$ )			$\Delta\delta^c$
			X = 5	X = 10	X = 20	
8	7,61	7,6303	7,6306	7,6304	7,6293	- 0,0010
7	7,24	7,2666	7,2666	7,2664	7,2657	- 0,0003
9	7,02	7,0398	7,0390	7,0390	7,0388	- 0,0010
4	3,85	3,8797	3,8779	3,8779	3,8807	- 0,0010
5a	3,10	3,1405	3,1399	3,1398	3,1395	- 0,0010
( $\text{CH}_3$ ) <sub>2</sub> N-	2,95	2,9469	2,9446	2,9444	2,9439	<b>-0,0300</b>
4a	2,77	2,7905	2,7860	2,7858	2,7855	<b>-0,0050</b>
5	2,27	2,2801	2,2799	2,2796	2,2791	-0,0010
5	1,92	1,9320	1,9319	1,9315	1,9311	-0,0011
$\text{CH}_3$ -6	1,66	1,6778	1,6776	1,6773	1,6768	-0,0010

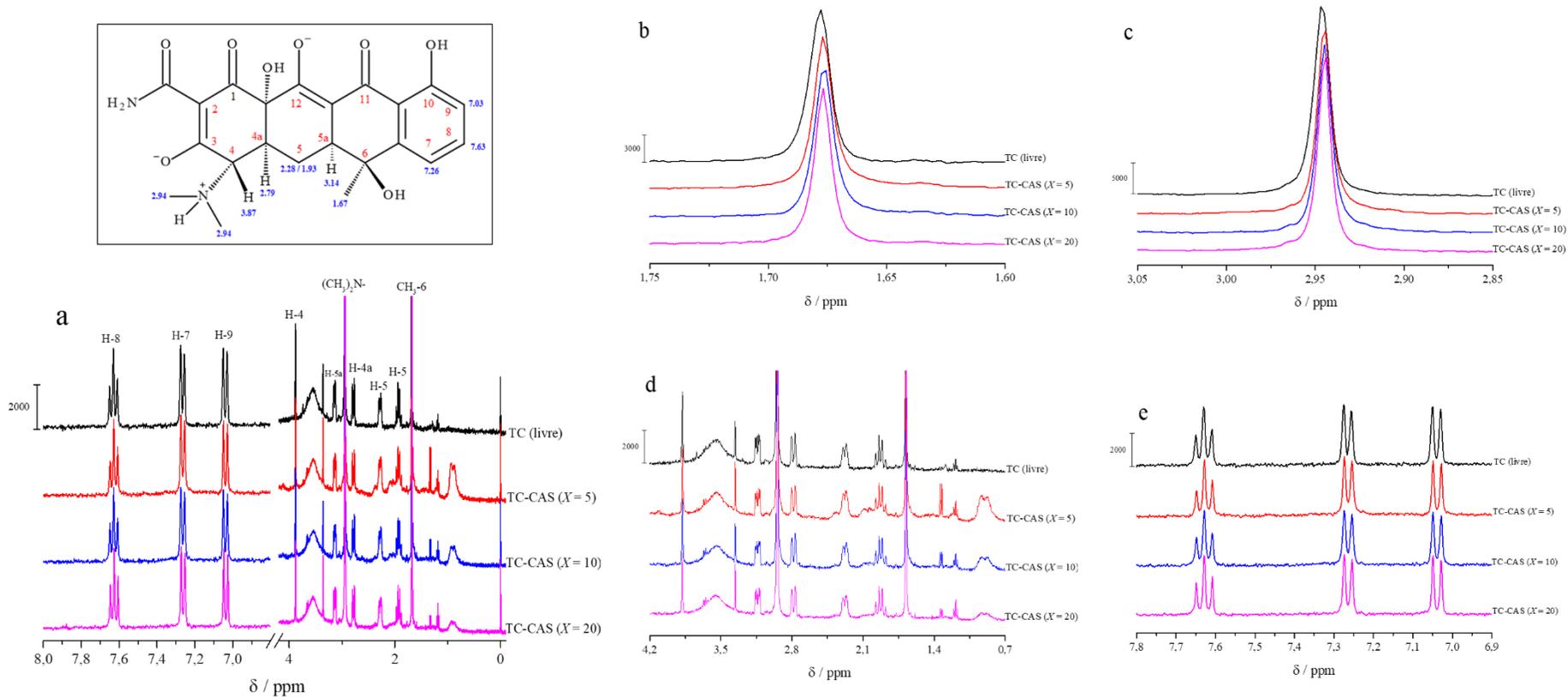
Nota: <sup>a</sup> $\delta$  para TC em  $\text{H}_2\text{O}$  (pH = 6,5) por Celotti & Fazakerley (1977) / <sup>b</sup> $\delta$  para TC neste trabalho / <sup>c</sup> $\Delta\delta$  foi calculado com base na diferença entre  $\delta$ (ligante livre, TC) e  $\delta$ (TC-CAS, proteína a 20  $\mu\text{M}$ ).

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

A partir dos valores de variação de deslocamento químico ( $\Delta\delta$ ) calculados observou-se que o hidrogênio (H-4a) e o grupo  $((\text{CH}_3)_2\text{N}-)$  da molécula TC são aqueles provavelmente mais envolvidos na interação CAS-TC, e essa mesma região TC provavelmente interage com os resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica da proteína. Além disso, observou-se também que, na presença do CAS, houve redução dos sinais relacionados aos hidrogênios monitorizados, indicando que ocorreu interação proteína-ligante.

Isto ocorre devido à redução do tempo de relaxação ( $T_1$ ) do ligante na presença da macromolécula, uma vez que macromoléculas, como as proteínas, relaxam rapidamente devido a sua alta massa molecular e, dessa maneira, as tetraciclinas ao interagirem com a CAS adquirem suas propriedades e, conseqüentemente, tem sua velocidade de relaxação reduzida, resultando em alterações espectrais (BOJKO et al., 2009; WANG, Y., et al., 2013). Estes resultados corroboram com o tipo de força preferencial envolvida no processo de interação.

**Figura 11 – (a) Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) da tetraciclina na ausência e na presença de diferentes concentrações de CAS. Expansão de diferentes regiões (b, c, d, e) dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) para TC na presença e ausência da caseína em pH 6,8. Condições: TC (0,5 mM) em tampão fosfato 10 mM (preparado com  $\text{D}_2\text{O}$ ) a pH 6,8.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

## 5.8 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

A mastite bovina é a inflamação das glândulas mamárias em vacas leiteiras, causada por microrganismos patogênicos. As bactérias responsáveis pela mastite incluem bactérias gram-positivas e gram-negativas como *S.aureus*, *estreptococos*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (MUSHTAQ et al., 2018). Assim, foi realizado um estudo para avaliar se a interação entre a CAS e as tetraciclinas (TC, OTC e CTC) interferia ou não na ação biológica destes antibióticos sobre diferentes bactérias *in vitro*. Assim, foi avaliada a atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo. A tetraciclina na presença e ausência da caseína foram testados contra as cepas de *E. coli* ATCC8739 e *S. aureus* ATCC25923 (Tabela 8).

**Tabela 8 - Avaliação da influência do processo de interação entre CAS e tetraciclinas na atividade antibacteriana *in vitro*.**

Bactéria	Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g mL}$ )						
	Proteína livre ou ligante				Complexos <sup>3</sup>		
	CAS	TC	OTC	CTC	CAS-TC	CAS-OTC	CAS-CTC
<i>E. coli</i> <sup>1</sup>	> 50	< 1,5	6,0	6,0	< 1,5	6,0	6,0
<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	> 50	< 1,5	1,5	3,0	< 1,5	1,5	6,0

<sup>1</sup>Gram negativa// <sup>2</sup>Gram positiva // <sup>3</sup>considerando a proporção 1:1 proteína e antibiótico, em massa.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) variaram entre < 1.5  $\mu\text{g mL}$  (TC) e > 50  $\mu\text{g mL}$  (CAS). Observou-se que para TC e OTC os valores da CIM na ausência e na presença da CAS não foram alterados independente da bactéria avaliada. Para CTC, a interação com a caseína resultou no aumento da CIM contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, tornando o antibiótico menos eficiente. Como a CAS está organizada em micelas com regiões hidrofóbicas, (sendo a CTC um composto mais hidrofóbico) pode ter ocorrido o aprisionamento, reduzindo sua concentração livre, alterando sua atividade antibacteriana (KUANG et al., 2009). Assim, o uso de CTC em vacas leiteiras pode levar à resistência bacteriana devido à necessidade de aumento das dosagens. Finalmente, estudos com ANS (hidrofobicidade superficial) suportam esse resultado, uma vez que a CTC mostrou maior afinidade por sítios hidrofóbicos da caseína.

## 6 CONCLUSÕES DA ETAPA 1

A partir deste estudo foi possível concluir que a interação da TC, OTC e CTC com a CAS altera a estrutura conformacional da proteína e o microambiente dos resíduos dos aminoácidos Tir e Trp, o qual pode potencializar reações alérgicas e comprometer a segurança alimentar. A magnitude de interação obedeceu à seguinte ordem:  $TC < CTC < OTC$ . As forças preferenciais de interação foram ligações de hidrogênio, eletrostática e forças de Van der Waals. Por fim, através de estudos antibacterianos *in vitro*, observou-se que a interação entre CAS e CTC resulta na diminuição da atividade antibacteriana da CTC frente a bactéria Gram positiva *S. aureus*, o qual indica que as propriedades biológicas de moléculas pequenas podem ser alteradas após a formação de complexos supramoleculares com proteínas alimentares.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABDELHAMEED, A.S., et al. Fluorescence spectroscopic and molecular docking studies of the binding interaction between the new anaplastic lymphoma kinase inhibitor crizotinib and bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Arábia Saudita, v. 171, p.174-182, jan. 2017.
- ALBANI, J.R. **Principles and applications of fluorescence spectroscopy**. Reino Unido: Blackwell Publishing, 2007, 270p.
- ALI, M. S.; AL-LOHEDAN, H. A.. Multi-technique approach on the interaction between sugar-based surfactant n-dodecyl  $\beta$ - d -maltoside and bovine serum albumin. **Journal Of Luminescence**, Arábia Saudita, v. 169, p.35-42, jan. 2016.
- ALLAHDAD, Z., et al. Spectroscopic and docking studies on the interaction between caseins and  $\beta$ -carotene. **Food Chemistry**, Irã, v. 255, p.187-196, jul. 2018.
- ALVES, Everton Giovanni et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, Brasil, v. 31, n. 5, p.1224-1229, 2008.
- ARIGA, Girish G. et al. Interactions between epinastine and human serum albumin: Investigation by fluorescence, UV-vis, FT-IR, CD, lifetime measurement and molecular docking. **Journal of Molecular Structure**, Índia, v. 1137, p.485-494, jun., 2017.
- ARMENTANO, A., et al. Rapid method for the quantification of 13 sulphonamides in milk by conventional high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection using a column packed with core-shell particles. **Journal of Chromatography A**, Itália, v. 1531, p.46-52, jan., 2018.
- ARROYO-MAYA, I.J., et al. Characterization of flavonoid-protein interactions using fluorescence spectroscopy: Binding of pelargonidin to dairy proteins. **Food Chemistry**, México, v.213, p.431-439, dez., 2017.
- ANSARI, S.S., et al. Exploring the intermolecular interactions and contrasting binding of flufenamic acid with hemoglobin and lysozyme: A biophysical and docking insight. **International Journal of Biological Macromolecules**, Índia, v.116, p.1105-1118, set., 2018.
- ANTONOV, Y.A.; MOLDENAERS, P.; CARDINAEELS, R. Complexation of lysozyme with sodium caseinate and micellar casein in aqueous buffered solutions. **Food Hydrocolloids**, Rússia, v. 62, p.102-118, jan., 2017.
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. São Paulo:Manole, p.142, 2003.
- BAGHERI, M.; FATEMI, M.H. Fluorescence spectroscopy, molecular docking and molecular dynamic simulation studies of HSA-Aflatoxin B1 and G1 interactions. **Journal Of Luminescence**, v. 202, p.345-353, out. 2018.
- BALDAÇARA, Raquel Prudente de Carvalho et al. Prevalence of allergen sensitization, most important allergens and factors associated with atopy in children. **São Paulo Medical Journal**, Brasil, v.131, n.5, p.301-308, 2013.

BHATTACHARYA, M.; MUKHOPADHYAY, S. Structural and dynamical insights into the molten-globule form of ovalbumin, *The Journal of Physical Chemistry B*, Índia, v.116, p.520-531, nov., 2012.

BRANDÃO, E., et al. Molecular study of mucin-procyanidin interaction by fluorescence quenching and Saturation Transfer Difference (STD)-NMR. **Food Chemistry**, Portugal, v. 228, p.427-434, ago. 2017.

BARRECA, D., et al. The interaction and binding of flavonoids to human serum albumin modify its conformation, stability and resistance against aggregation and oxidative injuries. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, Itália, v. 1861, n. 1, p.3531-3539, jan. 2017.

BECKER, W., et al. Investigating Protein-Ligand Interactions by Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Chemphyschem**, Austria, v. 19, n. 8, p.895-906, fev., 2018.

BI, H., et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction between tetracycline hydrochloride and bovine proteins  $\beta$ -casein,  $\alpha$ -lactalbumin. **Journal of Luminescence**, China, v. 178, p.72-83, out., 2016.

BOGAHAWATHTHA, D.; CHANDRAPALA, J.; VASILJEVIC, T. Modulation of milk immunogenicity by thermal processing. **International Dairy Journal**, Austrália, v. 69, p.23-32, jun. 2017.

BOGAHAWATHTHA, D., et al. Comparison between thermal pasteurization and high pressure processing of bovine skim milk in relation to denaturation and immunogenicity of native milk proteins. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Austrália, v. 47, p.301-308, jun. 2018.

BOHIN et al. Interaction of flavan-3-ol derivatives and different caseins is determined by more than proline content and number of proline repeats. **Food Chemistry**, Países Baixos, v.158, p.408–416, mar., 2014.

BOJKO, B., et al. Investigations of acetaminophen binding to bovine serum albumin in the presence of fatty acid: fluorescence and  $^1\text{H}$  NMR studies. **Journal of molecular structure**, Holanda, v.924–926, p.332–337, jan., 2009.

BORTOLOTTI, A., et al. On the purported “backbone fluorescence” in protein three-dimensional fluorescence spectra. **Rsc Advances**, Reino Unido, v. 6, n. 114, p.112870-112876, 2016.

BUSSE, P.J, et al. Identification of sequential IgE-binding epitopes on bovine alpha(s<sub>2</sub>)-casein in cow's milk allergic patients. **International Archives of Allergy Immunology**, 129, p. 93-96, 2002.

BYADAGI, K., et al. Investigation of binding behaviour of procainamide hydrochloride with human serum albumin using synchronous, 3D fluorescence and circular dichroism. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Índia, v. 7, n. 2, p.103-109, abr. 2017.

CALA, O.; GUILLIÈRE, F.; KRIMM, I. NMR-based analysis of protein–ligand interactions. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, França, v. 406, n. 4, p.943-956, fev., 2014.

CANIÇA, Manuela et al. Antibiotic resistance in foodborne bacteria. **Trends In Food Science & Technology**, Holanda, v. 84, p.41-44, fev. 2019.

CARDAMONE, M; PURI, N. K. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. **Biochemical Journal**, Austrália, v. 282, n. 2, p.589-593, 1 mar. 1992.

CASTRO et al., **Guia prático de diagnóstico e tratamento da Alergia às Proteínas do Leite de Vaca mediada pela imunoglobulina E**. Rev. bras. alerg. imunopatol. v.35, n.6, p203-234, 2012.

CASTRO, R.J.S., et al. Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties, production technologies and applications. **Food Structure**, Brasil, v. 14, p.17-29, out., 2017.

CELOTTI, M.; FAZAKERLEY, G.V. Conformation of various tetracycline species determined with the aid of a nuclear magnetic resonance relaxation probe. **Journal Of The Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v.10, p.1319-1322, 1977.

CERECEDO I., et al. Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 122, p.589-594, 2008.

CHANG, I., et al. Bovine casein as a new soil strengthening binder from diary wastes. **Construction and Building Materials**, Austrália, v. 160, p.1-9, jan., 2018.

CHATCHATEE P., et al. Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients. **Clinical & Experimental Allergy**, 31, p.1256-1262, 2001.

CHEN, F., et al. Interaction of L-arginine with j-casein and its effect on amyloid fibril formation by the protein: Multi-spectroscopic approaches. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, China, v.143, p.130–138, fev., 2015.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química dos alimentos de Fennema**. 4ª ed., Artmed, Porto Alegre, 900p., 2010.

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

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

DAS, S., et al. Lysozyme–luteolin binding: molecular insights into the complexation process and the inhibitory effects of luteolin towards protein modification. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 21, n. 23, p.12649-12666, 2019.

DELAVARI, et al. Alpha-lactalbumin: A new carrier for vitamin D<sub>3</sub> food enrichment. *Food Hydrocolloids*, Iran, v.45, p. 124-131, mar., 2015.

DEZHAMPANAH, H.; ESMAILI, M.; KHORSHIDI, A. Milk  $\beta$ -casein as a vehicle for delivery of bis(indolyl)methane: Spectroscopy and molecular docking studies. **Journal Of Molecular Structure**, Irã, v. 1136, p.50-58, maio 2017.

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.

DRESLER, J.; KLIMENTOVA, J.; STULIK, J. Bacterial protein complexes investigation using blue native PAGE. **Microbiological Research**, República Tcheca, v. 166, n. 1, p.47-62, jan., 2011.

DU, X., et al. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. **International Journal of Molecular Sciences**, China, v.17, n.2, p.144-178, 26 jan. 2016.

DYER, Ashley A.; GUPTA, Ruchi. Epidemiology of Childhood Food Allergy. **Pediatric Annals**, EUA, v. 42, n. 6, p.e101-e105, jun., 2013.

Estrutura cristalina da alfa-lactalbumina bovina disponível em: <<http://www.rcsb.org/structure/1HFZ>>, acesso em:26 de agosto de 2019.

EKEZIE, F.G.C.; CHENG, J.H; SUN, D.W. Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: A review of recent research advances. **Trends in Food Science & Technology**, China, v. 74, p.12-25, abr., 2018.

ETTELAIE, R.; KHANDELWAL, N.; WILKINSON, R. Interactions between casein layers adsorbed on hydrophobic surfaces from self-consistent field theory:  $\kappa$ -casein versus para- $\kappa$ -casein. **Food Hydrocolloids**, Reino Unido, v. 34, p.236-246, jan. 2014.

FERNANDES, Flávio Cesar Bedatty et al. Screening and determination of sulphonamide residues in bovine milk samples using a flow injection system. **Food Chemistry**, Brasil, v. 166, p.309-315, jan., 2015.

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.

GAO, X., et al. Interaction of residue tetracycline hydrochloride in milk with  $\beta$ -galactosidase protein by multi-spectrum methods and molecular docking. **Journal of Molecular Structure**, China, v. 1141, p.382-389, ago., 2017.

GONZALEZ, W.G.; MIKSOVSKA, J. Application of ANS fluorescent probes to identify hydrophobic sites on the surface of DREAM. **Biochimica et Biophysica Acta**, USA, v.1844, p.1472–1480, mai., 2014.

GONZALES-GONZÁLEZ, V.A., et al. Prevalence of food allergens sensitization and food allergies in a group of allergic Honduran children. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, Honduras, v. 14, n. 1, p.1-7, 18 jun., 2018.

GRANJA, R. H.M.M., et al. Validation of a liquid chromatography with ultraviolet detection methodology for the determination of sulfonamides in bovine milk according to 2002/657/EC. **Food Control**, Brasil, v. 28, n. 2, p.304-308, dez., 2012.

GUERRA, W., et al. Impact of metal coordination on the antibiotic and non-antibiotic activities of tetracycline-based drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, Brasil, v. 327-328, p.188-199, nov. 2016.

HE, Z., et al. Interactions of milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein with malvidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of grape skin anthocyanin extracts. **Food Chemistry**, China, v. 199, p.314-322, maio 2016.

HOCHWALLNER, H., et al. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. **Methods**, Áustria, v. 66, n. 1, p.22-33, mar., 2014.

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

HSU, L.C., et al. Adsorption of tetracycline on Fe (hydr)oxides: effects of pH and metal cation ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Al}^{3+}$ ) addition in various molar ratios. **Royal Society Open Science**, China, v.5, p.1-12, out., 2018.

HUPPERTZ, T.; FOX, P.F; KELLY, A.L. The caseins: Structure, stability, and functionality. Holanda, 2ª ed., **Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition**, P.49-92, 2018.

JORGE, A., et al. Prevalence and clinical features of adverse food reactions in Portuguese children. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, Portugal, v. 13, n. 1, p.1-10, 6 set., 2017.

JÚNIOR, D.C.; BURNS, D.A.R.; LOPEZ, F.A. **Tratado de Pediatria: Sociedade Brasileira de Pediatria**. v.1, 3ª.ed. – Barueri, SP: Manole, 2014.

KALYANKAR, S.D., et al. Milk: Sources and Composition. **Encyclopedia of Food and Health**, Índia, p.741-747, 2016.

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.

KANG, J., et al. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, UV–Visible spectroscopy and kinetic modeling for elucidation of

adsorption chemistry in uptake of tetracycline by zeolite beta. **Journal Of Colloid And Interface Science**, China, v. 354, n. 1, p.261-267, fev. 2011

KARAGEORGOU, E., et al. Ultrasound-assisted dispersive extraction for the high-pressure liquid chromatographic determination of tetracyclines residues in milk with diode array detection. **Food Chemistry**, Grécia, v. 150, p.328-334, mai., 2014.

HASKARD, C. A.; LI-CHAN, E. C. Y. Hydrophobicity of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin Determined Using Uncharged (PRODAN) and Anionic (ANS-) Fluorescent Probes. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, Canadá, v. 46, n. 7, p.2671-2677, jul. 1998.

KATTAN, J.D.; COCCO, R.R.; JÄRVINEN, K.M. Milk and Soy Allergy. **Pediatric Clinics of North America**, EUA, v.58, n.2, p.407-426, abr., 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.

KHATUN, S.; RIYAZUDEEN; QAIS, F.A. Characterization of the binding of triprolidine hydrochloride to hen egg white lysozyme by multi-spectroscopic and molecular docking techniques. **Journal of Molecular Liquids**, Índia, v. 269, p.521-528, nov., 2018.

KUANG, et al. Effect of milk on antibacterial activity of tetracycline against Escherichia coli and Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. **Applied Microbiology And Biotechnology**, Japão, v. 84, n. 1, p.135-142, 6 maio 2009.

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.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3.ed. Baltimore: Springer, 2006.  
LEHN, J.M. **Química supramolecular conceitos e perspectivas**. Lisboa:Press,1996.

LI, D.; ZHANG, T.; JI, B. Influences of pH, urea and metal ions on the interaction of sinomenine with Lysozyme by steady state fluorescence spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v.130, p.440–446, abr., 2014.

LI, H., et al. Studies of the interaction between FNC and human hemoglobin: A spectroscopic analysis and molecular docking. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v.136, p.416–422, fev., 2015.

LI, T., et al. Comparison of interactions between three food colorants and BSA. **Food Chemistry**, China, v. 194, p.740-748, mar. 2016.

LIANG, J.; CHENG, Y.; HAN, H. Study on the interaction between bovine serum albumin and CdTe quantum dots with spectroscopic techniques. **Journal of Molecular Structure**, China, v. 892, n. 1-3, p.116-120, dez. 2008.

LODISH, H., et al. **Biologia celular e molecular**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LOU, Y.Y., et al. Spectroscopic and molecular docking approaches for investigating conformation and binding characteristics of clonazepam with bovine serum albumin (BSA). **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, China, v.167, p.158–167, jan., 2017.

LOUREIRO, Rui João et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, Portugal, v.34, n.1, p.77-84, jan. 2016.

LU, Y., et al. Effect of Covalent Interaction with Chlorogenic Acid on the Allergenic Capacity of Ovalbumin. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, China, v. 66, n. 37, p.9794-9800, 30 ago., 2018.

LYRA, A.C.F. Avaliação da interação da ovalbumina, principal alérgeno natural da clara do ovo, com sulfonamidas através de estudos espectroscópicos e de atividade biológica. 2017. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

MAKARSKA-BIALOKOZ, M. Interactions of hemin with bovine serum albumin and human hemoglobin: A fluorescence quenching study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Polônia, v.193, p.23–32, jan., 2018.

MANIASSO, Nelson. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, Brasil, v. 24, n. 1, p.87-93, fev. 2001.

MARTINS, M.T., et al. Multiclass and multi-residue determination of antibiotics in bovine milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Combining efficiency of milk control and simplicity of routine analysis. **International Dairy Journal**, Brasil, v. 59, p.44-51, ago., 2016.

MATSUO, H.; YOKOOJI, T.; TAOGOSHI, T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. **Allergology International**, Japão, v. 64, n. 4, p.332-343, out., 2015.

MEDIWATHTHE, A., et al. Structural changes of native milk proteins subjected to controlled shearing and heating. **Food Research International**, Austrália, v. 114, p.151-158, dez. 2018.

MEHRANFAR, et al. Spectrofluorometric and molecular docking study on the interaction of bisdemethoxycurcumin with bovine  $\beta$ -casein nanoparticles. **Journal of luminescence**, Irã, v.143, p.687–692, jul., 2013.

MICIŃSKI, J., et al. Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction. **Polish Annals Of Medicine**, Polônia, v. 20, n. 1, p.69-76, set. 2013.

MOEINIAFSHARI, A.; ZARRABI, A.; BORDBARET, A. Exploring the interaction of naringenin with bovine beta-casein nanoparticles using spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, Irã, v.51, p.1-6, mai., 2015.

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.

MONDAL, M., et al. Molecular interaction between human serum albumin (HSA) and phloroglucinol derivative that shows selective anti-proliferative potential. **Journal of Luminescence**, Índia, v.192, p.990–998, ago., 2017.

MOREIRA, I.F., et al. Perfil dos pacientes registrados no ambulatório de alergia e imunologia do hospital universitário professor Alberto Antunes - Maceió/AL. **GEP NEWS**, Maceió, v.1, n.1, p. 196-201, jan./mar., 2018.

MUSHTAQ, et al. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. **Microbial Pathogenesis**, Índia, v. 114, p.357-361, jan. 2018.

NAKAJIMA-ADACHI H., et al. Determinant analysis of IgE and IgG4 antibodies and T cells specific for bovine alpha(s)1-casein from the same patients allergic to cow's milk: existence of alpha(s)1-casein-specific B cells and T cells characteristic in cow'smilk allergy. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, 101, p.66-71, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada. 6. ed. Norma M7-A6 do NCCLS, v.22, n.2, p.14-19, 2003.

NEBOT, C., et al. Monitoring the presence of residues of tetracyclines in baby food samples by HPLC-MS/MS. **Food Control**, Espanha, v. 46, p.495-501, dez., 2014.

OLIVEIRA, E., et al. ELETROFORESE: CONCEITOS E APLICAÇÕES. **Enciclopédia Biosfera**, Brasil, p.1129-1149, dez., 2015.

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

PESIC, M., et al. Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. **Food Chemistry**, Sérvia, v. 125, n. 4, p.1443-1449, abr., 2011.

POOLE, Keith. At the Nexus of Antibiotics and Metals: The Impact of Cu and Zn on Antibiotic Activity and Resistance. **Trends In Microbiology**, Canadá, v.25, n.10, p.820-832, out. 2017.

POURESHGHI, F., et al. Interaction of an antiepileptic drug, lamotrigine with human serum albumin (HSA): Application of spectroscopic techniques and molecular modeling methods. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, Irã, v.166, p.187–192, jan., 2017.

PULICHARLA, R., et al. Tetracyclines metal complexation: Significance and fate of mutual existence in the environment. **Environmental Pollution**, USA, v. 221, p.1-14, fev. 2017.

RABBANI, G., et al. Binding of erucic acid with human serum albumin using a spectroscopic and molecular docking study. **International Journal of Biological Macromolecules**, Coréia do Sul, v. 105, p.1572-1580, dez. 2017.

RAHAMAN, T.; VASILJEVIC, T.; RAMCHANDRAN, L. Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. **Trends in Food Science & Technology**, Austrália, v. 49, p.24-34, mar., 2016.

RAMA, A., et al. Assessment of antibacterial drug residues in milk for consumption in Kosovo. **Journal of Food And Drug Analysis**, Kosovo, v. 25, n. 3, p.525-532, jul., 2017.

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**, Irã, v.2013, p.4-13, Set., 2013.

REBOUILLAT, S.; ORTEGA-REQUENA, S. Potential Applications of Milk Fractions and Valorization of Dairy By-Products: A Review of the State-of-the-Art Available Data, Outlining the Innovation Potential from a Bigger Data Standpoint. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, Suíça, v.6, p.176-203, Jul., 2015.

RIDOUT, M. J., et al. Interaction of transglutaminase with adsorbed and spread films of  $\beta$ -casein and  $\kappa$ -casein. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Reino Unido, v. 128, p.254-260, abr., 2015.

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.

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

RUDRA, S., et al. Spectroscopic exploration and molecular docking analysis on interaction of synthesized schiff base ligand with serum albumins. **Journal of Molecular Structure**, Índia, v. 1167, p.107-117, set., 2018.

SAVYASACHI, A. J. et al. Supramolecular Chemistry: A Toolkit for Soft Functional Materials and Organic Particles. *Chem*, v. 3, n. 5, p.764-811, nov. 2017.

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, A.S.; ANANDAKUMAR, S.; ILANCHELIA, M. 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**, Índia, v.151, p.206–218, fev., 2014.

SIDDIQI, M.K., et al. Probing the interaction of cephalosporin antibiotic–ceftazidime with human serum albumin: A biophysical investigation. **International Journal of Biological Macromolecules**, Índia, v.105, p.292–299, jan., 2017.

SHAHABADI, N., et al. Spectroscopic investigation into the interaction of a diazacyclam-based macrocyclic copper(ii) complex with bovine serum albumin. **Luminescence**, Irã, v. 32, n. 1, p.43-50, mai., 2016.

SHARMA, A.S.; ANANDAKUMAR, S.; ILANCHELIA, M. 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**, Índia, v.151, p.206–218, fev., 2014.

SOUSA, R.C.S., et al. Adsorption of alpha-lactalbumin from milk whey on hydroxyapatite: effect of pH and temperature and thermodynamic analysis. **Química Nova**, Brasil, p.950-955, jun., 2014.

SOUZA, S.O., et al. Evaluation of the mineral content in milk and yogurt types using chemometric tools. **Microchemical Journal**, Brasil, v. 143, p.1-8, dez. 2018.

SURYAWANSHI, V.D., et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Índia, v.6, p.56-63, jul., 2016.

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, an., 2011.

TSABOURI, S.; DOUROS, K.; PRIFTIS, K.N. Cow's Milk Allergenicity. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, Grécia, v.14, p.16-26, 2014.

VELICKOVIC, T.C., et al. Delivery of Epigallocatechin-3-Gallate by Bovine Alpha-Lactalbumin Based on Their Non-covalent Interactions. **Reference Module in Food Science**, Coréia do Sul, p.1-7, jan., 2018.

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

VINCENT, D., et al. Quantitation and Identification of Intact Major Milk Proteins for High-Throughput LC-ESI-Q-TOF MS Analyses. *Plos One*, Itália, v. 11, n. 10, p.1-21, 17 out. 2016.  
WANG, J., et al. Investigation of the interaction of deltamethrin (DM) with human serum albumin by multi-spectroscopic method. **Journal of Molecular Structure**, China, v.1129, p.160-168, jan., 2017.

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. Studies on the interaction between neutral red and bovine hemoglobin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling. **Journal of Molecular Liquids**, China, v.211, p.584-590, ago., 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.

WEI, J., et al. Analysis of the interaction mechanism of Anthocyanins (*Aronia melanocarpa* Elliot) with  $\beta$ -casein. **Food Hydrocolloids**, China, v. 84, p.276-281, nov. 2018.

WONG, C.E., et al. Cyclodextrins: A Weapon in the Fight Against Antimicrobial Resistance. **Journal of Molecular and Engineering Materials**, Malásia, v. 05, n. 01, p.1-9, mar. 2017.

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.

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

YAZDI, S.R.; CORREDIG, M. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. **Food Chemistry**, Canadá, v.132, p.1143–1149, jan., 2012.

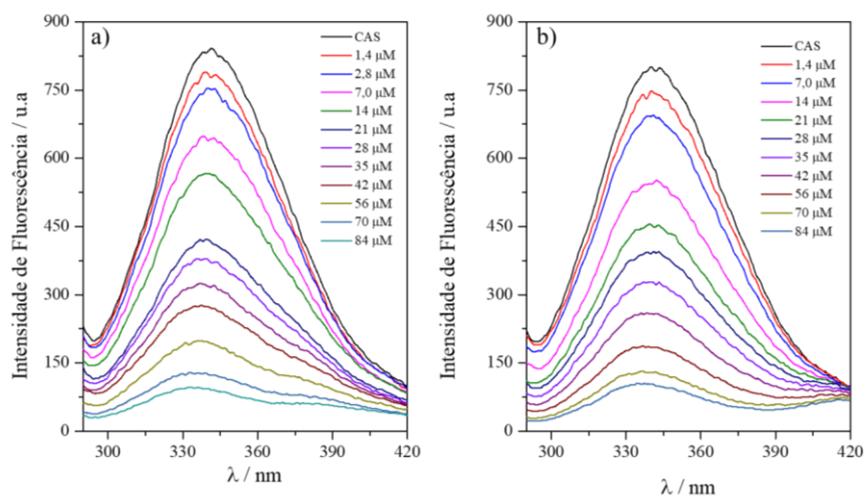
YU, J.E.; MALLAPATY, A.; MILLER, R.L. It's not just the food you eat: Environmental factors in the development of food allergies. **Environmental Research**, Eua, v. 165, p.118-124, ago., 2018.

ZHANG, Y.D., et al. Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, sulfamethazine and quinolones in pasteurized milk and UHT milk in China's market. **Food Control**, China, v. 36, n. 1, p.238-242, fev., 2014.

ZHOU, S., et al. Interactions of caseins with phenolic acids found in chocolate. **Food Research International**, Canadá, v.74, p.177–184, ago., 2015.

## APÊNDICE A

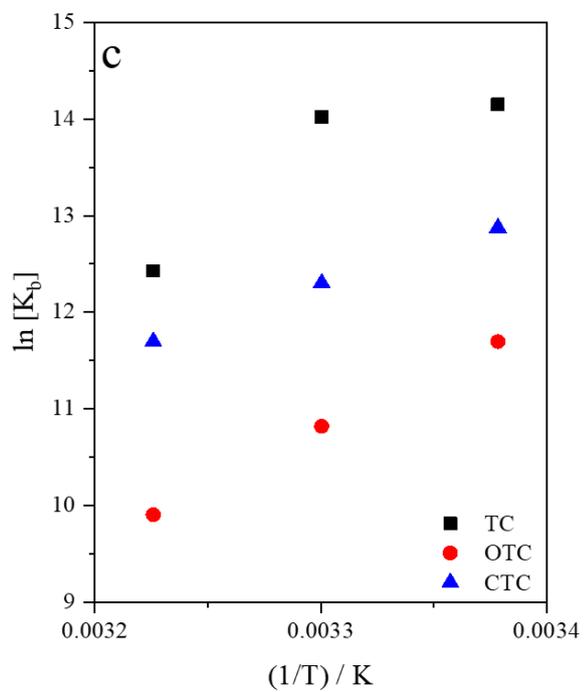
**Figura 12- Titulação espectrofluorimétrica da caseína para os seguintes ligantes: a) OTC e b) CTC. Condições: CAS (2,8  $\mu\text{M}$ ), tetraciclina (0-84  $\mu\text{M}$ ), tampão fosfato 10 mM a pH=6,8 e 30°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

## APÊNDICE B

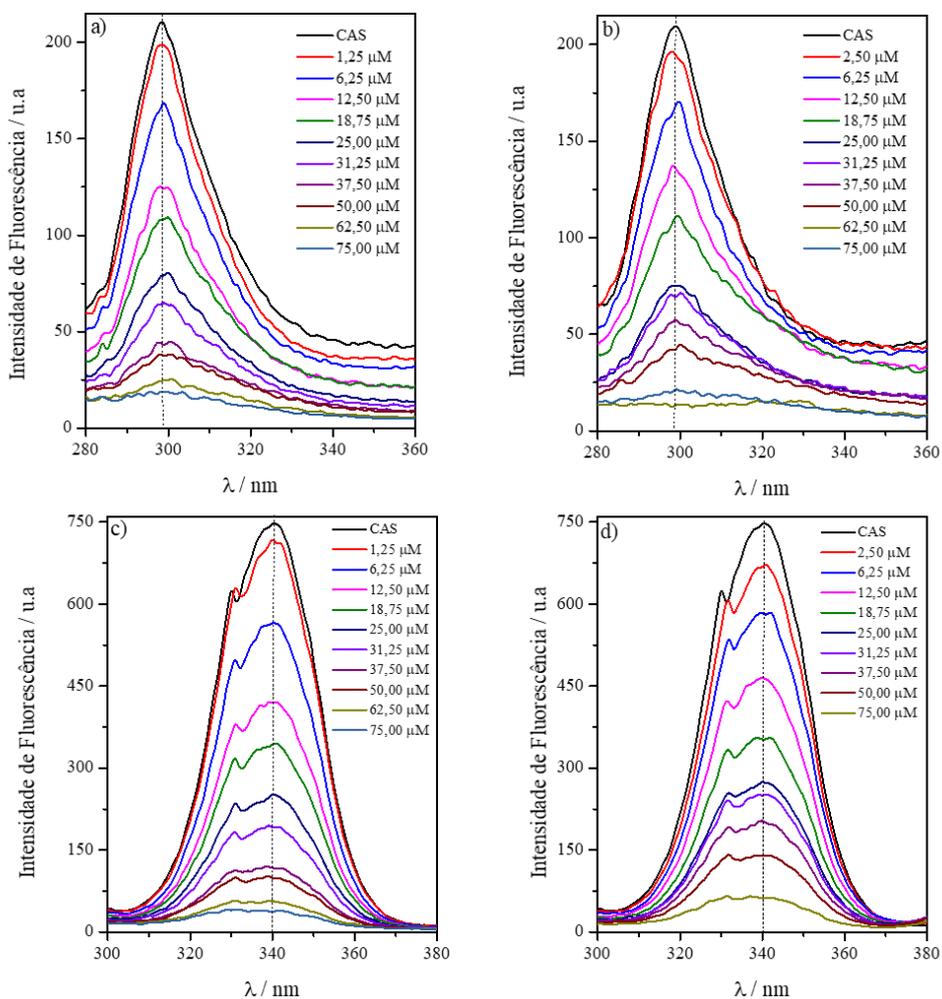
Figura 13- Gráfico de Van't Hoff para calcular os parâmetros termodinâmicos. Condições: CAS (2,8  $\mu\text{M}$ ), tetraciclina (0-84  $\mu\text{M}$ ), tampão fosfato 10 mM a pH=6,8 e 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

## APÊNDICE C

Figura 14- Fluorescência sincronizada para o resíduo de tirosina ( $\Delta\lambda= 15$  nm) com adição de incrementos de a) OTC e b) CTC e para o resíduo de triptofano ( $\Delta\lambda =60$  nm) com adição de incrementos de c) OTC e d) CTC. Condições: CAS (2,5  $\mu\text{M}$ ), tetraciclina (0-75  $\mu\text{M}$ ), tampão fosfato 10 mM a pH=6,8 e 30°C.



Fonte: elaborado pela autora, 2019.



## **8 ETAPA 2 - AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA CASEÍNA E LACTALBUMINA, PROTEÍNAS ALERGÊNICAS DO LEITE, COM SULFONAMIDAS EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.**

Este trabalho realizou uma avaliação da interação *in vitro* da caseína e  $\alpha$ -lactalbumina com medicamentos veterinários da classe das sulfonamidas (STZ e SMZ) empregando técnicas espectroscópicas e ensaios biológicos simulando as condições do alimento para avaliação dos parâmetros de ligação/termodinâmicos e alterações conformacionais das proteínas, visto que a interação com antibióticos, pode levar a mudanças na estrutura nativa da proteína, e desta forma, potencializar os efeitos alergênicos comuns a estas proteínas.

### **8.1 OBJETIVOS**

#### **8.1.1 Geral**

Avaliação da interação entre as proteínas lácteas caseína e  $\alpha$ -lactalbumina com antibióticos da classe das sulfonamidas (sulfatiazol e sulfametazina) simulando as condições do alimento visando obter os principais parâmetros que regem este processo de interação intermolecular.

#### **8.1.2 Específicos**

- a)** Determinar a estequiometria dos complexos proteína-ligante, parâmetros de ligação ( $K_{sv}$ ,  $K_d$  e  $K_b$ ) e termodinâmicos ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S$ ), assim como, avaliação do mecanismo preferencial de *quenching*, mudanças na estrutura da proteína por UV-vis, fluorescência sincronizada e fluorescência tridimensional, e calcular as distâncias intermoleculares entre STZ, SMZ e as proteínas CAS e LAC,
- b)** Avaliar a influência de espécies comuns presentes no leite no processo de interação entre caseína e sulfonamidas, além do índice de hidrofobicidade da proteína, e influência da temperatura de pasteurização;
- c)** Avaliar a influência do processo de interação com CAS e LAC nas propriedades antimicrobianas do STZ e STM frente a diferentes cepas bacterianas Gram positivas e negativas.

## 9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 9.1 Mecanismo de ligação e parâmetros termodinâmicos

As propriedades de fluorescência intrínseca das proteínas são sensíveis ao microambiente e têm sido amplamente empregadas para avaliar alterações conformacionais na estrutura destas macromoléculas. Os aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina são responsáveis pela fluorescência intrínseca das proteínas (JIA, 2017).

A caseína possui trinta e quatro resíduos de tirosina e seis de triptofano, (DEZHAMPANAH et al., 2017; YAZDI; CORREDIG, 2012), a lactalbumina possui cinco resíduos de tirosina e quatro de triptofano (MOHAMMADI; MOEENI, 2015) e desta forma, estes aminoácidos foram monitorados para avaliar a interação dessas proteínas com as sulfas (STZ e SMZ) por titulação espectrofluorimétrica. As intensidades de fluorescências da CAS livre (2,5  $\mu\text{M}$ ) e da LAC (5,0  $\mu\text{M}$ ) foram monitoradas a 342 e 337 nm, respectivamente, após excitação em 280 nm, na ausência e na presença de diferentes incrementos das sulfonamidas (0-100  $\mu\text{M}$ ) para CAS e (0-200  $\mu\text{M}$ ) para a LAC. Os espectros de fluorescência da CAS e LAC na ausência e na presença de quantidades crescentes de STZ (selecionada como modelo) estão apresentados nas Figuras 1a e 1d (Pág. 82).

Desta forma, a partir da Figura 1a foi observado que a caseína apresentou uma banda intensa e larga em 342 nm quando excitada a 280 nm, e após adição de concentrações crescentes de sulfatiazol houve supressão de fluorescência com deslocamento do máximo de emissão para 343 nm. Similarmente, de acordo com a Figura 1d verificou-se que a LAC apresentou uma banda intensa em 337 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ), e após adição de concentrações crescentes de STZ houve supressão de fluorescência com deslocamento do máximo de emissão para 340 nm. Estes resultados indicam que houve interação entre ambas proteínas e sulfatiazol com formação de complexos supramoleculares não-fluorescentes. A redução da intensidade do sinal e o deslocamento do comprimento de onda máximo para o vermelho indica que os resíduos de Trp, preferencialmente, foram expostos a um ambiente mais polar através do desdobramento das cadeias peptídicas das proteínas devido a interação com as sulfas (JIANG et al., 2018). Resultados similares foram obtidos para SMZ com ambas proteínas e estão sumarizados no Apêndice A (Pág. 106).

A avaliação do mecanismo de interação entre CAS e LAC e as respectivas sulfas STZ e SMZ foi realizada a partir da aplicação da equação de Stern-Volmer (equação 1).

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

onde  $F_0$  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 equivalente a  $(2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ ,  $\tau_0$  é o tempo de vida médio ( $10^{-8} \text{ s}$ ),  $[Q]$  é a concentração do ligante (*quencher*) e  $K_{SV}$  é a constante de *quenching* de Stern-Volmer (MAKARSKA-BIALOKOZ, 2017).

A constante de ligação  $K_b$  está relacionada com a força de interação entre macromolécula ligante e com o número de sítios ( $n$ ) de ligação entre as proteínas avaliadas e sulfas foi calculada de acordo com a equação 2:

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

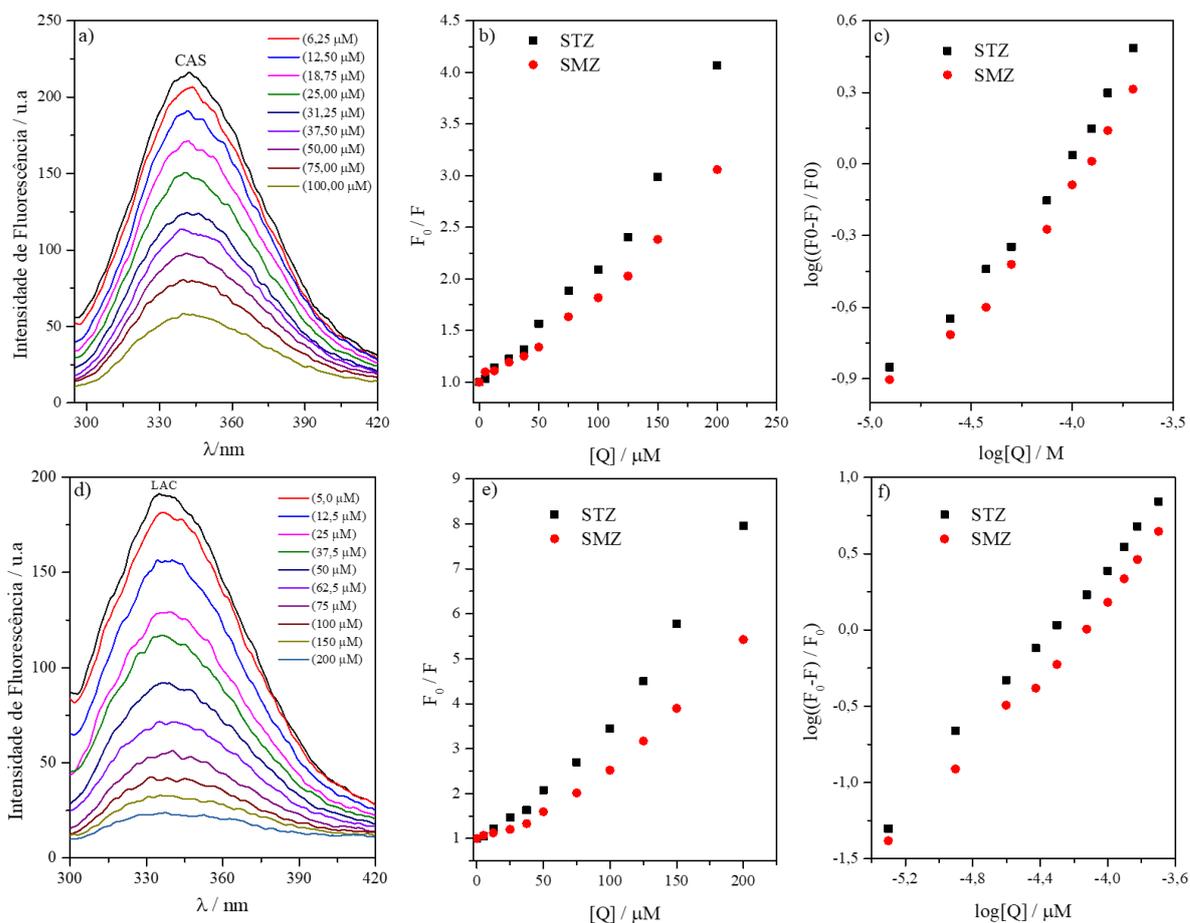
em que  $K_b$  é a constante de ligação,  $n$  o número de sítios de ligação na proteína (CAO et al., 2018).

A linearização das equações (1) e (2), apresentadas nas Figuras 1b e 1c (Pág. 82) para CAS, 1e e 1f referentes a LAC, foram utilizadas para calcular os parâmetros de ligação relacionados a  $K_{SV}$ ,  $K_b$  e  $n$  relacionados a formação dos complexos supramoleculares em diferentes temperaturas (23, 30 e 37°C). A Tabela 1 apresenta os resultados deste estudo.

A partir dos resultados (Tabela 1, pág. 83), foi observado que os valores da constante de *quenching* ( $K_{SV}$ ) diminuíram com o aumento da temperatura independente da proteína e do ligante, este fato indica que o processo de interação entre as sulfas e as proteínas CAS e LAC ocorreu por meio do mecanismo de *quenching* estático, conforme descrito na literatura (AN et al., 2017). De acordo com Allahdad et al. (2018), quando o  $K_q$  (constante de velocidade de *quenching* bimolecular difusional) for menor que  $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , ocorre mecanismo de *quenching* dinâmico, enquanto para valores de  $K_q$  superiores é indicativo de mecanismo de *quenching* estático. Os valores de  $K_q$  obtidos no estudo de *quenching* (Tabela 1, Pág. 83) variaram de 0,86 a  $3,27 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , o qual reforça que o processo de interação entre (STZ, SMZ) e as duas proteínas ocorreu por *quenching* estático. De acordo com a Tabela 1 (Pág. 83), os valores de  $K_b$  para SMZ e STZ variaram de 0,22 a  $0,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , para a interação com a CAS, enquanto para LAC foi de 3,16 a  $3,63 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente, a 30°C. Ao comparar os dois sistemas CAS-sulfas e LAC-sulfas foi observado que o sistema LAC-sulfas apresentou maiores valores de  $K_b$  em comparação com o sistema CAS-sulfas, o que indica que as sulfas avaliadas neste trabalho possuem maior afinidade pela LAC. Adicionalmente, são apresentados trabalhos da literatura na Tabela 2 (Pág. 84) com valores das constantes de ligação referentes a interação da lactalbumina com outros ligantes. Na primeira etapa deste trabalho é apresentado

uma comparativa dos valores das constantes de ligação referentes a interação de diferentes caseínas com outros ligantes em forma de tabela. (Tabela 2, Pág.45).

**Figura 1 – a, d) Perfil espectral da titulação espectrofluorimétrica da CAS (2,5  $\mu\text{M}$ ) e da LAC (5,0  $\mu\text{M}$ ) com sulfatiazol (STZ), b, c) Linearização da equação de Stern-Volmer, c, f) Linearização para cálculo da constante de ligação ( $K_b$ ) e número de sítios de ligação ( $n$ ). Condições: tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

A maior afinidade das sulfas avaliadas neste trabalho pela LAC pode ser explicada com base na sua estrutura proteica, uma vez que a lactalbumina é pequena em relação a caseína, que neste estudo a CAS está na forma de caseína micelar, ou seja, formada pelas subunidades ( $\alpha_1$ - ,  $\alpha_2$ - ,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína), e assim, a interação entre as sulfas e a LAC é mais facilitada. O número de sítios de ligação nos dois sistemas foi próximo à unidade, indicando a existência de apenas um local de ligação preferencial nas estruturas dos sistemas proteicos. Estes resultados corroboram com a literatura, onde Bani-Yaseen et al. (2011), avaliaram a interação entre sulfametazina e BSA, obtendo  $K_b = 3,24 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , Lyra (2017) avaliou a interação entre quatro sulfonamidas e ovalbumina, obtendo valores de  $K_b$  de 4,14 a  $27,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , para SMZ e STZ, respectivamente.

**Tabela 1 - Constante de Stern-Volmer, de ligação e parâmetros termodinâmicos da interação da CAS e LAC com sulfonamidas em diferentes condições de temperatura.**

Proteína	Ligante	T (°C)	Constante de Stern-Volmer		Constante de ligação			Parâmetros termodinâmicos			
			$K_{SV}$ ( $10^4 M^{-1}$ )	r	$K_q$ ( $10^{12} M^{-1} s^{-1}$ )	$K_b$ ( $10^5 M^{-1}$ )	n	r	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
CAS	STZ	23	1,30 ± 0,04	0,9933	1,30	0,49 ± 0,04	1,14 ± 0,03	0,9964	-26,77		
		30	1,28 ± 0,06	0,9894	1,28	0,35 ± 0,05	1,12 ± 0,05	0,9927	-25,96	- 60,79	-114,96
		37	1,26 ± 0,03	0,9951	1,26	0,16 ± 0,05	1,02 ± 0,05	0,9907	-25,16		
	SMZ	23	0,98 ± 0,05	0,9860	0,98	0,31 ± 0,04	1,14 ± 0,04	0,9950	-25,53		
		30	0,89 ± 0,03	0,9932	0,89	0,22 ± 0,04	1,10 ± 0,04	0,9950	-25,02	- 47,27	- 73,44
		37	0,86 ± 0,03	0,9891	0,86	0,13 ± 0,06	1,05 ± 0,06	0,9885	-24,50		
LAC	STZ	23	3,27 ± 0,03	0,9750	3,27	4,60 ± 0,04	1,31 ± 0,02	0,9971	-32,18		
		30	3,04 ± 0,02	0,9862	3,04	3,63 ± 0,02	1,28 ± 0,03	0,9973	-32,05	- 37,67	-18,55
		37	2,77 ± 0,02	0,9930	2,77	2,30 ± 0,04	1,23 ± 0,04	0,9954	-31,92		
	SMZ	23	2,02 ± 0,01	0,9899	2,02	5,34 ± 0,03	1,37 ± 0,06	0,9933	-32,51		
		30	1,87 ± 0,02	0,9845	1,87	3,16 ± 0,03	1,33 ± 0,07	0,9915	-31,79	- 62,96	- 102,88
		37	1,76 ± 0,06	0,9919	1,76	1,68 ± 0,07	1,26 ± 0,02	0,9996	-31,07		

Legenda: CAS = caseína / LAC = lactalbumina / STZ = sulfatiazol / SMZ = sulfametazina / T = temperatura /  $K_{SV}$  = constante de Stern-Volmer /  $K_q$  = constante de velocidade de *quenching* bimolecular difusional / r = coeficiente de correlação / n = número de sítios de ligação /  $\Delta G$  = energia livre de Gibbs /  $\Delta H$  = variação de entalpia /  $\Delta S$  = variação da entropia.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

**Tabela 2- Comparação de trabalhos na literatura com diferentes ligantes e  $\alpha$ -lactalbumina bovina**

Ligante	pH	$K_b$ ( $10^5 M^{-1}$ )	Houve alteração da estrutura nativa da proteína?	Forças de interação	Referência
Ácido clorogênico, Ácido cafeico Ácido ferúlico Ácido cumárico	7,4	32,2 43,0 9,60 68,3	Sim. Porcentagem de $\alpha$ -hélice foi reduzida.	-	Zhang et al., 2014
Vitamina D3	7,0	7,02	Sim. Estrutura secundária foi alterada e aumento da superfície hidrofóbica.	Forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas	Delavari et al., 2015
Trans-resveratrol	7,4	63,2	Sim. A estrutura conformacional foi alterada.	Ligações de hidrogênio	Mohammadi, Moeeni, 2015
Curcumina		14,7	Não.	Ligações de hidrogênio	
Bis-demetoxicurcumina	7,4	0,09	Sim	Ligações de hidrogênio	Mohammadi, Moeeni, 2016
Diacetilcurcumina		0,04	Sim	Interações hidrofóbicas	
Diacetilbisdemetoxicurcumina		0,02	Sim	Interações hidrofóbicas	
Epigallocatequina-3-galato	7,2	0,18	Sim. A porcentagem de $\alpha$ - hélice foi reduzida enquanto que o conteúdo de folha- $\beta$ aumentado.	-	Al-Hanish et al., 2016
Cinamaldeído	7,5	5,88	-	Interações hidrofóbicas	Asghari et al., 2017
STZ	6,8	3,63	Sim	Ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals	Este trabalho
SMZ	6,8	3,16			

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Os parâmetros termodinâmicos foram calculados a partir dos valores de  $K_b$  obtidos nas diferentes temperaturas e, assim, estabelecer as principais forças de interação entre CAS, LAC e as sulfas, além da espontaneidade da interação. Os parâmetros termodinâmicos como  $\Delta H$  e  $\Delta S$  apresentados na Tabela 1 (Pág. 83) foram calculados de acordo com a linearização da equação de Van't Hoff (BAGHERI; FATEMI, 2018)

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

Onde T é a temperatura em Kelvin (K) e R é a constante do gás ideal. A energia livre de Gibbs foi calculada pela equação (4):

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

Os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S$ ) foram calculados e são apresentados na Tabela 1. De acordo com Rudra et al. (2018), a relação entre as forças envolvidas no processo de interação e entalpia e entropia são:  $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$  (forças hidrofóbicas);  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S > 0$  (forças eletrostáticas), enquanto  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$  (ligação de hidrogênio e forças de Van der Waals). Com relação aos parâmetros termodinâmicos, os valores de  $\Delta H$  foram negativos, o que indica que os processos de interação entre as sulfas e CAS, LAC foram espontâneos. Quanto as forças preferenciais de interação, as sulfas apresentaram valores de  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$ , indicando que as interações são gerenciadas por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals independente da sulfa avaliada. Os valores de  $\Delta G$  obtidos para todos os casos foram negativos (Tabela 1) indicando que os processos de interação dos sistemas (CAS-sulfas e LAC-sulfas) foram termodinamicamente espontâneos.

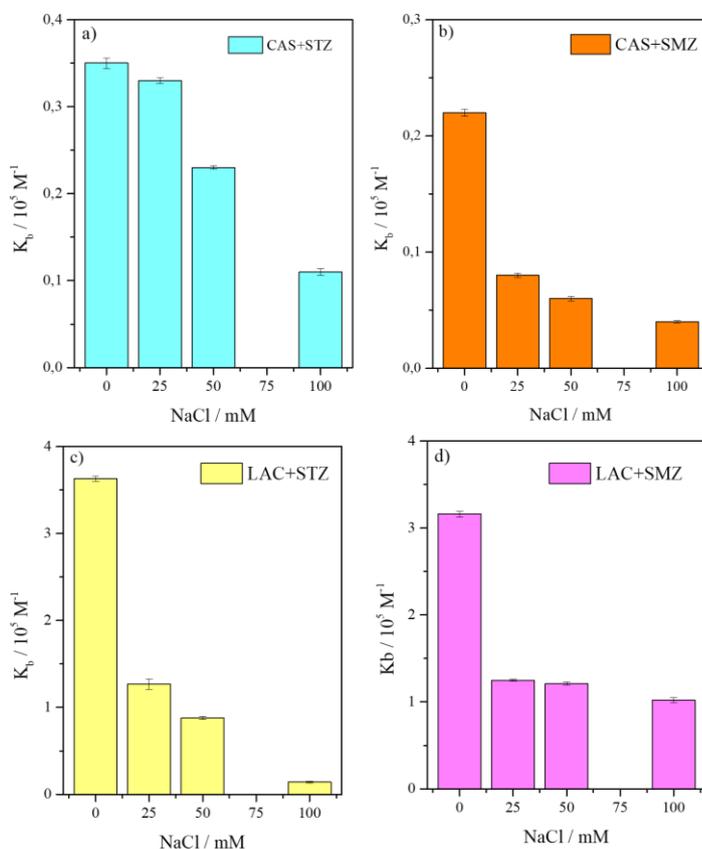
As forças de interações entre as sulfonamidas e as proteínas CAS e LAC podem ser explicadas com base na distribuição de espécies em função do pH, uma vez que as moléculas avaliadas são derivadas de ácidos fracos. Estas apresentam dois valores de  $pK_a$ , assim, podem ser encontradas em solução em três formas distintas:  $H_2SF^+$  (carga positiva,  $pH < pK_{a1}$ ),  $HSF$  (carga neutra,  $pK_{a1} < pH < pK_{a2}$ ) e  $SF^-$  (carga negativa,  $pH > pK_{a2}$ ) (HOFF, 2008), como já apresentado anteriormente.

O sulfatiazol ( $pK_{a1} = 2,06$  e  $pK_{a2} = 7,07$ ) e a sulfametazina ( $pK_{a1} = 2,46$  e  $pK_{a2} = 7,45$ ) possuem  $pK_{a2}$  superiores a 6,8 (pH dos sistemas), e desta forma, encontram-se na forma neutra, enquanto que neste valor de pH, as proteínas (caseína e lactalbumina) possuem carga global negativa ( $pI = 4,6$  e  $4,2$ , respectivamente), pois  $pH > pI$ . Desta forma, em pH de 6,8 as duas proteínas estão carregadas negativamente e as sulfonamidas estão com carga neutra, assim, as

interações eletrostáticas são menos eficazes, com as ligações de hidrogênio e as forças de Van der Waals sendo predominantes.

A influência da força iônica foi avaliada para confirmar se as interações eletrostáticas atuam na ligação CAS-sulfas e LAC-sulfas. De acordo com Liang et al. (2008) o aumento da força iônica do meio leva ao desfavorecimento da interação entre as cargas. Para tal, foi avaliada a variação de  $K_b$  em função da concentração de NaCl (0-100 mM) no meio. A partir dos resultados (Figura 2) foi possível observar que com o aumento da força iônica houve redução das constantes de ligação dos dois sistemas, independente da proteína e da sulfas avaliada, com variação de 69 e 81% para os sistemas CAS-STZ e CAS-SMZ, respectivamente, e de 98 e 67% para os sistemas LAC-STZ e LAC-SMZ, respectivamente, quando comparadas com a condição na ausência de NaCl. Desta forma, esses resultados confirmam que os complexos formados entre as proteínas (CAS e LAC) e as sulfas (STZ e SMZ) também são estabilizados por interações eletrostáticas, visto que, a adição de NaCl aos sistemas CAS-sulfas e LAC-sulfas neutraliza grupos carregados das proteínas e sulfas, e dessa maneira, impedem o processo de interação (KASPCHAK; MAFRA; MAFRA, 2018).

**Figura 2 - Efeito da adição de NaCl (0-100 mM) na interação dos complexos entre a) CAS e STZ, b) CAS e SMZ, c) LAC e STZ e d) LAC e SMZ. Condições: CAS (2,5  $\mu$ M), LAC (5,0  $\mu$ M), Sulfas 0-200  $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

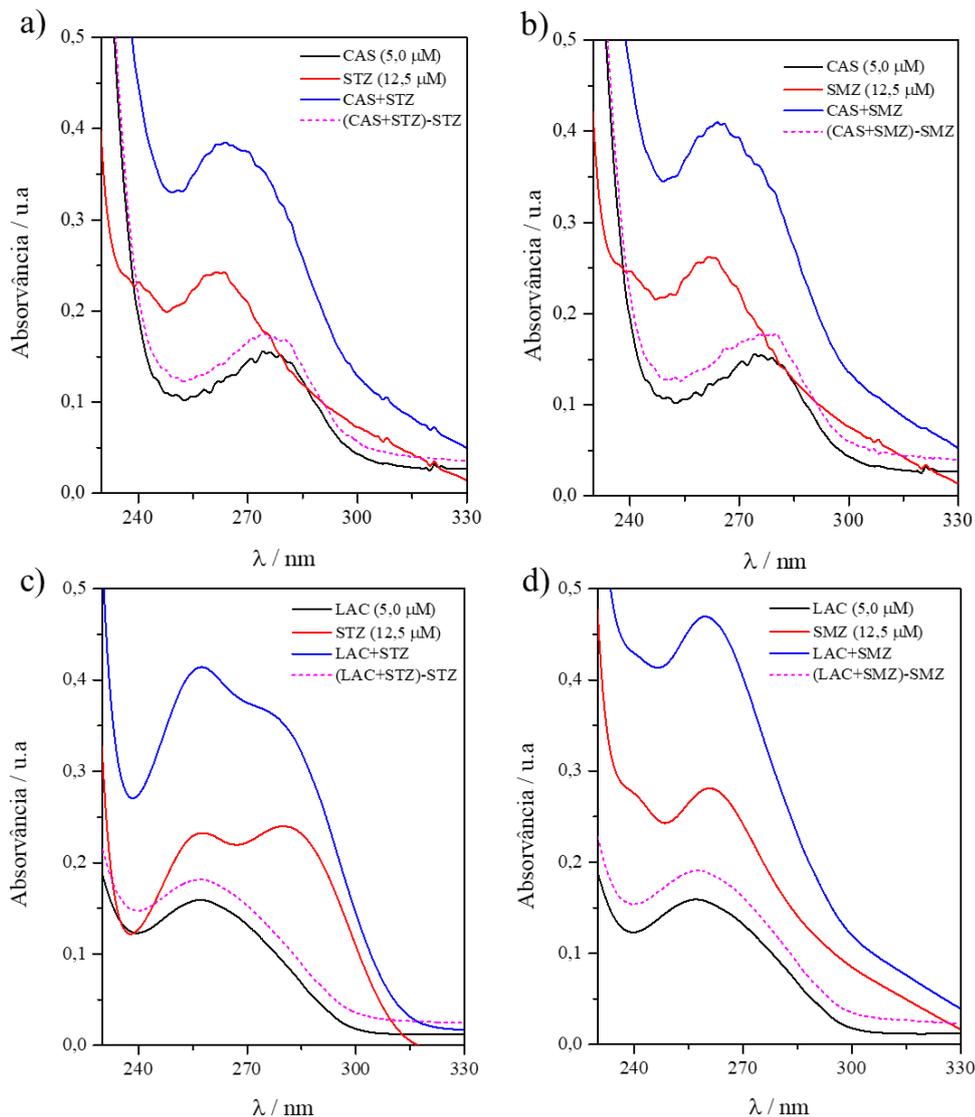
## 9.2 Avaliação da interação por UV-vis

Para confirmar a formação de complexos e observar possíveis alterações nas estruturas da caseína e lactalbumina na presença de STZ e SMZ realizou-se estudos empregando a absorção molecular no UV-vis. Neste estudo, foi avaliado o efeito da adição das sulfas (STZ e SMZ) as biomoléculas CAS e LAC. Os resultados estão sumarizados na Figura 3.

Os máximos de absorção da CAS em 278 nm e da LAC em 258 nm estão relacionados aos resíduos de Trp e Tir, e estes aminoácidos apresentam preferencialmente transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ . A adição de STZ a solução de caseína (CAS + STZ) resultou num aumento da intensidade de absorvância (efeito hiperacrômico) acompanhado de um deslocamento para menores comprimentos de onda em comparação ao espectro da CAS livre (efeito hipsocrômico). Para a lactalbumina, a adição de STZ (LAC + STZ) ocasionou aumento da intensidade de absorvância (efeito hiperacrômico) em comparação ao espectro da LAC livre. Adicionalmente, observou-se que os espectros de absorção resultantes das subtrações dos espectros dos complexos supramoleculares e do STZ livre [(CAS + STZ) - STZ] e [(LAC + STZ) - STZ] não foram sobreponíveis ao espectro da STZ livre, confirmando a formação de complexos supramoleculares no estado fundamental entre CAS-STZ e LAC-STZ. Esses resultados confirmam o mecanismo preferencial de interação por *quenching* estático nos dois sistemas (ZHANG et al., 2018) pois as alterações correm no estado fundamental, o que foi previamente indicado através dos estudos por fluorescência molecular. Resultados similares foram obtidos para os sistemas CAS-SMZ e LAC-STZ e LAC-SMZ e estão sumarizadas nas Figuras 3b, 3c e 3d. Na Tabela 3 (Pág. 88) estão apresentadas as variações dos valores de absorvâncias.

Como observado a variação calculada  $\Delta A = A_{\text{complexo}} - (A_{\text{proteína}} + A_{\text{sulfonamida}})$  nunca foi igual a zero, indicando que para todos os sistemas ocorreu a formação do complexo entre proteína-ligante. Este perfil foi mantido nos dois comprimentos de onda monitorados. Selecionou-se as bandas originais das proteínas, em que 278 nm corresponde a CAS e 258 nm a LAC, e ~262 nm (com variações de  $\pm 5$  nm a depender da estrutura do composto) para as sulfonamidas. Em ambos os casos o perfil observado foi similar, conforme apresentado na Tabela 3, onde as variações observadas são atribuídas as alterações na estrutura conformacional das duas proteínas estudadas.

**Figura 3 - Estudo por UV-vis do processo de interação de STZ e SMZ com CAS e LAC. Condições: CAS (5,0  $\mu\text{M}$ ), LAC (5,0  $\mu\text{M}$ ), sulfas (12,5  $\mu\text{M}$ ), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

**Tabela 3. Valores de absorvância para as sulfonamidas avaliadas, CAS, LAC e complexos CAS-sulfonamidas e LAC-sulfonamidas. Condições: CAS (5,0  $\mu\text{M}$ ), LAC (5,0  $\mu\text{M}$ ) sulfonamidas (12,5  $\mu\text{M}$ ), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C.**

Proteína	Ligante	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$A_{\text{ligante}}$	$A_{\text{proteína}}$	Comparação		
					$A_{\text{ligante}} + A_{\text{proteína}}$	$A_{\text{complexo}}$	$\Delta A^*$
CAS	STZ	278 (P)	0,169	0,148	0,317	0,324	+ 0,007
		262 (L)	0,242	0,123	0,365	0,383	+ 0,002
	SMZ	278 (P)	0,161	0,148	0,309	0,339	+ 0,030
		262 (L)	0,262	0,123	0,385	0,405	+ 0,020
LAC	STZ	258 (P)	0,233	0,159	0,392	0,414	+ 0,022
		257 (L)	0,232	0,159	0,391	0,414	+ 0,023
	SMZ	258 (P)	0,277	0,159	0,436	0,468	+ 0,032
		261 (L)	0,281	0,155	0,436	0,468	+ 0,032

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

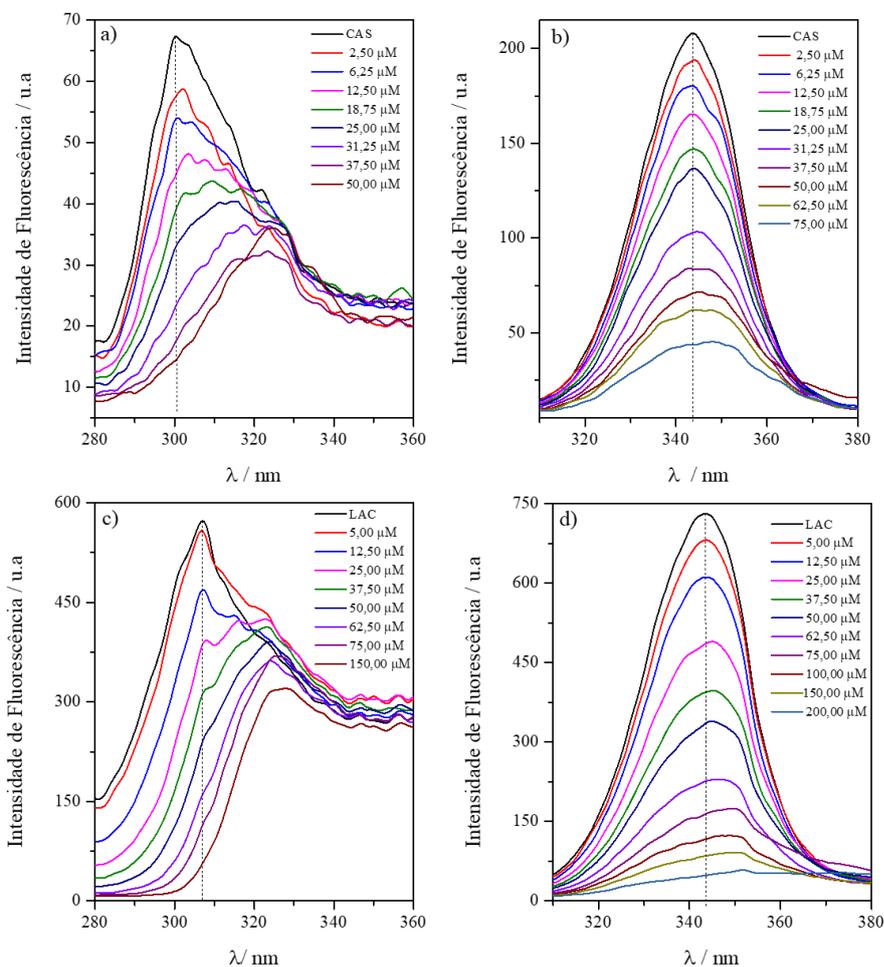
Fonte: elaborado pela autora, 2019.

### 9.3 Avaliação de alterações conformacionais nas estruturas da CAS e LAC

#### 9.3.1 Fluorescência sincronizada

O estudo por fluorescência sincronizada foi realizado para monitorar separadamente os resíduos de tirosina (Tir) e triptofano (Trp) presentes na CAS e LAC, e observar mudanças na polaridade do microambiente desses fluoróforos na presença de diferentes incrementos de STZ e SMZ. Para isto, manteve-se constante um determinado intervalo de comprimento de onda entre os monocromadores de excitação e emissão ( $\Delta\lambda$ ). Assim, um  $\Delta\lambda = 15$  nm fornece informações acerca do resíduo de Tir, e  $\Delta\lambda = 60$  nm corresponde ao resíduo de Trp (SIDIQI et al., 2017). Para esta avaliação foi utilizada como parâmetro a constante Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) com base nos respectivos valores de  $\Delta\lambda$ . Os resultados para a interação do STZ com CAS e LAC estão apresentados na Figura 4. Resultados similares foram obtidos para sulfametazina e estão apresentados no (Apêndice B, pág. 107). A Tabela 4 apresenta os Valores de  $K_{SV}$  da titulação por fluorescência sincronizada entre CAS, LAC e as sulfonamidas avaliadas.

**Figura 4 – Titulação empregando fluorescência sincronizada para o resíduo de tirosina referentes a) CAS e C) LAC e o resíduo de triptofano de b) CAS e d) LAC com adição de STZ (0-200  $\mu$ M). Condições: CAS (2,5  $\mu$ M), LAC (5,0  $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Os resultados relativos a titulação de CAS e LAC por STZ obtidos quando  $\Delta\lambda = 15$  nm estão apresentados nas Figuras 4a e 4c, respectivamente. E os dados relativos a titulação da CAS e LAC por STZ quando  $\Delta\lambda = 60$  nm estão apresentados nas Figuras 4b e 4d, respectivamente. Ao adicionar concentrações crescentes de STZ foi observado redução na intensidade de fluorescência para os resíduos de Tir e Trp de ambas proteínas, além disso, foi possível observar deslocamentos para o vermelho de 23 e 20 nm ( $\Delta\lambda = 15$  nm) e de 2 e 8 nm ( $\Delta\lambda = 60$  nm) relativo ao comprimento de onda máximo de emissão de CAS e LAC, respectivamente (Tabela 4). Estes resultados sugerem que os microambientes dos resíduos de (Tir e Trp) foram alterados aumentando a polaridade devido a uma maior exposição ao solvente (água), resultante de mudança conformacional das proteínas avaliadas na presença do ligante (DANTAS et al., 2017).

**Tabela 4 - Valores de  $K_{SV}$  da titulação por fluorescência sincronizada entre CAS (2,5  $\mu$ M), LAC (5,0  $\mu$ M) e as sulfonamidas avaliadas. Condições: tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C.**

Proteína	Ligante	$\Delta\lambda$ (nm)	$K_{SV}$ ( $10^4 M^{-1}$ )	Varição (nm)
CAS	STZ	15	$5,62 \pm 0,02$	+23
		60	$3,08 \pm 0,04$	+02
	SMZ	15	$2,90 \pm 0,05$	+28
		60	$1,60 \pm 0,03$	+05
LAC	STZ	15	$5,03 \pm 0,03$	+20
		60	$4,07 \pm 0,04$	+08
	SMZ	15	$2,79 \pm 0,03$	+22
		60	$1,57 \pm 0,02$	+07

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

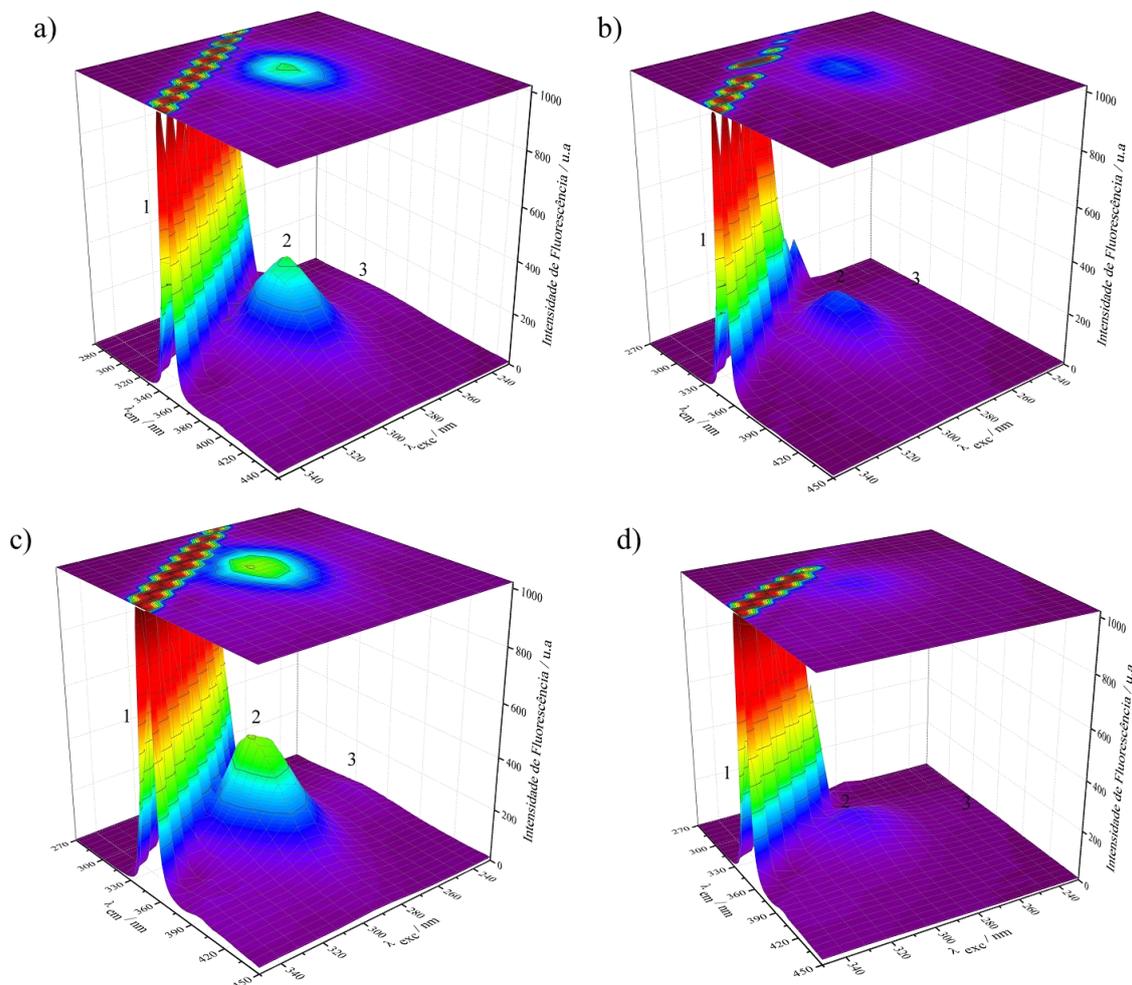
Por fim, baseado nos valores de  $K_{SV}$  calculados (Tabela 4) para os dois sistemas, CAS-sulfas e LAC-sulfas, verificou-se que os resíduos de Tir de ambas proteínas influenciam mais no processo de interação quando comparados com os resíduos de Trp, indicando maior proximidade entre estes resíduos e o sítio de ligação dos complexos supramoleculares formados.

### 9.3.2 Fluorescência tridimensional

Para avaliar alterações na estrutura secundária da CAS e LAC, e no microambiente dos seus resíduos de aminoácidos (Tir e Trp) induzidas pela interação com as sulfonamidas empregou-se estudos por fluorescência tridimensional (3D) na ausência na presença das sulfas (WANG et al., 2017) simulando as condições *in natura* do leite (pH 6,8). Os resultados para a caseína e lactalbumina na ausência e na presença de sulfatiazol estão apresentados na Figura 5. Resultados similares foram obtidos para as duas proteínas e SMZ e estão apresentados no Apêndice C (Pág. 108). Os parâmetros relacionados aos espectros 3D obtidos referentes à

posição e intensidade dos picos de máxima emissão de fluorescência e efeito Stokes para interação entre CAS e as duas sulfas estão sumarizados na Tabela 5.

**Figura 5 - Espectros de fluorescência tridimensional para a) CAS, b) CAS + STZ, c) LAC e d) LAC + STZ. Condições: CAS (2,5  $\mu$ M), LAC (5,0  $\mu$ M), STZ (25 e 50  $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 a 30°C.**



Legenda: 1 = dispersão Rayleigh, 2 = emissão dos resíduos de Trp e Tir e 3 = fluorescência de excitação dos estados eletrônicos mais excitados dos resíduos de aminoácidos aromáticos na proteína.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Os gráficos de fluorescência 3D da CAS e da LAC livres (Figuras 5a e 5c) apresentam três picos. O pico 1 que corresponde ao espalhamento Rayleigh caracterizado pela re-emissão de radiação ( $\lambda_{ex} = \lambda_{em}$ ). O pico 2 que está relacionado a emissão dos resíduos de triptofano e tirosina (ALI; AL-LOHEDAN, 2018), e o pico 3, que era referido a emissão do esqueleto polipeptídico da proteína, foi recentemente contestado. O pico 3 também foi atribuído à fluorescência de excitação dos estados eletrônicos de maior energia dos resíduos de aminoácidos aromáticos na proteína (REN G. et al., 2019).

De acordo com os resultados (Figura 5b) foi observado redução na intensidade de fluorescência dos picos 2 (44%) e 3 (47%) para a CAS após adição de STZ. Efeito similar foi

observado para LAC após adição de STZ (Figura 5d), onde a redução na intensidade de fluorescência dos picos 2 e 3 foram de 72 e 70%, o qual indicam alterações no microambiente dos resíduos de Tir e Trp e modificação nas estruturas nativas das duas proteínas (SANTANA et al., 2019). Mudanças espectrais similares foram observadas nos espectros 3D para CAS e LAC na presença de SMZ. Para a CAS os picos 2 e 3 foram reduzidos em 42 e 65%, respectivamente. No caso da LAC, os picos 2 e 3 foram reduzidos em 62 e 81%, respectivamente.

**Tabela 5. Parâmetros relacionados a fluorescência 3D para interação entre CAS, LAC e sulfonamidas avaliadas. Condições: CAS (2,5  $\mu$ M), LAC (5,0  $\mu$ M), STZ e SMZ (25 e 50  $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C.**

Proteína	Ligante	Pico	Posição ( $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ )	Deslocamento Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	Intensidade de fluorescência (u. a)	
CAS	-	1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-	
		2	285 / 339	54	323 (100%)	
		3	238 / 338	100	49 (100%)	
	STZ	1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-	
		2	285 / 340	55	179 (44%)	
		3	238 / 338	100	26 (47%)	
	SMZ	1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-	
		2	285 / 341	56	217 (42%)	
		3	238 / 335	97	17 (61%)	
	LAC	-	1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-
			2	294 / 341	47	415 (100%)
			3	238 / 339	101	57 (100%)
STZ		1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-	
		2	294 / 342	48	116 (72%)	
		3	238 / 341	103	17 (70%)	
SMZ		1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	-	
		2	294 / 343	49	157 (62%)	
		3	238 / 340	102	11 (81%)	

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Estes resultados indicam que ocorreu interação entre as sulfas (STZ e SMZ) e as duas proteínas (CAS e LAC). O qual pode ter ocorrido em função dos desdobramentos das cadeias polipeptídicas das proteínas ao interagirem com as duas sulfas (STZ e SMZ), o qual alteraram os microambientes, as estruturas e os graus de enovelamentos originais das biomoléculas avaliadas neste estudo (WANG et al., 2015), e assim, pode potencializar os efeitos alergênicos.

#### 9.4 Ensaio de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)

Empregou-se estudos de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) para avaliar a distância de transferência de energia que ocorre na interação entre os

resíduos de triptofano/tirosina das proteínas (CAS e LAC) (doadoras) e STZ e SMZ (receptores). Em geral, a eficiência do processo de FRET depende principalmente dos seguintes parâmetros: (i) a distância ( $r_0$ ) entre os doadores (CAS e LAC) e os receptores (STZ e SMZ) que deve estar entre (2 - 8 nm); (ii) sobreposição entre os espectros de fluorescência dos doadores (CAS e LAC) e absorção dos receptores (sulfonamidas); e (iii) orientação apropriada dos dipolos dos doadores e receptores (METI et al., 2015).

A distância ( $r_0$ ) entre os doadores (proteínas) e os receptores (sulfonamidas) pode ser calculada de acordo com a teoria de Förster utilizando a equação (5):

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

Onde  $E$  é a fração de energia transferida do doador para o receptor,  $r_0$  é a distância entre o ligante e o doador, e  $R_0$  é distância crítica, quando 50% da energia de emissão do doador é transferida para o receptor (BUDDANAVAR et al., 2017). A distância crítica ( $R_0$ ) é descrita como:  $\Phi$

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

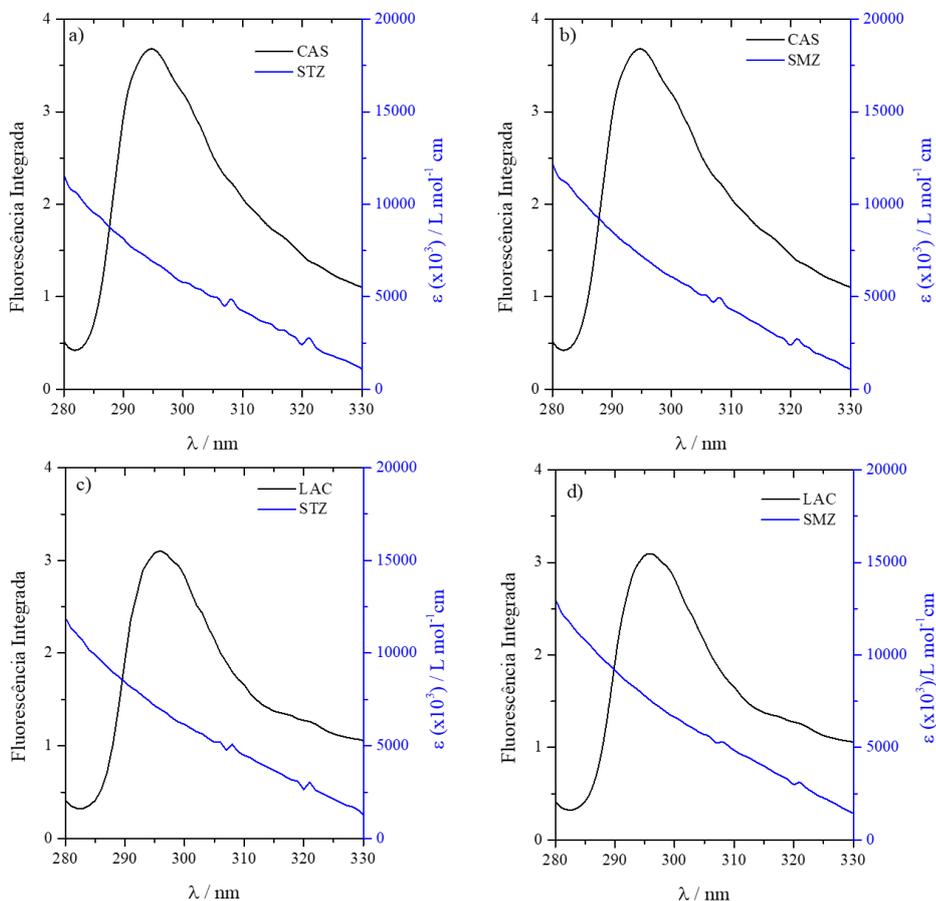
Onde  $K^2$  (igual a 2/3 para ambos os sistemas) é a orientação dipolo do doador e do receptor,  $N$  é o índice de refração médio,  $\Phi$  é o rendimento quântico de fluorescência da proteína e  $J$  representa a área de sobreposição do espectro de emissão normalizado do doador em relação ao espectro de absorção de receptor (ARIGA et al., 2016). Neste caso,  $N = 1,53$  e  $\Phi = 0,015$  para caseína (MEHRANFAR et al., 2013), enquanto para lactalbumina,  $N = 1,336$  e  $\Phi = 0,4$  (MOHAMMADI; MOEENI, 2015).

A área de sobreposição ( $J$ ) pode ser calculada pela equação (7):

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda}{\sum F(\lambda) \Delta \lambda} \quad \text{equação (7)}$$

Nesta equação,  $F(\lambda)$  é a fluorescência do doador, e  $\varepsilon(\lambda)$  é o coeficiente de absorção molar do receptor, que pode ser obtido pela lei de Beer (CHAVES et al., 2017). Desta forma, foi avaliada a área de sobreposição dos espectros de fluorescência das duas proteínas livre, espectro de absorção molecular das duas sulfas, os gráficos de sobreposição espectral entre as duas proteínas (CAS, LAC) e as sulfas (STZ e SMZ) estão apresentados na Figura 6. Os parâmetros calculados relacionados ao processo FRET estão apresentados na Tabela 6.

**Figura 6 - Sobreposição espectral da emissão de fluorescência da CAS com o espectro de absorção de a) STZ, b) SMZ, e sobreposição espectral da emissão de fluorescência da LAC com o espectro de absorção de c) STZ, d) SMZ. Condições: CAS (2,5  $\mu\text{M}$ ), LAC (5,0  $\mu\text{M}$ ), sulfonamidas (12,5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ ), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

**Tabela 6 - Parâmetros de FRET da interação entre sulfonamidas com CAS e LAC.**

Proteína	Ligante	$J$ ( $10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ M}^{-1}$ )	E (%)	$R_0$ (nm)	$r_0$ (nm)
CAS	STZ	3,41	7,90	1,33	1,99
	SMZ	3,59	12,9	1,34	1,84
LAC	STZ	3,63	20,3	2,53	3,18
	SMZ	3,97	24,3	2,57	3,11

Legenda:  $J$  = área de sobreposição do espectro de emissão normalizado doador em relação espectro de absorção do receptor /  $E$  = fração de energia transferida do doador para o receptor /  $R_0$  = distância crítica quando 50% da energia de emissão do doador é transferida para o receptor /  $r_0$  = distância entre o ligante e o doador.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

De acordo com os resultados (Tabela 6), a energia transferida ( $E$ ) variou de 7,9 a 24,3%, exibindo transferência de energia menor que 50%, e portanto,  $R_0 < r_0$ . Os valores das distâncias críticas de STZ foram 1,99 e 3,18 nm para CAS e LAC, respectivamente, enquanto para SMZ de 1,84 nm para CAS e 3,11 nm para LAC. Deste modo, a distância crítica  $r_0$  entre as sulfonamidas e os resíduos de triptofano/tirosina da CAS e da LAC foram inferiores a 8 nm,

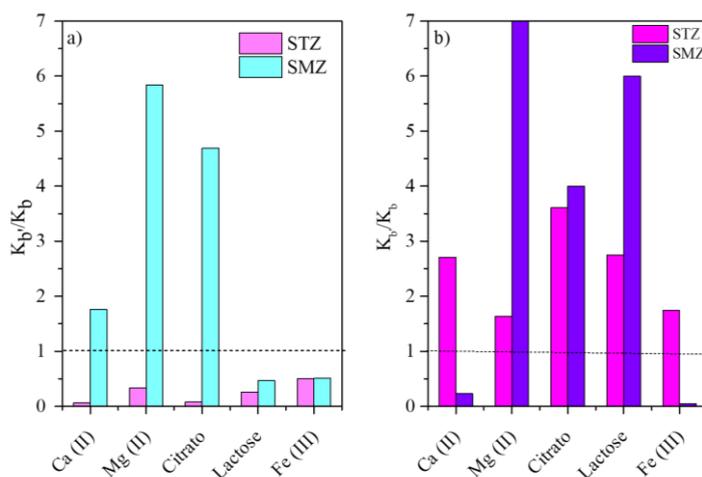
indicando que a transferência de energia entre as macromoléculas e as sulfonamidas ocorrem com alta probabilidade, e como  $R_0 < r_0$  é um indicio de interação por *quenching* estático para os dois sistemas, CAS-sulfas e LAC-sulfas (SURYAWANSHI et al., 2016). Desta forma, os valores das distâncias críticas obtidos para os quatro sistemas de interação avaliados neste estudo são concordantes com trabalhos reportados na literatura. Chen et al. (2012) avaliaram a interação entre sulfametazina e BSA encontrando valor de  $r_0 = 3,07$  nm.

## 9.5 Ensaios de competição

### 9.5.1 Avaliação da influência de espécies competidoras no processo de interação

Nesta etapa foi avaliada a influência de algumas espécies encontradas naturalmente no leite ou acrescentada comercialmente, como o Fe(III), no processo de interação para os sistemas CAS-sulfas e LAC-sulfas. A influência das espécies Ca(II), Mg(II), citrato, Fe(III) e lactose na interação de CAS e LAC com as sulfonamidas foi avaliada. Para isto, empregou-se a concentração de cada espécie competidora com base nas condições *in natura* do leite, as concentrações das espécies competidoras foram: Ca(II) (62,5  $\mu$ M), Mg(II) (11,3  $\mu$ M), citrato (20  $\mu$ M) e lactose (295  $\mu$ M) (KALYANKAR et al., 2016). Para os íons Fe(III), foi utilizada a concentração de 1,0  $\mu$ M conforme descrita no rótulo de leite comercial enriquecido com este mineral. A razão da constante de ligação na presença do competidor ( $K_b'$ ) e na ausência ( $K_b$ ) foi utilizada como parâmetro para comparação. Desta forma, quando esta razão for maior que a unidade indica que o competidor favoreceu o processo de interação, e contrariamente, quando a razão for menor que a unidade indica que o competidor interfere no processo de interação. Os resultados estão apresentados nas Figuras 7a e 7b.

**Figura 7 - Efeito da presença de espécies competidoras no processo de interação entre a)CAS, b)LAC e sulfas. Condições: CAS (2,5  $\mu$ M), LAC (5,0  $\mu$ M), competidores ( $\mu$ M): Ca(II) = 62,5, Mg(II) = 1,3, lactose = 295, citrato = 20 e Fe(III) = 1,0; sulfonamidas (0 - 200  $\mu$ M), tampão fosfato 10mM a pH 6,8, e 30°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

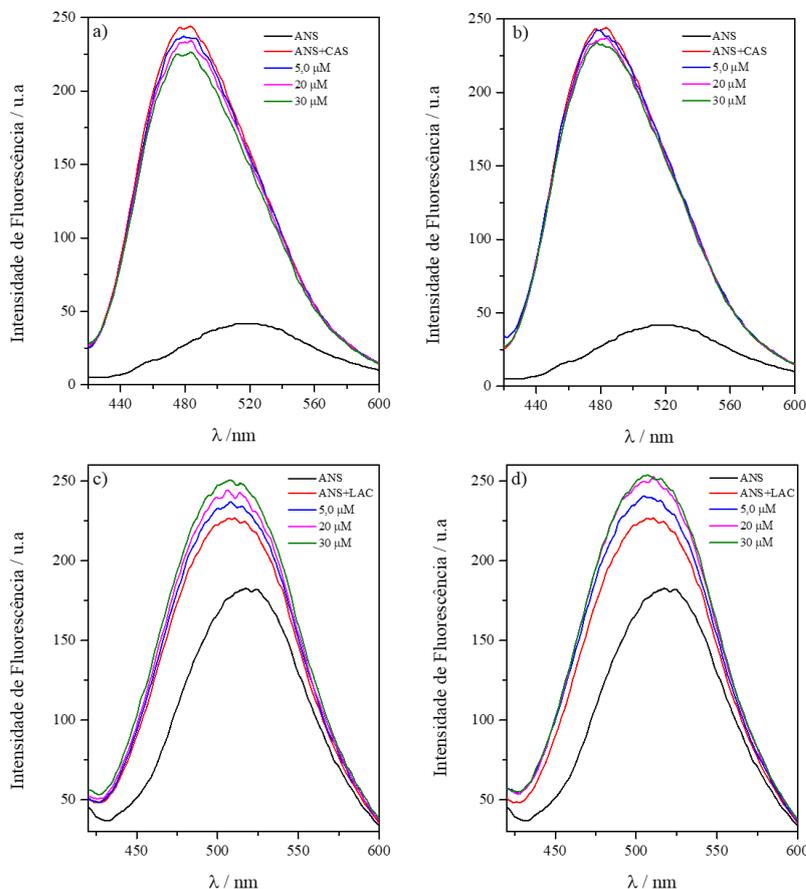
Como observado na Figura 7a para o sistema CAS-STZ todas as espécies adicionadas interferiram no processo de interação entre a proteína e STZ. E para o sistema LAC-SMZ (Figura 9b), Ca(II) e Fe(III) interferiram no processo de interação entre a lactalbumina e SMZ. O qual indica que houve competição entre as espécies adicionadas e as sulfas (STZ e SMZ) pelo mesmo sítio de ligação da CAS e da LAC (LI; ZHANG, JI, 2014). Em contrapartida, para o sistema CAS-SMZ (Figura 9a) a adição de Ca(II), Mg(II) e citrato aumentaram os valores da constante de ligação  $K_b$ . E Para o sistema LAC-STZ (Figura 7b) todas as espécies adicionadas favoreceram a interação. Isto pode estar associado a mudanças conformacionais nas estruturas da CAS e da LAC induzidas pela ligação destas espécies, tornando mais favorável a ligação das sulfonamidas as proteínas avaliadas (LI, 2017).

#### 9.5.2 Avaliação do índice de hidrofobicidade das proteínas caseína e lactalbumina

O ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato (ANS) é utilizado como uma sonda fluorescente para avaliar a hidrofobicidade superficial de diversas proteínas. Esta apresenta baixa fluorescência intrínseca em meio aquoso, contudo, ao se ligar a regiões hidrofóbicas de proteínas a intensidade de emissão de fluorescência é aumentada (GUAN et al., 2018). Diante disto, o ANS foi utilizado como uma espécie competidora no processo de interação entre as duas macromoléculas e as sulfas, a fim de verificar se ocorria mudança no perfil de hidrofobicidade das mesmas no processo de interação com STZ e SMZ. Nesta etapa os sistemas CAS-ANS e LAC-ANS foram avaliados frente a adição de diferentes concentrações das sulfonamidas. Visto que, se o sítio de ligação das sulfonamidas em ambas proteínas for próximo ou similar ao do ANS, ocorrerá uma competição e, desta maneira, a intensidade de fluorescência do sistema CAS-ANS e LAC-ANS podem ser afetadas pelos ligantes (GONZALEZ; MIKSOVSKA, 2014). Os resultados para estes estudos estão mostrados na Figura 8.

A partir dos resultados (Figuras 8a - 8d), observou-se que o ANS livre apresentou baixa intensidade de fluorescência, contudo, na presença da CAS e da LAC a intensidade de fluorescência do ANS aumentou, indicando ligação entre a CAS, LAC e ANS. Para o sistema CAS-sulfas (Figuras 8a e 8b), observou-se que a adição do excesso de seis vezes (30  $\mu$ M) das sulfonamidas em relação a concentração da proteína, levou a uma redução máxima de 2,4 e 4,3 % para STZ e SMZ, respectivamente, quanto a intensidade de fluorescência do complexo CAS-ANS. Este comportamento indica que STZ e SMZ não deslocaram de forma efetiva a sonda ANS dos sítios hidrofóbicos da macromolécula (SANTOS et al., 2018).

**Figura 8 - Espectro de emissão dos sistemas proteína-ANS sob diferentes concentrações de: CAS-ANS frente a) STZ e b) SMZ, e LAC-ANS para c) STZ e d) SMZ. Condições: ANS (60  $\mu\text{M}$ ), CAS (5,0  $\mu\text{M}$ ), LAC= (5,0  $\mu\text{M}$ ), STZ e SMZ (0–30  $\mu\text{M}$ ), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8 e 30°C. Janelas de excitação e emissão (CAS-sulfas = 5-5) e (LAC-sulfas = 10-5).**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

No caso do sistema LAC-ANS (Figuras 8c e 8d), a adição das sulfonamidas resultou no aumento da intensidade de fluorescência, em ambos os casos. Esses resultados, sugerem que o aumento na intensidade de fluorescência do sistema LAC-ANS após adição das sulfas ocorreu em função do aumento de sítios hidrofóbicos na proteína após interação, o qual resulta em alterações conformacionais na estrutura da proteína (ALI; AL-LOHEDAN, 2016).

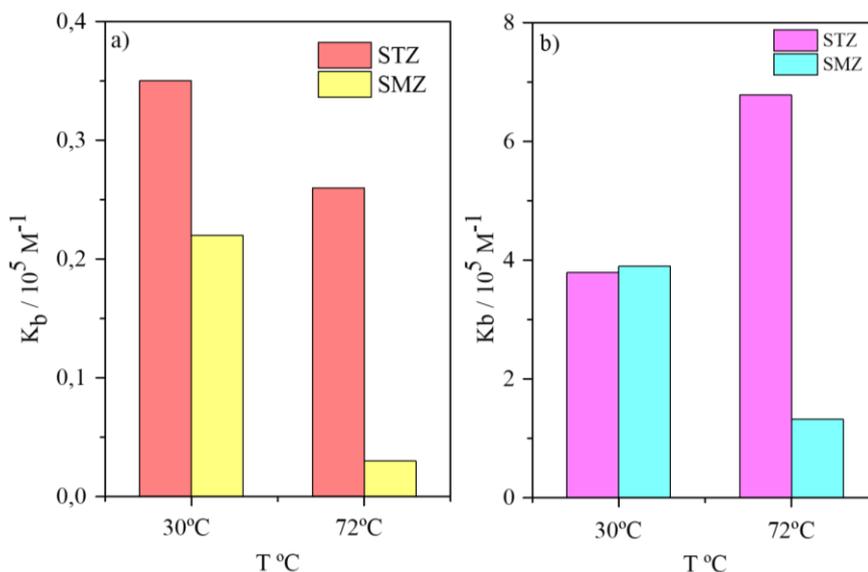
### 9.6 Influência do tratamento térmico no processo de interação

A pasteurização é um tratamento térmico empregado na indústria de laticínios para eliminar microrganismos patogênicos e prolongar a vida útil. Assim, o leite pasteurizado (72°C por 15 segundos) é utilizado pela maioria dos consumidores deste alimento (REN et al., 2019) No entanto, este processo térmico pode induzir diferentes modificações na estrutura das proteínas do leite, incluindo agregação e desdobramento da estrutura nativa da proteína, e afetar a capacidade de ligação de IgE e, conseqüentemente, aumentar a alergenicidade das proteínas

(RAHAMAN; VASILJEVIC; RAMCHANDRAN, 2016). Assim, para avaliara a influência da temperatura de pasteurização do leite (72°C) no processo de interação entre CAS-sulfas e LAC-sulfas foi realizado estudo simulando as condições de pasteurização do leite. Para isto, foi avaliada a constante de ligação ( $K_b$ ) na ausência e na presença do aquecimento. Os resultados estão apresentados na Figura 9.

A partir deste estudo (Figura 9a e 9b), observou-se que para o sistema CAS-sulfas (Figura 9a) houve redução dos valores de  $K_b$  independente da sulfa adicionada. Enquanto, para o sistema LAC-sulfas (figura 9b) houve aumento da constante de ligação  $K_b$  para STZ e redução da constante de ligação para SMZ. Este comportamento pode ser explicado com base nas mudanças induzidas pelo calor na estrutura terciária da proteína, como o desdobramento, exposição de grupos hidrofóbicos previamente ocultos e agregação, o qual corrobora com os estudos com ANS, onde a interação entre LAC e sulfonamidas aumentou o número de sítios hidrofóbicos da proteína, o qual modifica a estrutura da proteína deixando-a menos protegida, em comparação com a estrutura nativa (ARYEE; AGYEI; UDENIGWE, 2018).

**Figura 9 - Comparação das constantes de ligação ( $K_b$ ) do processo de interação de STZ e SMZ com a) CAS e b) LAC na ausência e na presença do processo térmico. Condições: CAS (2,5  $\mu$ M), LAC (5,0  $\mu$ M), sulfonamidas (0-200  $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH 6,8.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

### 9.7 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

Para avaliar se a interação entre CAS, LAC e as sulfonamidas (STC e SMZ) interferia ou não na ação biológica destes antibióticos sobre diferentes bactérias *in vitro* realizou-se avaliação da atividade antibacteriana empregando-se o método de microdiluição em caldo. As

sulfonamida na presença e ausência da CAS e da LAC foram testadas contra as cepas de *E. coli* ATCC8739 e *S. aureus* ATCC25923, como apresentados nas Tabelas 7 e 8.

**Tabela 7. Avaliação da atividade antibacteriana no processo de interação entre CAS e sulfas.**

Bactéria	Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )				
	Proteína livre ou ligante			Complexos <sup>3</sup>	
	CAS	STZ	SMZ	CAS + STZ	CAS + SMZ
<i>E. coli</i> <sup>1</sup>	>400	200	400	200	400
<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	>400	100	100	200	200

<sup>1</sup>Gram negativa // <sup>2</sup>Gram positiva // <sup>3</sup>considerando a proporção 1:1 proteína e antibiótico, em massa.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

**Tabela 8. Avaliação da atividade antibacteriana no processo de interação entre LAC e sulfas.**

Bactéria	Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )				
	Proteína livre ou ligante			Complexos <sup>3</sup>	
	LAC	STZ	SMZ	LAC + STZ	LAC + SMZ
<i>E. coli</i> <sup>1</sup>	>400	200	400	200	400
<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	>400	100	100	100	100

<sup>1</sup>Gram negativa // <sup>2</sup>Gram positiva // <sup>3</sup>considerando a proporção 1:1 proteína e antibiótico, em massa.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) variaram entre 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (STZ e SMZ) e > 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (CAS) frente as bactérias testadas (Tabela 7). Para o sistema CAS-sulfas, observou-se que a interação com CAS resultou no aumento da CIM contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, diminuindo a eficácia destes. O qual pode ser explicado com base na estrutura da CAS que é uma micela formada por 4 subunidades de CAS ( $\alpha_{S1-}$ ,  $\alpha_{S2-}$ ,  $\beta-$  e  $\kappa-$ ), no qual as moléculas de STZ e SMZ podem ter ficado presas no interior da micela de CAS, e desta forma, resultar na diminuição da sua atividade antibacteriana (KUANG et al., 2009).

Para o sistema LAC-sulfas (Tabela 8) as CIMs variaram entre 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (STZ e SMZ) e > 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (LAC) frente as bactérias testadas. Observou-se que os valores de CIM de STZ e SMZ na ausência e na presença da LAC não foram alteradas independente da bactéria avaliada.

## 10 CONCLUSÕES DA ETAPA 2

A partir desse estudo foi possível avaliar a interação da STZ e SMZ com CAS e com LAC empregando as técnicas espectroscópicas. Para as duas proteínas a magnitude de interação a 30°C obedeceu a seguinte ordem: STZ < SMZ e o mecanismo de interação ocorreu preferencialmente por *quenching* estático com formação de complexos supramoleculares não fluorescentes. A partir dos parâmetros termodinâmicos, verificou-se que as interações ocorrem espontaneamente e ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals são responsáveis por estabilizar o complexo formado entre STZ, SMZ e as duas proteínas avaliadas (CAS e LAC).

Por meio de estudos por fluorescência 3D e sincronizada foi verificado que houve mudanças na estrutura nativa das proteínas CAS e LAC induzidas pelo processo de interação com as sulfonamidas avaliadas, o que pode potencializar reações alérgicas. Por fim, a interação entre a CAS e as sulfas (STZ e SMZ) resultou na redução do efeito antibacteriano destes antibióticos frente a bactéria Gram positiva *S. aureus*. Desse modo, através dos estudos realizados verificou-se que ocorre interação entre as diferentes proteínas e as duas sulfonamidas, ocasionando alterações nas estruturas nativas das duas biomoléculas. Essas alterações podem potencializar a alergenicidade destas macromoléculas, e assim, colocar em risco a segurança alimentar dos seres humanos.

## **11 CONCLUSÃO GERAL**

O presente trabalho possibilitou a avaliação quantitativa de duas classes de antibióticos com duas proteínas do leite. E desta forma, foi possível concluir que houve interação entre as duas classes de antibióticos e as proteínas CAS e LAC resultando em mudanças conformacionais nas estruturas de ambas macromoléculas. Portanto, as alterações ocasionadas nas estruturas nativas das duas biomoléculas podem potencializar reações alérgicas constituir um risco a segurança alimentar dos seres humanos. Diante disto, é de grande importância a adoção de medidas de segurança alimentar e conscientização em relação a boas práticas e uso racional de medicamentos de uso veterinário por parte dos produtores de leite, visto que a exposição humana a resíduos destas substâncias em alimentos como leite e derivados constituem um risco potencial para a saúde dos consumidores.

## **PERSPECTIVAS DO TRABALHO**

Abaixo estão apresentadas algumas perspectivas futuras para este trabalho:

- i)* Avaliação da influência do processo de interação com CAS, LAC e as duas classes de antibióticos no perfil de produção de IgE no soro de pacientes alérgicos ao leite;
- ii)* Fortalecimento de ações de vigilância sanitária em relação ao controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos;

## 12 REFERÊNCIAS

ALI, M.S.; AL-LOHEDAN, H.A. Multi-technique approach on the interaction between sugar-based surfactant n-dodecyl  $\beta$ - d -maltoside and bovine serum albumin. **Journal of Luminescence**, Arábia Saudita, v. 169, p.35-42, jan. 2016.

ALI, M.S.; AL-LOHEDAN, H.A. Spectroscopic and computational evaluation on the binding of safranal with human serum albumin: Role of inner filter effect in fluorescence spectral correction. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Arábia Saudita, v. 203, p.434-442, out. 2018.

ALLAHDAD, Z., et al. Spectroscopic and docking studies on the interaction between caseins and  $\beta$ -carotene. **Food Chemistry**, Irã, v. 255, p.187-196, jul. 2018.

AN, X., et al. The investigation of interaction between Thioguanine and human serum albumin by fluorescence and modeling. **Arabian Journal of Chemistry**, China, v.10, p.S1781-S1787, maio 2017

ARIGA, G.G., et al. Interactions between epinastine and human serum albumin: Investigation by fluorescence, UV-vis, FT-IR, CD, lifetime measurement and molecular docking. **Journal of Molecular Structure**, Índia, v. 1137, p.485-494, jun. 2017.

ARYEE, A.; AGYEI, D.; UDENIGWE, C. Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. **Proteins in Food Processing**, p.27-45, 2018.

BAGHERI, M.; FATEMI, M.H. Fluorescence spectroscopy, molecular docking and molecular dynamic simulation studies of HSA-Aflatoxin B1 and G1 interactions. **Journal of Luminescence**, v. 202, p.345-353, out. 2018.

BANI-YASEEN, A.D. Spectrofluorimetric study on the interaction between antimicrobial drug sulfamethazine and bovine serum albumin. **Journal of Luminescence**, Arábia Saudita, v. 131, n. 5, p.1042-1047, maio 2011.

by fluorescence spectroscopy and molecular modeling. **Journal of Molecular Liquids**, China, v.211, p.584-590, ago., 2015.

CAO, Xiang-yu et al. Spectroscopic and molecular modeling studies on the interactions of fluoranthene with bovine hemoglobin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 203, p.301-307, out. 2018.

CHAVES, O., et al. Studies of the Interaction between BSA and a Plumeran Indole Alkaloid Isolated from the Stem Bark of *Aspidosperma cylindrocarpon* (Apocynaceae). **Journal of The Brazilian Chemical Society**, Brasil, p.1229-1236, 2016.

CHEN, J., et al. Potential toxicity of sulfanilamide antibiotic: Binding of sulfamethazine to human serum albumin. **Science of The Total Environment**, China, v. 432, p.269-274, ago. 2012.

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

DEZHAMPANAH, H.; ESMAILI, M.; KHORSHIDI, A. Milk  $\beta$ -casein as a vehicle for delivery of bis(indolyl)methane: Spectroscopy and molecular docking studies. **Journal of Molecular Structure**, Irã, v. 1136, p.50-58, maio 2017.

AUDIC, J. L.; CHAUFER, B. Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. **European Polymer Journal**, França, v.41, p.1934–1942, fev., 2005.

CHAUDHURI, A.; CHATTOPADHYAY, A. Lipid binding specificity of bovine  $\alpha$ -lactalbumin: A multidimensional approach. **Biochimica et Biophysica Acta**, Índia, v.1838, p. 2078–2086, mai., 2014.

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

BUDDANAVAR, A.T.; NANDIBEWOOR, S.T. Multi-spectroscopic characterization of bovine serum albumin upon interaction with atomoxetine. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Índia, v.7, p.148–155, out., 2017.

ROY, S.; NANDI, R.K.; GANAI, R.; MAJUMDAR, K.C.; DAS, T.K. Binding interaction of phosphorus heterocycles with bovine serum albumin: A biochemical study. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Índia, v.7, p.19–26, jun., 2017.

FOO, Y.Y., et al. Spectroscopic studies on the interaction of green synthesized-gold nanoparticles with human serum albumin. **Journal of Molecular Liquids**, Malásia, v. 265, p.105-113, set. 2018.

LOU, Y.Y., et al. Spectroscopic and molecular docking approaches for investigating conformation and binding characteristics of clonazepam with bovine serum albumin (BSA). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, China, v. 167, p.158-167, fev. 2017.

GONZALEZ, W.G.; MIKSOVSKA, J. Application of ANS fluorescent probes to identify hydrophobic sites on the surface of DREAM. **Biochimica et Biophysica Acta**, USA, v.1844, p.1472–1480, mai., 2014.

GUAN, J., et al. Binding studies of triclocarban with bovine serum albumin: Insights from multi-spectroscopy and molecular modeling methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 202, p.1-12, set. 2018.

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

JIA, J., et al. Comparison of binding interaction between  $\beta$ -lactoglobulin and three common polyphenols using multi-spectroscopy and modeling methods. **Food Chemistry**, China, v. 228, p.143-151, ago. 2017.

JIANG, J., et al. The effect of non-covalent interaction of chlorogenic acid with whey protein and casein on physicochemical and radical-scavenging activity of in vitro protein digests. **Food Chemistry**, China, v. 268, p.334-341, dez. 2018.

KABIR, M.Z., et al. Interaction of an anticancer drug, gefitinib with human serum albumin: insights from fluorescence spectroscopy and computational modeling analysis. **RSC Advances**, Malásia, v. 6, n. 94, p.91756-91767, 2016.

KASPCHAK, E.; MAFRA, L.I.; MAFRA, M. R. Effect of heating and ionic strength on the interaction of bovine serum albumin and the antinutrients tannic and phytic acids, and its influence on in vitro protein digestibility. **Food Chemistry**, Brasil, v. 252, p.1-8, jun. 2018.

LAGE, Tiago C. A. et al. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* and interaction studies of lichen natural products with jack bean urease. **New Journal of Chemistry**, Brasil, v. 42, n. 7, p.5356-5366, 2018.

LI, Daojin. Studies on the Interaction of Cefepime Hydrochloride with Bovine Serum Albumin by Fluorescence, Synchronous Fluorescence, Three-Dimensional Fluorescence and Circular Dichroism. **Journal of Bioanalysis & Biomedicine**, China, v. 09, n. 02, p.107-113, 2017.

LI; ZHANG; JI. Influences of pH, urea and metal ions on the interaction of sinomenine with Lysozyme by steady state fluorescence spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 130, p.440-446, set. 2014.

LIANG, J.; CHENG, Y.; HAN, H. Study on the interaction between bovine serum albumin and CdTe quantum dots with spectroscopic techniques. **Journal of Molecular Structure**, China, v. 892, n. 1-3, p.116-120, dez. 2008.

MAKARSKA-BIALOKOZ, M. Interactions of hemin with bovine serum albumin and human hemoglobin: A fluorescence quenching study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Polônia, v.193, p.23-32, jan., 2018.

MEHRANFAR, et al. Spectrofluorimetric and molecular docking study on the interaction of bisdemethoxycurcumin with bovine  $\beta$ -casein nanoparticles. **Journal of Luminescence**, Irã, v.143, p.687-692, jul., 2013.

METI, M.D., et al. Multi-spectroscopic investigation of the binding interaction of fosfomicin with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Índia, v. 5, n. 4, p.249-255, ago. 2015. BUDDANAVAR et al., 2017

MOHAMMADI, F.; MOEENI, M. Study on the interactions of trans-resveratrol and curcumin with bovine  $\alpha$ -lactalbumin by spectroscopic analysis and molecular docking. **Materials Science and Engineering: C**, Irã, v. 50, p.358-366, maio 2015.

MOHAMMADI, F.; MOEENI, M. Study on the interactions of trans-resveratrol and curcumin with bovine  $\alpha$ -lactalbumin by spectroscopic analysis and molecular docking. **Materials Science and Engineering: C**, Índia, v. 50, p.358-366, maio 2015.

REN, Q., et al. Thermal and structural changes of pasteurized milk fat globules during storage. **Food Bioscience**, China, v. 28, p.27-35, abr. 2019.

REN, G., et al. Molecular mechanism of the interaction between resveratrol and trypsin via spectroscopy and molecular docking. **Food & Function**, Reino Unido, v. 10, n. 6, p.3291-3302, 2019.

RUDRA, S., et al. Spectroscopic exploration and molecular docking analysis on interaction of synthesized schiff base ligand with serum albumins. **Journal of Molecular Structure**, Índia, v. 1167, p.107-117, set. 2018.

SANTANA, Camilla C. et al. Evaluation of guanylhydrazone derivatives as inhibitors of *Candida rugosa* digestive lipase: Biological, biophysical, theoretical studies and biotechnological application. **Bioorganic Chemistry**, Brasil, v. 87, p.169-180, jun. 2019.

SANTOS, J.C.N., et al. Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA). **International Journal of Biological Macromolecules**, Brasil, v. 113, p.1032-1040, jul. 2018.

SIDDIQI, M.K., et al. Probing the interaction of cephalosporin antibiotic–ceftazidime with human serum albumin: A biophysical investigation. **International Journal of Biological Macromolecules**, Índia, v.105, p.292–299, jan., 2017.

SURYAWANSHI, V.D. et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Índia, v. 6, n. 1, p.56-63, fev. 2016.

SURYAWANSHI, V.D., et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Índia, v.6, p.56–63, jul., 2016.

WANG, J., et al. Investigation of the interaction of deltamethrin (DM) with human serum albumin by multi-spectroscopic method. **Journal of Molecular Structure**, China, v.1129, p.160-168, jan., 2017.

WANG, R., et al. Studies on the interaction between neutral red and bovine hemoglobin  
YAZDI, S. R.; CORREDIG, M. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. **Food Chemistry**, Canadá, v. 132, n. 3, p.1143-1149, jun. 2012.

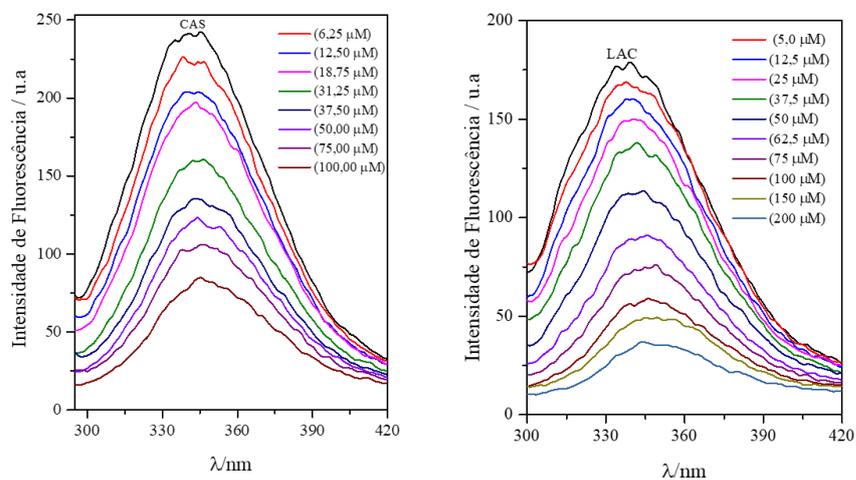
ZHANG, D., et al. Investigations of the molecular interactions between nisoldipine and human serum albumin in vitro using multi-spectroscopy, electrochemistry and docking studies. **Journal of Molecular Liquids**, China, v. 258, p.155-162, maio 2018.

LU, Y., et al. Effect of Covalent Interaction with Chlorogenic Acid on the Allergenic Capacity of Ovalbumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, China, v. 66, n. 37, p.9794-9800, 30 ago. 2018.

MOREIRA, I.F., et al. Perfil dos pacientes registrados no ambulatório de alergia e imunologia do hospital universitário professor Alberto Antunes - Maceió/AL. **GEP NEWS**, Maceió, v.1, n.1, p. 196-201, jan./mar. 2018.

## APÊNDICE A

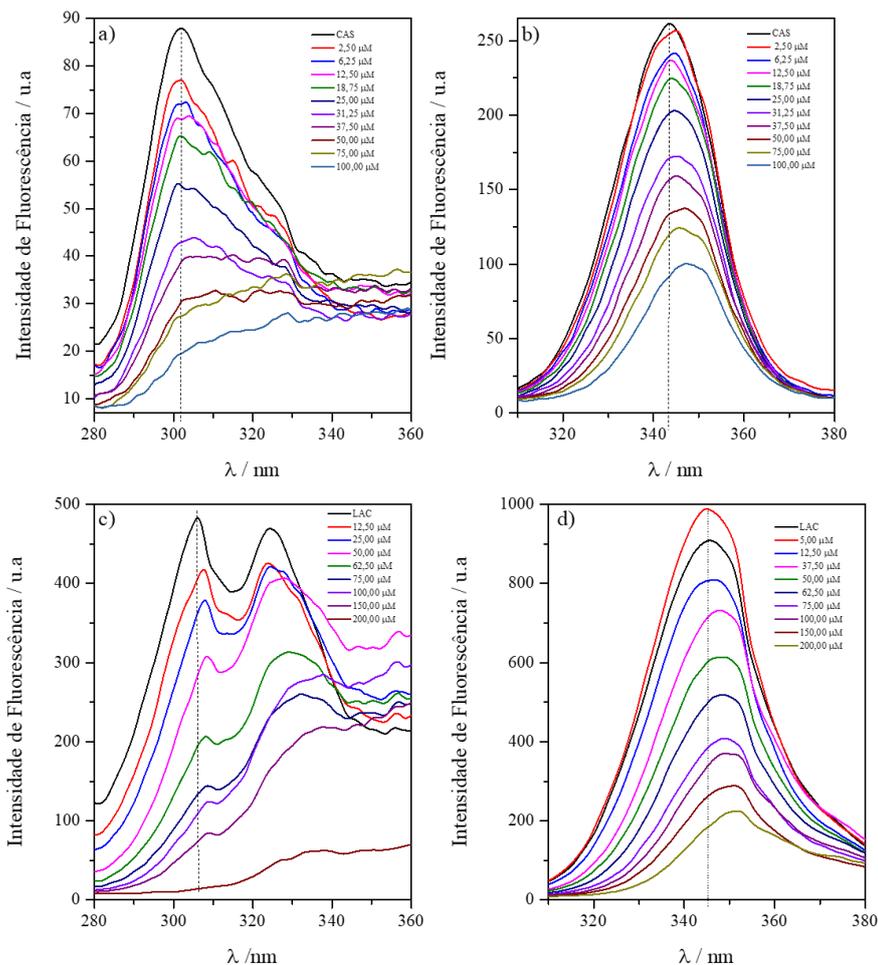
**Figura 10 - Titulação espectrofluorimétrica da caseína para o ligante: a) SMZ e titulação espectrofluorimétrica LAC para b) SMZ. Condições: CAS (2,5  $\mu\text{M}$ ), LAC (5,0  $\mu\text{M}$ ) SMZ (0-100 e 0-200  $\mu\text{M}$ ), tampão fosfato 10 mM a pH=6,8 e 30°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

## APÊNDICE B

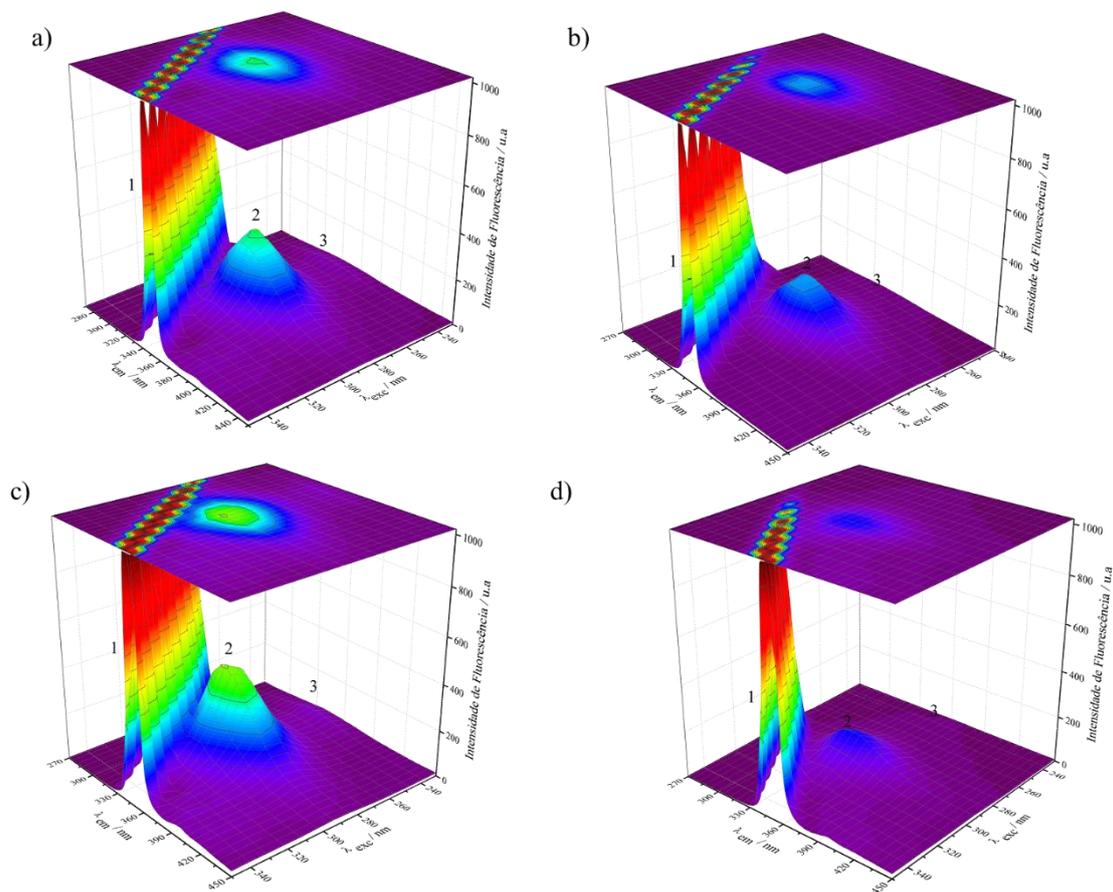
**Figura 11- Fluorescência sincronizada para o resíduo de tirosina ( $\Delta\lambda= 15$  nm) da CAS com adição de incrementos de a) STZ e para o resíduo de triptofano ( $\Delta\lambda =60$  nm) com adição de incrementos de b) SMZ. E fluorescência sincronizada para o resíduo de tirosina ( $\Delta\lambda= 15$  nm) da LAC com adição de incrementos de c) STZ e para o resíduo de triptofano ( $\Delta\lambda =60$  nm) com adição de incrementos de d) SMZ. Condições: CAS (2,5  $\mu$ M), LAC (5,0  $\mu$ M), sulfonamidas (0-200  $\mu$ M), tampão fosfato 10 mM a pH=6,8 e 30°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

## APÊNDICE C

Figura 12 – Espectros de fluorescência tridimensional para a)CAS, b) com adição de SMZ, c) LAC, d)com adição de SMZ. Condições: CAS (2,5  $\mu\text{M}$ ), LAC (5,0  $\mu\text{M}$ ) sulfonamidass (25 e 50  $\mu\text{M}$ ), tampão fosfato 10 mM a pH 6.8 e 30 °C.



Fonte: elaborado pela autora, 2019.