

## AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE TRIPTOFANO POR MEIO DE ÁGUA OZONIZADA UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO

Maria Verônica Pires<sup>1</sup>; Sarah Santana Faustino Silva <sup>1</sup>; Carlos José de Lima (Dr.) <sup>1,2</sup>; Adjaci Uchoa Fernandes (Dr.)<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Anhembi Morumbi (UAM), Rua Casa do Ator, 275, São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITÉ), Parque Tecnológico de São José dos Campos, Estrada Dr. Altino Bondensan, 500, São José dos Campos, SP, Brasil  
mariaveronicapires46@gmail.com

### RESUMO

O ozônio é um potente agente oxidante com ação antimicrobiana associada ao dano na membrana celular bacteriana e à perda da viabilidade celular. O estudo avalia a capacidade de oxidação de proteínas em solução aquosa ozonizada por meio de espectrofotometria de absorção na faixa ultravioleta-visível através da degradação do triptofano. A curva de degradação do triptofano foi construída com espectrofotômetro calibrado no comprimento de onda de 280 nm, região na qual o aminoácido tem sua máxima absorção por conter um grupo indol que absorve luz ultravioleta. A concentração do triptofano foi calculada utilizando a Lei de Lambert -Beer, e coeficiente de extinção molar, neste comprimento de onda, em 5500 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Os resultados demonstram que o triptofano pode interagir com o ozônio, contido na solução de água ozonizada. As observações permitirão avaliar a eficiência do O<sub>3</sub> em solução aquosa no tratamento de patologias infecciosas.

**PALAVRAS CHAVE:** Triptofano, Ozônio, Espectroscopia de Absorção

### INTRODUÇÃO

As proteínas são o principal componente da maioria dos sistemas biológicos, tanto em células e tecidos quanto em fluidos, sendo, portanto, alvo de danos oxidativos (DAVIES, 2005; 2003). A oxidação pode ocorrer tanto na estrutura quanto em cadeias laterais de resíduos de aminoácidos (DAVIES 2003; STADTMAN 2003), determinando toxicidade celular, com consequências deletérias na estrutura e função (LI 2020).



O triptofano (TRP) é um aminoácido essencial para a síntese proteica, abundante em interações proteína-proteína, e muito suscetível à oxidação. Reage com radicais hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) e ozônio ( $\text{O}_3$ ), formando substâncias intermediárias e produtos finais com ou sem anéis indólicos intactos (DAVIES, 2003). As propriedades espectrofotométricas do TRP permitem avaliar suas concentrações, sobretudo por meio da detecção de produtos de degradação (EHRENSHAT, 2015).

O ozônio é uma molécula inorgânica, com propriedades alotrópicas, constituída por três átomos de oxigênio, identificada por Schönbein em 1868. É um poderoso agente oxidante com ação antimicrobiana, amplamente utilizado na desinfecção de água potável e tratamento de feridas (PATIL, 2011). Em soluções aquosas, é decomposto gerando radicais superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), hidroperóxidos ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) e hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) (KANOLSKY, 1991). Esses radicais oxidam a superfície bacteriana, principalmente ácidos graxos polinsaturados e aminoácidos, enzimas ou proteínas (LI 2020). A difusão do ozônio através da membrana celular bacteriana determina dano ao DNA ou em proteínas intracelulares, comprometendo a reparação e transcrição, resultando em perda da viabilidade celular (PATIL, 2011).

O objetivo deste estudo é analisar a capacidade de oxidação proteica produzida por uma solução aquosa ozonizada utilizando espectrofotometria de absorção e a degradação do triptofano.

## METODOLOGIA

### Solução Aquosa Ozonizada

Para obtenção do gás ozônio, foi utilizado um gerador (OZON & LIFE Medical Systems modelo MS3G) que produz  $\text{O}_3$  por descarga elétrica a partir do fornecimento de oxigênio (99,5%) proveniente de um cilindro metálico. Foi utilizada uma vazão de oxigênio na entrada do equipamento de 0,125 L/min, com concentração de 41  $\mu\text{g/mL}$ .

Um recipiente com 500 mL de água destilada foi borbulhado por quinze minutos, a uma temperatura de 21  $^\circ\text{C}$ , obtendo concentração final de  $\text{O}_3$  de 6,38 mg/L.

### Espectroscopia no Ultravioleta-visível

As análises espectroscópicas foram realizadas utilizando o espectrofotômetro na faixa ultravioleta-visível (UV-vis) de 190 a 1100 nm da marca KASVI e o software de avaliação UV Profissional.



### Espectroscopia UV-vis de Varredura

Espectros de varredura do TRP em água destilada e em água ozonizada foram obtidos na faixa espectral de 200 a 400 nm, com uma absorbância máxima de até 1. A absorbância (A) é diretamente proporcional à concentração (c) da solução na amostra segundo a Lei de Lambert–Beer (Equação 1 – Quadro 1).

### Espectroscopia UV-vis de Fotometria

Para construção da curva de degradação do triptofano, o espectrofotômetro foi calibrado com uma solução de água destilada no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 280 nm, região na qual o TRP tem sua máxima absorção por conter um grupo indol que absorve luz ultravioleta (EHRENSHAT, 2015 ; DAVIES, 2003).

Partindo de uma solução inicial de L-TRP (1 mg/mL), foi adicionada uma solução contendo 2 mL de água destilada ozonizada ( $c_{O_3} = 6,38$  mg/L) com verificações das absorbâncias a cada minuto ao longo de 30 minutos.

### Coeficiente de Extinção do Triptofano

A concentração do triptofano foi calculada utilizando a Lei de Lambert -Beer (Equação 1 -Quadro 1). Consideramos o coeficiente de extinção molar ( $\xi$  em  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) do L-TRP em 280 nm de 5500 (Equação 2 -Quadro 1). A extinção do TRP pelo  $O_3$  corresponde à relação gráfica entre os valores de absorbância de concentração.

**Tabela 1: Fórmulas utilizadas para cálculo**

*A absorbância é calculada de acordo com a Lei de Beer -Lambert*

$$A = \xi \cdot c \cdot l$$

**Equação 1**

Onde: A = Absorbância

$\xi$  = coeficiente de absorção molar (coeficiente de extinção). Expresso:  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

c = concentração da substância absorvente. Expresso:  $mol \cdot L^{-1}$

l = comprimento do caminho óptico .Expresso em cm. Geralmente 1cm

Considerando  $\xi_{280} = 5500$ :

$$c = A / \xi \cdot l$$

**Equação 2**



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme a Lei de Lambert-Beer a absorbância é proporcional à concentração e comprimento do caminho, com a constante de proporcionalidade sendo o coeficiente de extinção (EHRENSHAT,2015)..

A absorbância do L -TRP para o comprimento de onda 280 nm em solução de água destilada foi de 0,749 com concentração de 1,55 mg/dL, enquanto na solução de água ozonizada foi de 0,551 mg/dL com uma concentração de 1,15 mg/dL. Os valores correspondem a uma redução de 25,8%, observada no período inicial de degradação. A Figura 1 apresenta o espectro de absorbância do triptofano em solução inicial e após a diluição com solução aquosa ozonizada.

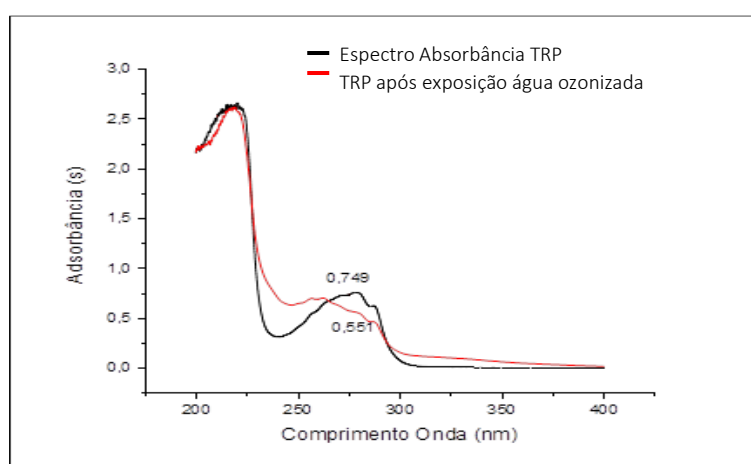


Figura1: Espectro de absorbância do triptofano: Curva em preto espectro de TRP  
Curva em vermelho: TRP após exposição à água ozonizada

A curva de extinção do L-TRP em água destilada ozonizada, observada por 30 minutos, para comprimento de onda de 280 nm, apresenta absorbância inicial de 0,176, concentração de 0,37 mg/dL. Em cinco minutos ocorre declínio de 38%, absorbância de 0,114, concentração de 0,23 mg/dL e, ao final de 25 minutos, valores de 0,106, concentração de 0,22 mg/dL, representando declínio de 40,5%, momento em que apresenta estabilidade. A Figura 2 representa a curva de extinção do L-TRP.



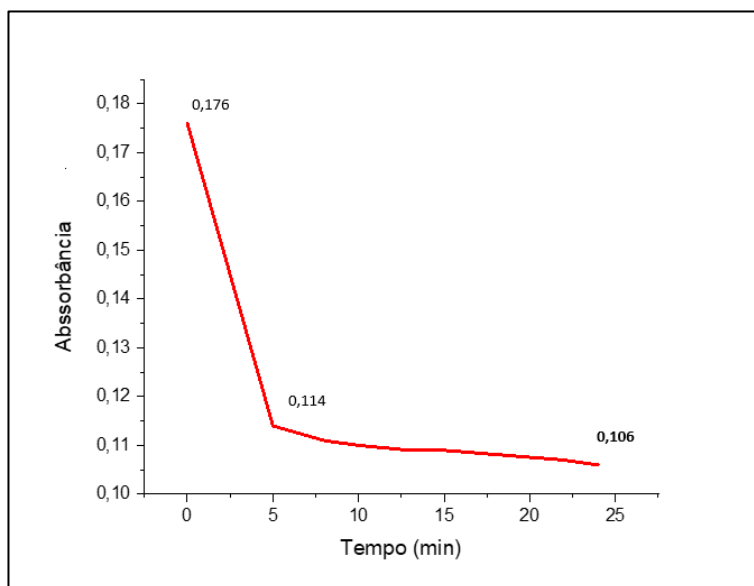


Figura 2 Curva de extinção do L-TRP em solução de água destilada ozonizada.

## CONCLUSÃO

A espectroscopia de absorvância UV-vis é um dos métodos para determinação de concentrações de substâncias com numerosas vantagens, dentre elas a possibilidade de utilização de solução sem adição de reagentes com rapidez e reprodutibilidade. A utilização da Lei de Lambert - Beer permite a determinação precisa da concentração da solução em análise.

Os resultados demonstram que o triptofano pode interagir com o ozônio, contido na solução de água ozonizada. As observações permitirão o uso do método em estudos posteriores para avaliar a eficiência do  $O_3$  em solução aquosa no tratamento de patologias infecciosas.

## REFERENCIAS

DAVIES, MJ.: Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jun. 6;305(3):761-70. doi: 10.1016/s0006-291x(03)00817-9. PMID: 12763058.



DAVIES, MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jan 17;1703(2):93-109. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.007. PMID: 15680218.

KANOFISKY, JR; SIMA,P: Singlet oxygen production from their actions of ozone with biological molecules, *J. Biol. Chem*. 266 (1991) 9039–9042.

EHRENSHAFT, M; DETERDING, LJ; MASON, RP: Tripping up Trp: Modification of protein tryptophan residues by reactive oxygen species, modes of detection, and biological consequences. *Free Radic Biol Med*. 2015 Dec;89:220-8. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.003. Epub 2015 Sep 21. PMID: 26393422; PMCID: PMC4684788.

LI, J; RUMANCEY, C; LUTZE, HV; SCHMIDT, TC; ROSENHAHN, A; SCHMITZ, OJ. Effect of ozone stress on the intracellular metabolites from *Cobetia marina*. *Anal Bioanal Chem*. 2020 Sep;412(23):5853-5861. doi: 10.1007/s00216-020-02810-6. Epub 2020 Jul 16. PMID: 32676676; PMCID: PMC7413921.

PATIL, S; VALDRAMIDIS, VP; KARATZAS, KA; CULLEN, PJ; BOURKE, P. Assessing the microbial oxidative stress mechanism of ozone treatment through the responses of *Escherichia coli* mutants. *J Appl Microbiol*. 2011 Jul;111(1):136-44. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05021.x. Epub 2011 May 13. PMID: 21457413.

STADTMAN,ER; LEVINE,RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003 Dec;25(3-4):207-18. doi: 10.1007/s00726-003-0011-2. Epub 2003 Jul 29. PMID: 14661084.

## FOMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

