

Estudio fluorométrico de la interacción de fenolftaleína y lisozima

Tello Solís Salvador Ramón*, Martínez Solís Brenda

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Química, Área de Biofísicoquímica. Av. San Rafael Atlixco No. 186, Iztapalapa, Ciudad de México, C.P. 09340. México.

*Autor para correspondencia: srts@xanum.uam.mx

Recibido:

28/febrero/2020

Aceptado:

30/octubre/2020

Palabras clave:

Lisozima,
fenolftaleína,
fluorescencia

Keywords:

Lysozyme,
phenolphthalein,
fluorescence

RESUMEN

Se estudió la interacción no covalente entre la lisozima y la fenolftaleína a pH 4, por seguimiento del apagamiento de la fluorescencia de la proteína por titulación con el ligando. Se estudió el proceso a 20, 25 y 30°C. Para el análisis de los datos experimentales se utilizó el modelo de Stern-Volmer y el modelo modificado de Stern-Volmer. A partir del gráfico del modelo modificado se determinó la constante de unión y la estequiometría de formación del complejo lisozima-fenolftaleína. Se observó que el modelo de interacción es de tipo estático con una estequiometría 1:1. Además, se determinaron los parámetros termodinámicos y se obtuvo que tanto ΔH como ΔS fueron mayores a cero, lo que implica que las fuerzas predominantes durante la interacción son de naturaleza hidrofóbica.

ABSTRACT

Non-covalent interaction between lysozyme and phenolphthalein at pH 4 was studied, by monitoring the protein fluorescence quenching by titration with the ligand. Interaction studies were performed at 20, 25 and 30°C. Experimental data analysis was performed using the Stern-Volmer model and the modified Stern-Volmer model. Binding constant and the stoichiometry of formation of the lysozyme-phenolphthalein complex were determined. It was observed that the interaction model is static type with a 1:1 stoichiometry. In addition, the thermodynamic parameters were determined and it was obtained that both ΔH and ΔS were greater than zero, which implies that the predominant forces during the interaction are hydrophobic nature.

Introducción

Las proteínas, son unas de las moléculas de mayor relevancia en procesos bioactivos, están relacionadas con la alimentación, la inmunidad y el metabolismo. El conocimiento de la interacción de proteínas con macromoléculas con diversos tipos estructurales y de funciones, por ejemplo, drogas, indicadores, carbohidratos u otras proteínas ha sido de gran interés en los últimos años (Zhu *et al.*, 2007). Un paso importante para el entendimiento de estos sistemas es el estudio de la interacción de la proteína y la macromolécula y la caracterización termodinámica de dicha interacción. Las propiedades más importantes durante la formación del complejo proteína-ligando (P-L) incluyen: la constante de unión, la relación estequiométrica, el cambio en la energía libre de Gibbs, el cambio en la entalpía y el cambio en la entropía. Todas estas propiedades pueden ser calculadas a partir de la evaluación experimental del equilibrio entre la proteína y el ligando (Suryawanshi *et al.*, 2016).

La espectroscopía de fluorescencia se usa comúnmente para estudiar las interacciones de ligandos con proteínas. El análisis del apagamiento de fluorescencia es un método conveniente para estudios de reconocimiento molecular ya que provee información precisa sobre las interacciones moleculares que se pueden dar entre una proteína y un ligando (Suryawanshi *et al.*, 2016).

En este trabajo se estudió la interacción de la lisozima con fenolftaleína, por espectroscopía de fluorescencia, a pH 4, y se determinó la constante de unión, la estequiometría de la unión, las propiedades termodinámicas (cambio en la energía libre de Gibbs, cambio en la entalpía y cambio en la entropía), y el mecanismo de interacción. El análisis de las titulaciones fluorométricas se realizó utilizando las ecuaciones de Stern-Volmer y Stern-Volmer modificada.

Lisozima

La lisozima de huevo de gallina, es una enzima compuesta de una sola cadena polipeptídica con 129 residuos de aminoácidos, su estructura globular está formada por dos dominios o lóbulos: el dominio α con los residuos (1- 40 y 90-129) y el dominio β (41-89), unidos por una larga α -hélice (Matthyssens *et al.*, 1974; Davies *et al.*, 1969), la estructura globular de la proteína está estabilizada por la presencia de cuatro puentes disulfuro (van der Berg *et al.*, 1999). La lisozima presenta en su estructura seis residuos de triptófano, sin embargo, solo dos de ellos están expuestos en la superficie Tpr62 y Tpr108 los cuales

son los responsables de la emisión de fluorescencia de la enzima.

Una de las funciones fisiológicas de la lisozima es el transporte de moléculas cuya efectividad depende de la unión enzima-ligando (Li y Li, 2011), por ejemplo, la unión de lípidos a lisozima (Gorbenko *et al.*, 2007).

Fenolftaleína

La fenolftaleína (CAS 77.09-8), de fórmula $C_{20}H_{14}O_4$, y masa molar 318.327 g/mol, es un indicador ácido-base que en disoluciones $0 < \text{pH} < 8.2$ permanece incoloro, pero en disoluciones básicas $\text{pH} > 8.2$ toma un color rosado. Sin embargo, en pH extremos (muy básicos o ácidos) presenta otros virajes de coloración: en disoluciones fuertemente básicas se torna incolora, mientras que en disoluciones fuertemente ácidas se torna naranja. La fenolftaleína se prepara en una disolución 80% etanol absoluto y 20% agua (v/v).

En su farmacología y terapéutica se utiliza como laxante catártico. En México y otros países, a pesar de que se ha limitado su uso como medicamento dada la suposición de que tiene efectos cancerígenos, fue incorporado a la farmacopea homeopática y se sigue vendiendo en las farmacias como especialidad homeopática.

En la figura 1, se muestra la estructura química de la fenolftaleína en ambiente ácido.

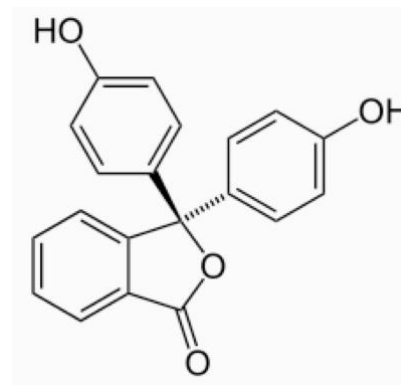


Figura 1. Estructura química de la fenolftaleína en su forma ácida.

Interacción Proteína-Ligando por apagamiento de fluorescencia, análisis de datos: Modelo de Stern-Volmer

La unión entre una proteína y un ligando es cuantificada a través de la constante de unión K_u (Freire, 2008), la cual refleja los efectos de las interacciones no-covalentes entre las especies y puede describirse mediante la siguiente ecuación:



con:

$$K_u = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad [2]$$

Donde [P] es la concentración molar de proteína en el equilibrio, [L] la concentración molar de ligando en el equilibrio, [PL] es la concentración molar del complejo en el equilibrio y K_u la constante de unión a la temperatura T.

El mecanismo de la unión y K_u se pueden determinar analizando los espectros de titulación fluorométrica, apagamiento de fluorescencia, mediante el modelo de Stern-Volmer (Lakowicz, 2006):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad [3]$$

Donde F_0 es la emisión de fluorescencia de la proteína, F es la emisión de fluorescencia en presencia del fluoróforo en cada punto de la titulación, K_{sv} , es la constante de apagamiento, [Q] la concentración molar del fluoróforo en cada punto de la titulación, τ_0 tiempo de vida media del fluoróforo en el estado excitado (normalmente 10^{-8} s para biomacromoléculas) (Lakowicz, 2006) y k_q es la constante de apagamiento bimolecular del fluoróforo.

La constante de unión (K_u) y el número de sitios de unión (n), para la interacción entre una proteína y un ligando se puede determinar usando el método de Stern-Volmer modificado:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_u + n \log [Q] \quad [4]$$

Donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia de la proteína en ausencia y presencia del fluoróforo, respectivamente, K_u es la constante de unión y n es el número de sitios de unión.

Parámetros Termodinámicos

La unión de la interacción entre una proteína y un ligando, también puede ser cuantificada a través de la energía libre de unión, ΔG_u , la cual está relacionada con la constante de unión a través de la relación

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u = \Delta H_u - T \Delta S_u \quad [5]$$

Donde ΔG_u es la energía libre de Gibbs de unión, R la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta, ΔH_u es el cambio de entalpía de unión y ΔS_u es el cambio de entropía de unión. Una energía libre de unión negativa indica una interacción favorable entre el ligando y la proteína, sin embargo, depende de dos

condiciones ambientales tales como la temperatura y el pH. ΔG_u es la suma de dos términos diferentes, uno entálpico ΔH_u y uno entrópico ΔS_u , los cuales dan información sobre la naturaleza de las interacciones involucradas, y por lo tanto, para lograr una alta afinidad es necesario que ambos términos contribuyan de manera favorable a la energética de unión (Freire, 2008 y Horn *et al.*, 2002). El cambio de entalpía está relacionado a la naturaleza de las interacciones no covalentes; como interacciones de van der Waals, interacciones de origen electrostático y puentes de hidrógeno, el cambio de entropía de unión es dependiente en primera instancia del efecto hidrofóbico e inherente a interacciones segregativas, por ejemplo, cambios en la configuración y la solvatación de grupos hidrófilos/lipófilos hacia la formación de complejos (Olsson *et al.*, 2008). Estas interacciones contribuyen de manera diferente al ΔH_u y ΔS_u es decir, poseen diferentes "firmas termodinámicas" (Freire, 2008 y Horn *et al.*, 2002).

Ross y Subramanian (1981), han resumido la naturaleza de las fuerzas en un proceso de interacción: 1.- $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, corresponde a un efecto hidrofóbico; 2.- $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, corresponde a contactos de van der Waals, formación de puentes de Hidrógeno 3.- $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$, corresponde a interacciones iónicas/electrostáticas.

Para confirmar cual es la naturaleza de las interacciones o fuerzas que actúan, se determinan los valores del cambio de entalpía ΔH_u y el cambio de entropía ΔS_u de reacción. El ΔH_u puede ser determinado midiendo la dependencia de la temperatura sobre la constante de unión (Samari *et al.*, 2012) trabajando dentro de un intervalo de temperaturas en el que no se degraden las proteínas, mediante la ecuación de van't Hoff.

$$\ln K_u = -\frac{\Delta H_u}{RT} + \frac{\Delta S_u}{R} \quad [6]$$

En donde K_u es la constante de unión a la temperatura T, y R es la constante universal de los gases.

Metodología

Lisozima

La lisozima de huevo de gallina (99%), Sigma-Aldrich, se usó sin ninguna purificación previa. La disolución de lisozima se preparó en amortiguador de acetatos 5 mM pH 4. Se utilizó agua desionizada. La concentración de la disolución madre de lisozima se determinó espectrofotométricamente y fue de 3.6 μ M.

Fenoltaleína

Se preparó una disolución madre de fenoltaleína en una mezcla 80% etanol absoluto + 20% regulador de acetatos 5 mM pH 4 (v/v) con una concentración 0.97 mM.

Espectroscopía de fluorescencia

Las mediciones de emisión de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro PC1 de ISS (Champaign, IL, USA), equipado con un baño de agua, control de temperatura y agitación magnética. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm y la longitud de onda de emisión en el intervalo 290 a 500 nm.

Se obtuvieron los espectros de fluorescencia para la lisozima y la disolución de fenolftaleína de manera individual.

Los estudios de apagamiento de la emisión de fluorescencia de la lisozima se realizaron titulando una disolución de lisozima de concentración fija 3.6 μM con cantidades crecientes de la disolución de fenolftaleína en el intervalo de concentraciones de 123 a 530 μM . Los estudios de fluorescencia se realizaron por duplicado a tres diferentes temperaturas 20, 25 y 30°C, a pH 4. En cada adición de disolución de fenolftaleína se dejó que el sistema se estabilizara a la temperatura correspondiente, en agitación constante *in situ* durante 3 minutos antes de obtener el espectro.

Resultados y discusión

En la figura 2 se presentan los espectros de emisión de fluorescencia para la lisozima y la fenolftaleína libres. Se observa un máximo de emisión en 324 nm para la disolución de lisozima y se aprecia que la disolución de fenolftaleína no presenta interferencia alguna a dicha longitud de onda.

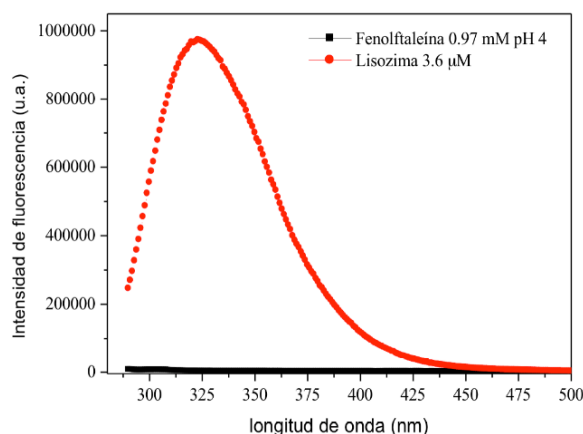


Figura 2. Emisión de fluorescencia de lisozima y fenolftaleína a 25°C.

En figura 3 se presenta el apagamiento de la emisión de fluorescencia de la disolución de lisozima, por titulación con la disolución de fenolftaleína a 25°C, el máximo observado a 324 nm disminuye al aumentar la

concentración de fenolftaleína. Comportamiento similares se observaron a 20 y 30°C.

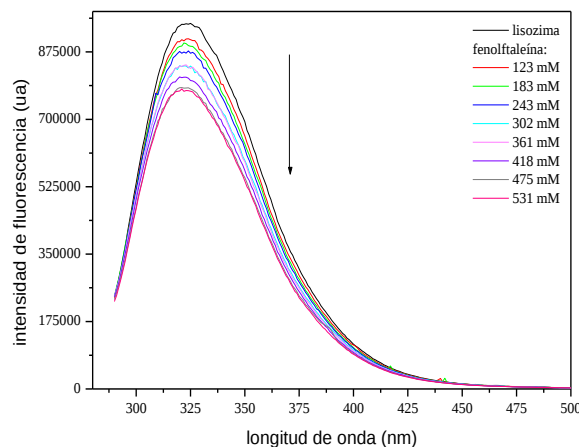


Figura 3. Titulación fluorométrica de lisozima en acetatos 5 mM pH 4.0 a 25 °C, con fenolftaleína a pH 4.

A partir de las curvas de titulación fluorométrica a cada temperatura, se construyó un gráfico de Stern-Volmer, ecuación [3], se obtuvieron relaciones lineales con buenos factores de correlación, a partir de los cuales se calculó la constante Ksv (Figura 4).

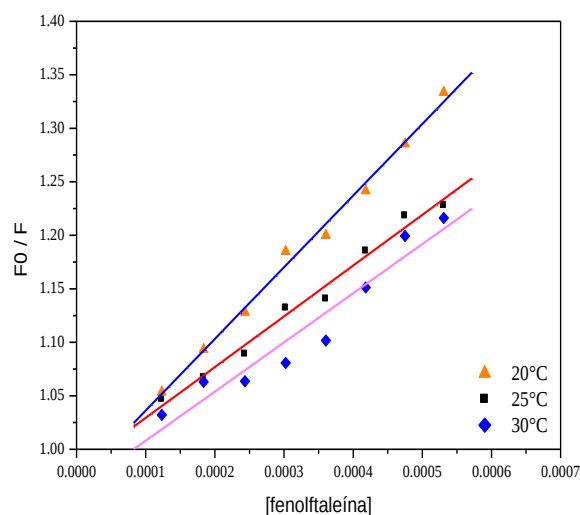


Figura 4. Gráfico de Stern-Volmer para la titulación fluorométrica de lisozima con fenolftaleína a pH 4. ($R = 0.9965$ a 20 °C, $R = 0.9923$ a 25 °C y $R = 0.96204$ a 30 °C).

En la figura 5 se presenta el gráfico de la ecuación modificada de Stern-Volmer, ecuación [4] a cada temperatura estudiada para la titulación fluorométrica de la lisozima con fenolftaleína a pH 4. Se observaron buenas relaciones lineales, a partir de la pendiente se

calculó la estequiometría de la interacción (n) y de la ordenada al origen se calculó la constante de unión K_u , para el complejo lisozima-fenoltaleína.

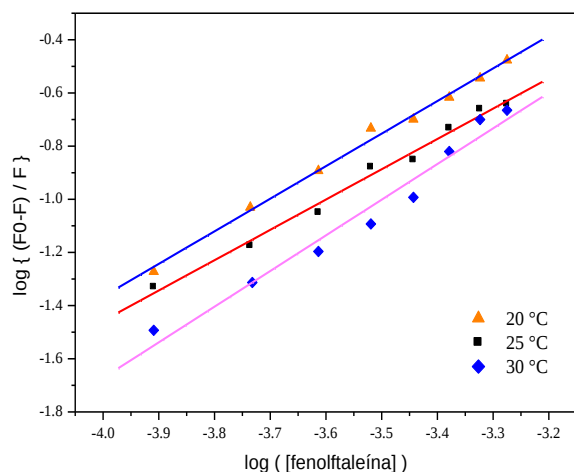


Figura 5. Gráfico de Stern-Volmer modificado para el apagamiento de la intensidad de fluorescencia de la lisozima por titulación con fenoltaleína. ($R = 0.99346$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $R = 0.99716$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $R = 0.98111$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

En la tabla 1 se presentan los resultados para K_{sv} , k_q , K_u y n , para la formación del complejo lisozima-fenoltaleína, obtenidos a partir de las ecuaciones 3 y 4 y los gráficos de las figuras 5 y 6.

Tabla 1. Parámetros de Stern-Volmer en la interacción lisozima-fenoltaleína a pH 4.

T ($^{\circ}\text{C}$)	K_{sv} (M^{-1})	k_q $10^{-10}(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	K_u (M^{-1})	n
20	699.7	6.997	1267.7	1.14 (± 0.05)
25	474.4	4.744	3432.8	1.22 (± 0.04)
30	459.5	4.495	4944.4	1.34 (± 0.09)

Ya que si $k_q > 2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ el mecanismo de apagamiento es estático (Delavari *et al.* 2015) y si es menor entonces es dinámico. De acuerdo a los valores de k_q reportados en la tabla 1, se concluye que el mecanismo de interacción entre la lisozima y la fenoltaleína es estático, teniendo una estequiometría de 1:1.

Propiedades termodinámicas

Los valores de K_u evaluados en este trabajo (tabla 1), fueron utilizados para construir un diagrama de van't Hoff, como el reportado por Suryawanshi *et al.* (2016). En la figura 6 se presenta el diagrama de van't Hoff para la formación del complejo lisozima-fenoltaleína a partir de

la pendiente se calculó el cambio de entalpía, $\Delta H = 100.7 \text{ kJ/mol}$ y el cambio de entropía $\Delta S = 403.9 \text{ J/molK}$.

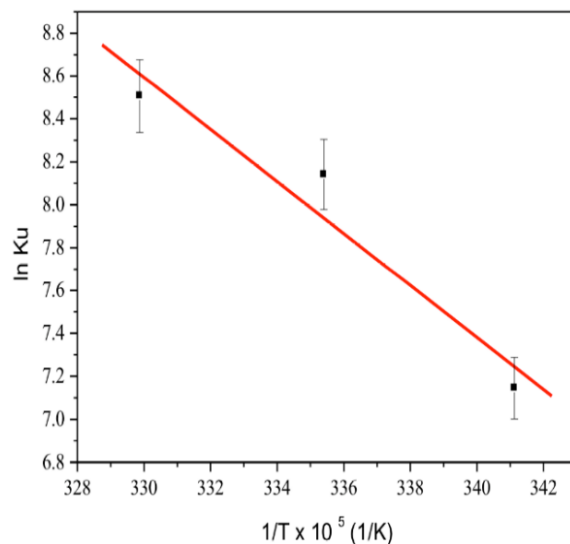


Figura 6. Diagrama de van't Hoff para la interacción de la lisozima y fenoltaleína a pH 4. ($R = 0.96842$).

Para la interacción lisozima fenoltaleína a pH 4, se obtuvo que tanto $\Delta H > 0$, como $\Delta S > 0$, de acuerdo a Ross y Subramanian (1981), se tiene que el tipo de interacción que se da entre la proteína y el ligando corresponde a interacciones de tipo hidrofóbico.

En la tabla 2 se presentan los valores de las propiedades termodinámicas para la interacción entre la lisozima y la fenoltaleína a pH 4. El aumento de ΔG_u en función de la temperatura implica que la interacción es favorable.

Tabla 2. Propiedades termodinámicas de la interacción lisozima-fenoltaleína a pH 4.

T ($^{\circ}\text{C}$)	K_u (M^{-1})	ΔG^* (J/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/molK)
20	1267.7	-17405.7	100.7	403.9
25	3432.8	-20170.7		
30	4944.4	-21428.1		

* $\Delta G = -RT \ln K_u$

Conclusiones

Se estudió la interacción no covalente entre la lisozima y la fenoltaleína a pH 4, por seguimiento del apagamiento de la fluorescencia. Se observó la formación de un complejo lisozima-fenoltaleína con una estequiometría 1:1 y una interacción de tipo estático. Además, se determinaron los parámetros termodinámicos y se obtuvo que tanto ΔH como ΔS fueron mayores a cero, lo que implica que las fuerzas predominantes durante la interacción no-covalente son de naturaleza hidrofóbica.



Referencias

- B. Delavari, A. Saboury, M. Atri, A. Ghasemi, B. Bigdeli, A. Khammari, P. Maghami, A. Moosavi-M, T. Haertlé, B. Goliaei. (2015). Alpha-lactalbumin: A new carrier for vitamin D3 food enrichment. *Food Hydrocoll.*, 45, 124-131.
- Davies R.C., Neuberger A., Wilson G.M. (1969). The Dependence of Lysozyme activity on pH and ionic strength. *Biochim. Biophys. Acta*, 178: 294-503.
- Freire E. (2008). Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? *Drug Discov. Today*, 13: 869-874.
- Gorbenko G.P., Valeriya M. Ioffe M.V., Kinnunen P.K.J. (2007). Binding of Lysozyme to phospholipid bilayers: evidence for protein aggregation upon membrane association. *Biophys. J.*, 93: 140-153.
- Horn J.R., Brandts J.F., Murphy K.P. (2002). van't Hoff and calorimetric enthalpies II: effects of linked equilibria. *Biochemistry*, 41: 7501-7507.
- Lakowicz J.R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd Edition Springer, New York, USA.
- Li S., Li D. (2011). Investigation on the pH-dependent binding of benzocaine and Lysozyme by fluorescence and absorbance. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 82: 396-405.
- Matthyssens G.E., Giebels O., Kanarek L. (1974). Structure and antigenicity of hen egg-white Lysozyme fragments study of region 57-107. *Eur. J. Biochem.*, 43: 353-362.
- Olsson T., Williams M.A., Pitt W. R. (2008). The thermodynamics of protein-ligand interaction and solvation: insights for ligand design. *J. Mol. Biol.*, 384: 1002-1017.
- Ross P. D. and Subramanian S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20: 3096-3102.
- Samari F., Hemmateenejad B., Shamsipur M., Rashidi M., and Samouei H. (2012). Affinity of two novel five-coordinated anticancer Pt(II) complexes to human and bovine serum albumins: a spectroscopic approach. *Inorg. Chem.*, 51: 3454-3464.
- V. Suryawanshi, L. Walekar, A. Gore, P. Anbhule, G. Kolekar. (2016). Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin, *J. Pharm. Anal.*, 6: 56-63.
- van der Berg B., Chong E. W., Robinson C. V., Mateo P. L., and Christopher Dobson C. (1999). Oxidative refolding of hen Lysozyme and its catalysis by protein disulfide isomerase. *J. Europ. Mol. Biol. Organ.*, 18: 4794-4803.
- X. Zhu, J. Sun, Y. Hu. (2007). Determination of protein by hydroxypropyl- β -cyclodextrin sensitized fluorescence quenching method with erythrosine sodium as fluorescence probe. *Anal. Chem. Acta*, 596: 298-302.