



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE ALBUMINAS SÉRICAS E
MOLÉCULAS BIOLÓGICAMENTE ATIVAS**

Otávio Augusto Chaves

Sob a Orientação do Professor
Dr. Aurélio Baird Buarque Ferreira

e Co-orientação dos Professores
Dr. Carlos Maurício Rabello Sant'Anna
Dr. Dari Cesarin-Sobrinho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica

Seropédica, RJ
Julho de 2016

547

C512e

T

Chaves, Otávio Augusto, 1992-

Estudo da interação entre albuminas séricas e moléculas biologicamente ativas / Otávio Augusto Chaves. - 2016.

109 v.: il.

Orientador: Aurélio Baird Buarque Ferreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química, 2016.

Bibliografia: f. 87-96.

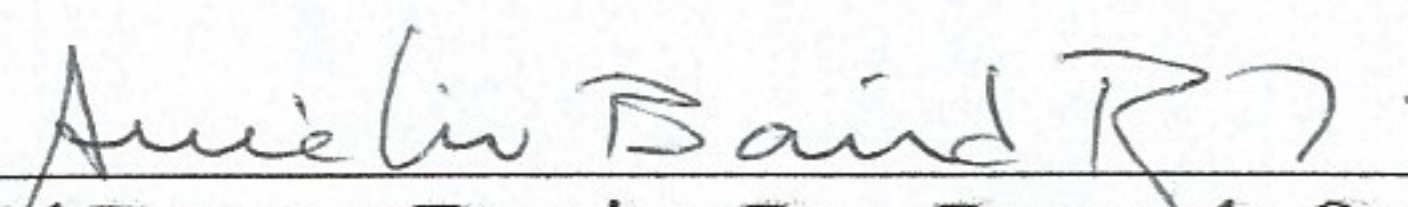
1. Química orgânica - Teses. 2. Albumina sérica - Teses. 3. Produtos naturais - Teses. 4. Compostos bioativos - Teses. 5. Análise espectral - Teses. I. Ferreira, Aurélio Baird Buarque, 1945- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

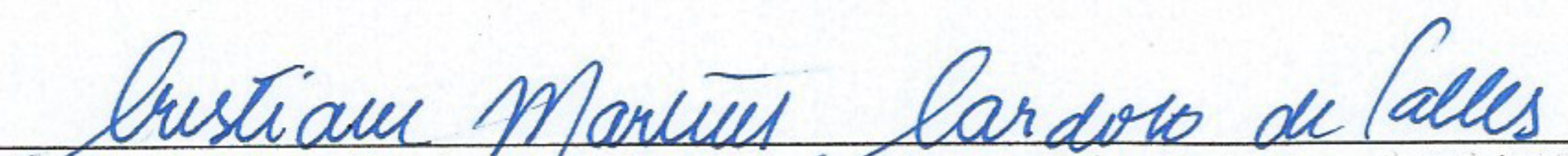
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

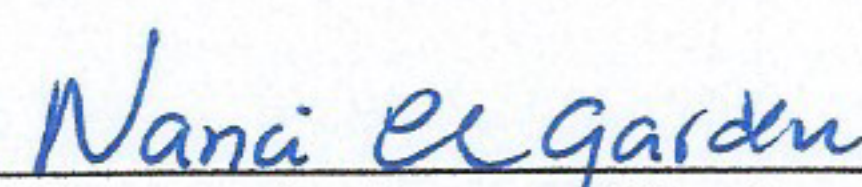
OTÁVIO AUGUSTO CHAVES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências,
no Programa de Pós-Graduação em Química, área de Concentração em Química Orgânica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19/11/16


Aurélio Baird Buarque Ferreira, Dr. - Depto. de Química/ICE/UFRRJ
(Presidente)


Cristiane Martins Cardoso Salles, Dra. - Depto. de Química /ICE/UFRRJ


Nanci Câmara de Lucas Garden, Dra. – Instituto de Química/UFRRJ

Cristiano Jorge Riger, Dr. - Depto. de Química /ICE/UFRRJ
(Suplente)

Rodrigo José Correa, Dr. – Instituto de Química/UFRRJ
(Suplente)

DEDICATÓRIA

“A vida é a arte do encontro, embora haja tanto desencontro pela vida.” (Vinícius de Moraes)

Em memória do meu pai, Adilson João Chaves.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original” (Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Ao professor, orientador e pai acadêmico, Dr. Aurélio Baird Buarque Ferreira pelos ensinamentos, estímulo, ajuda nos momentos mais difíceis, paciência e pelas lições científicas mais desafiadoras, instigantes e humanistas que somente ele poderia ensinar. Aos professores e coorientadores Dr. Carlos Maurício Rabello Sant'Anna e Dr. Darí Cesarin Sobrinho pelos ensinamentos, estímulos, paciência e amizade. Ao professor Dr. José Carlos Netto-Ferreira pelos ensinamentos científicos através de suas valiosas correções nos manuscritos.

Aos demais professores da UFRRJ, em especial Dra. Rosane Nora Castro, Dra. Cristiane M. C. Salles, Dra. Márcia C. C. de Oliveira, Dra Cayoco Ponzonni, Dr. Cristiano J. Riger, Dr. Marco Edilson F de Lima, Dr. Francisco de Assis e Dr. Arthur Kümmerle. Aos técnicos e funcionários do Departamento de Química/ ICE/ UFRRJ, em especial Dra. Catarina Del Cistia (laboratório de modelagem molecular), pela contribuição direta ou indireta, apoio e ajuda para a realização desta dissertação. Sem vocês o percurso seria mais árduo.

Aos professores do Grupo de Fotoquímica da UFRJ Dra. Nanci Câmara de Lucas Garden e Dr. Rodrigo Jose Correa por terem aberto as portas de seu laboratório de pesquisa para eu aprender algumas técnicas e me instigar ainda mais pela área de fotoquímica.

Agradeço aos meus amigos da República “*Desequilibrio Químico*”: Bruna Souza, João Paulo, Flávio Augusto e Mariana Falcão, pelas risadas, compreensão, amizade, carisma, simpatia e festas dentro e fora da república. Vocês fizeram meus dias em Seropédica serem mais aconchegantes e felizes. Aos companheiros e amigos de laboratório Leonardo Santos de Barros, Leonardo Araujo Silva, Romulo Correia e Cosme Henrique pelo apoio nessa jornada e em especial as alunas de I.C. Bruna Souza e Lorryne da Silva pela ajuda nas experiências finais. Agradeço a todos os colegas dos cursos de mestrado e de doutorado do PPGQ/ ICE/ UFRRJ, que me ajudaram direta ou indiretamente, e pela amizade.

A minha mãe Rosângela Maria Pereira, que mesmo distante, ouvia minhas lamentações e com todo o carinho me confortava nos momentos mais difíceis, ao meu falecido pai Adilson João Chaves, pelo incentivo e dedicação que me forneceu durante sua vida na Terra e aos meus familiares (Almir José, Luzia Chaves, Flávio Chaves, André Chaves, Márcio Chaves, Luana Chaves, Dirce Chaves, Mariele Chaves, Ana Cláudia Chaves, Rosemeire, Miriam, Raquel e Jaime) que tanto contribuíram para eu atingir essa conquista acadêmica. Sem a ajuda inicial de todos vocês eu não estaria aqui.

Ao governo de Lula e Dilma, à UFRRJ, ao órgão de fomento CNPq e a sociedade brasileira.

RESUMO

CHAVES, Otávio Augusto Chaves. **Estudo da Interação entre Albuminas Séricas e Moléculas Biologicamente Ativas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química, Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

As interações entre albumina sérica humana (ASH) com 18-FP, BZL, MTZ e MZ e entre albumina sérica bovina (ASB) com *t*-DCTN, PF, LF-B, PIA e α -lap foram estudadas por técnicas espectroscópicas (absorção molecular no UV-Vis, dicroísmo circular, emissão de fluorescência no estado estacionário e com resolução temporal) sobre condições fisiológicas. Cálculos teóricos por ancoramento molecular (do inglês *molecular docking*) foram executados para complementação dos dados experimentais e dessa forma obter resultados mais precisos. Os resultados obtidos para as constantes de velocidade de supressão de fluorescência das albuminas (k_q) são maiores do que a velocidade de difusão em água ($k_{diff} \approx 5,00 \times 10^9$ L/mols), indicando que há formação de um complexo no estado fundamental entre as albuminas com as moléculas biologicamente ativas (para amostra PIA tal dado foi confirmado com a fluorescência resolvida no tempo). Para as amostras *t*-DCTN e LF-B além do mecanismo estático foi observado à presença do mecanismo dinâmico e já para as amostras PF e PIA o cálculo de Förster mostra alta probabilidade de ocorrência de transferência de energia entre o fluoróforo e os supressores. Os valores termodinâmicos de energia livre de Gibbs, calculados para todas as amostras estão de acordo com a espontaneidade da associação. Parâmetros termodinâmicos de ΔH° e ΔS° forneceram indícios das principais interações intermoleculares na associação. As amostras 18-FP, *t*-DCTN, LF-B, PIA, α -lap, BZL e MTZ associam com a albumina *via* ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas e já PF e MZ por ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas. O número de sítios de ligação para todas as amostras indicam que há apenas uma principal cavidade da proteína para a associação das moléculas estudadas, sendo que essa associação é moderada para 18-FP, PF e LF-B, fraca para *t*-DCTN e forte para PIA, α -lap, BZL, MTZ e MZ. Estudos de dicroísmo circular demonstram que não há perturbações significativas na estrutura secundária da albumina com a associação. Cálculos teóricos *via* ancoramento molecular estão em total acordo com os resultados espectroscópicos.

Palavras-chave: Albumina sérica, produtos naturais, espectroscopia, ancoramento molecular

ABSTRACT

CHAVES, Otávio Augusto. **A Study of the Interaction between Serum Albumins and Biologically Active Molecules.** 2016. Dissertation (Master Science in Chemistry, Organic Chemistry) Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

The interactions between human serum albumin (HSA) with 18-PF, BZL, MTZ and MZ and between bovine serum albumin (BSA) with *t*-DCTN, PF, LF-B, PIA and α -lap were studied by spectroscopic techniques (molecular absorption in the UV-Vis region, circular dichroism, emission fluorescence in the steady state and temporal resolution) under physiological conditions. Theoretical calculations by molecular docking were performed to complement the experimental data and thus offer accurate to the results. The results obtained for the fluorescence quenching rate constant (k_q) is greater than the diffusion rate constant in water ($k_{diff} \approx 5,00 \times 10^9$ L/mol), indicating that there is formation of complex between albumin and biologically active molecules in the ground state (for the sample PIA we confirmed this data with time resolved fluorescence experiments). For *t*-DCTN and LF-B beyond the static mechanism it was observed the presence of dynamic fluorescence quenching mechanism. Finally, for PF and PIA Förster theory shows that the energy transfer between the fluorophore and the quenchers can occurs with high probability. The thermodynamic values for Gibbs' free energy are in accordance with the spontaneity of the association, for all the samples. Thermodynamic parameters ΔH° and ΔS° provided evidence of the main intermolecular interactions in the association. The samples 18-FP, *t*-DCTN, LF-B, PIA, α -lap, BZL and MTZ interact with albumin by hydrogen bonding and hydrophobic interactions. On the other hand, PF and MZ interact by hydrogen bonding and electrostatic forces. The number of binding sites shows that there is only one main cavity of the protein to the interaction. For 18-PF, PF and LF-B the binding is weak, for *t*-DCTN the binding is moderate and for PIA, α -lap, BZL, MTZ and MZ the binding is strong. Circular dichroism results show that upon binding of samples with the albumin there are no significant perturbations on the secondary structure of the protein. Theoretical calculations by molecular docking are in full agreement with the spectroscopic results.

Key words: Serum albumin, natural product, spectroscopy, molecular docking

LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

ASB	Albumina sérica bovina
ASH	Albumina sérica humana
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
UV-Vis	Espectrofotometria no ultravioleta/visvel
DC	Dicroísmo circular
MRE	Elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual
18-FP	Feofitina (17 <i>R</i> ,18 <i>R</i>)-purpurina 18-fitil ster
α -lap 5,10-diona	α -lapachona, 2,2-dimetil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzo [g] cromeno-
<i>t</i> -DCTN	Diterpeno 19- <i>nor</i> -clerodano <i>trans</i> -desidrocrotonina
PF	Flavonide glicosilado, 7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glicopiranosil-6-(3-metilbut-2-enil)-3,5,4'-diidroxiflavona
LF-B	Lofirona B, (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-(5-((<i>E</i>)-3-(2,4-diidroxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)-2-hidroxifenil)-7-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)croman-4-ona
PIA	alcalide plumernico, N ¹ -Cinamoil-12-metxi-cilindrocarina ((2 <i>β</i> ,12 <i>β</i> ,19 <i>α</i>)-1-[(2 <i>E</i>)-3-fenilprop-2-enoil]aspidospermidin-21-oato de metila)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valor de constante de dissociação (pK), ponto isoeletrônico (pI) e classificação da polaridade (Apolar ou Polar) dos aminoácidos normalmente encontrados em proteínas. Adaptado de Lehninger *et al.* (2002). 13
- Tabela 2** – Coeficiente de absorvidade molar para Phe, Tyr e Trp em solução aquosa neutra a 296 K. 23
- Tabela 3** – Experiências realizadas para cada amostra. Espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário (FES), espectroscopia de dicroísmo circular (DC), espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo (FRT), espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis (AMUV-Vis) e ancoramento molecular (AM). 29
- Tabela 4** – Valores de K_{SV} , k_q , K_a e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) da associação ASH:18-FP em 296 K, 303 K e 310 K. 41
- Tabela 5** – Valores de K_{SV} , k_q , K_b , n e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) da associação ASB:*t*-DCTN em 296 K, 303 K e 310 K. 47
- Tabela 6** – Valores de K_{SV} , k_q , K_a , K_b e n da associação ASB:PF em 296 K, 303 K e 310 K. 53
- Tabela 7** – Parâmetros termodinâmicos da associação ASB:PF em 296 K, 303 K e 310 K. 54
- Tabela 8** – Resíduos de aminoácidos, tipos de interações intermoleculares e valores de distância das interações na associação ASB:PF no subdomínio IIA da proteína. 57
- Tabela 9** – Valores de K_{SV} , k_q , K_a e n da associação ASB:LF-B em 296 K, 303 K e 310 K. 60
- Tabela 10** – Parâmetros termodinâmicos da associação ASB:LF-B em 296 K, 303 K e 310 K. 61
- Tabela 11** – Valores de K_{SV} , k_q , K_b , n e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) da associação ASB:PIA em 296 K, 303 K e 310 K. 66
- Tabela 12** – Valores de K_{SV} , k_q , K_a , K_b e n da associação ASB: α -lap em 288 K, 293 K e 298 K. 71
- Tabela 13** – Parâmetros termodinâmicos da associação ASB: α -lap em 288 K, 293 K e 298 K. 72
- Tabela 14** – Valores de K_{SV} , k_q e K_a da associação ASH:BZL, ASH:MTZ e ASH:MZ em 296 K, 303 K e 310 K. 78
- Tabela 15** – Valores dos parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) da associação ASH:BZL, ASH:MTZ e ASH:MZ em 296 K, 303 K e 310 K. 79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Resumo esquemático do ciclo oxidativo das quinonas, representado pela α -lapachona. 8
- Figura 2** – Ciclo do parasita da doenças de Chagas. Adaptado de dpd.cdc.gov, acessado em 03/07/2016. 10
- Figura 3** – Representação dos diversos níveis organizacionais de uma proteína. Adaptado de Berg *et al.*, 2008. 14
- Figura 4** – Da esquerda para direita, estrutura cristalográfica da ASB (pdb: 3V03) e ASH (pdb: 1N5U) com a distinção de seus domínios I (castanho), II (verde) e III (cinza), respectivamente. Na ASB o triptofano Trp-134 está localizado no domínio I (castanho) e o Trp-212 no domínio II (verde), já na ASH o Trp-214 está localizado no domínio II (verde). 17
- Figura 5** – Espectro de absorção e emissão de fluorescência para os aminoácidos a) fenilalanina, b) tirosina e c)triptofano [modificado de Lakowicz (2006)] 23
- Figura 6** – Variação da eficiência da transferência de energia pelos mecanismos dipolo-dipolo (Förster) e de troca eletrônica (Dexter) com a separação entre doador e acceptor de energia. 24
- Figura 7** – Representação esquemática da integral de sobreposição para o processo de Transferência de energia ressonante (não-radiativa) de Förster [modificado de Turro (1978)] 24
- Figura 8** – Estruturas químicas e a simbologia usada na representação dos compostos estudados neste trabalho. 26/28
- Figura 9** – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) e feofitina em etanol. $C_{ASH} = C_{18-FP} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L. 39
- Figura 10** - Espectros de emissão de fluorescência do fluoróforo interno da ASH (Trp-214) e sua supressão pela adição da 18-FP. ASH em solução tampão de PBS (pH=7,4). *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASH:18FP a 296 K, 303 K e 310 K. $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{18-FP} = 0,55; 1,10; 1,65; 2,19; 2,73; 3,27; 3,81, 4,34 \times 10^{-6}$ mol/L, $T = 296$ K e $\lambda_{exc} = 280$ nm. 40
- Figura 11** - Gráfico de Stern-Volmer modificado para associação ASH:18-FP a 296 K, 303 K e 310 K. *Inset*: Gráfico de van't Hoff, a partir dos dados de Stern-Volmer modificado nas três temperaturas de estudo. 41
- Figura 12** – (A) Melhor resultado de pontuação (do inglês *pose*) para associação ASH:18-FP por ancoramento molecular (função *ChemPLP*). (B) Representação da superfície molecular da ASH, onde pode ser vista a cadeia apolar da feofitina (grupo fitila) completamente envolvida pela porção hidrofóbica da albumina. Carbono: azul (18-FP), verde (ASH), amarelo (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul (figuras geradas com o *software* PyMOL). 43

Figura 13 - Espectros de emissão de fluorescência dos fluoróforos internos da ASB e sua supressão pela adição do *t*-DCTN. ASB em solução tampão de PBS (pH=7,4). *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASB: *t*-DCTN a 296 K, 303 K e 310 K. $C_{ASB} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{t-DCTN} = 0,24; 0,47; 0,70; 0,83; 1,15; 1,37 \times 10^{-4}$ mol/L, T = 296 K e $\lambda_{exc} = 280$ nm.45

Figura 14 - Gráfico do $\log [(F_0-F)/F]$ vs. $\log [Q]$ para ASB:*t*-DCTN a 296 K, 303 K e 310 K. 46

Figura 15 - Gráfico de van't Hoff a partir dos valores de K_{SV} versus o inverso da temperatura. 47

Figura 16 - Espectros de DC para ASB livre e ASB associada a *t*-DCTN em diferentes concentrações de ligante a 310 K. $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{t-DCTN} = 0,24; 0,70$ e $1,15 \times 10^{-4}$ mol/L. 48

Figura 17 - (A) Melhor resultado de pontuação (do inglês *pose*) e superfície de *van der Waals* para associação ASB:*t*-DCTN por ancoramento molecular (função *ChemPLP*). (B) Representação da superfície molecular da ASB para a região IB. Carbono: azul (*t*-DCTN), verde (ASB), bege (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul (figuras geradas com o *software* PyMOL). 50

Figura 18 - Espectros de emissão de fluorescência dos fluoróforos internos da ASB e sua supressão pela adição do PF. ASB em solução tampão de PBS (pH=7,4). *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASB:PF a 296 K, 303 K e 310 K. $C_{ASB} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{PF} = 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,74; 3,09 \times 10^{-5}$ mol/L, T = 296 K e $\lambda_{exc} = 280$ nm. 51

Figura 19 - Gráfico de Stern-Volmer modificado para associação ASH:PF a 296 K, 303 K e 310 K. *Inset*: Gráfico de van't Hoff, a partir dos dados de Stern-Volmer modificado nas três temperaturas de estudo. 52

Figura 20 - Gráfico do $\log [(F_0-F)/F]$ vs. $\log [Q]$ para ASB:PF a 296 K, 303 K e 310 K. 53

Figura 21 - Sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência da ASB e absorção do supressor PF. $C_{ASB} = C_{PF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L a 310 K. 54

Figura 22 - Espectros de DC para ASB livre e ASB associada a PF em diferentes concentrações de ligante a 310 K. $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{PF} = 0,34; 1,37; 2,74$ e $3,09 \times 10^{-5}$ mol/L. 55

Figura 23 - Melhor resultado de pontuação (do inglês *pose*) para associação ASB:PF por ancoramento molecular (função *ChemPLP*) no subdomínio IIA. Carbono: laranja (PF), verde (ASB), azul (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul. O resíduo Glu-152 está representado em amarelo para indicar que é o único resíduo de aminoácido que interage comoceptor de ligação de hidrogênio (figuras geradas com o *software* PyMOL). 56

Figura 24 - Espectros de emissão de fluorescência dos fluoróforos internos da ASB e sua supressão pela adição da LF-B. ASB em solução tampão de PBS (pH=7,4). *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASB:LF-B a 296 K, 303 K e 310 K. $C_{ASB} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L,

$C_{LF-B} = 1,11; 2,21; 3,30; 4,39; 5,46; 6,54; 7,60; 8,66 \times 10^{-6}$ mol/L, $T = 296$ K e $\lambda_{exc} = 280$ nm. 58

Figura 25 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para associação ASB:LF-B a 296 K, 303 K e 310 K. *Inset*: Gráfico de van't Hoff, a partir dos dados de Stern-Volmer modificado nas três temperaturas de estudo. 59

Figura 26 – Gráfico do $\log [(F_0-F)/F]$ vs. $\log [Q]$ para ASB:LF-B a 296 K, 303 K e 310 K. 60

Figura 27 – Espectros de DC para ASB livre e ASB associada a LF-B em diferentes concentrações de ligante a 310 K. $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF-B} = 1,11; 4,39; 6,54$ e $8,66 \times 10^{-6}$ mol/L. 62

Figura 28 - (A) Representação da superfície molecular da ASB para o melhor resultado de ancoramento molecular para associação ASB:LF-B no subdomínio IIA (função *ChemPLP*). **(B)** Representação dos resíduos de aminoácidos participantes da interação ASB:LF-B no subdomínio IIA. Carbono: pink (LF-B), verde (ASB), amarelo (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul (figuras geradas com o *software* PyMOL). 63

Figura 29 – Espectros de emissão de fluorescência dos fluoróforos internos da ASB e sua supressão pela adição de PIA. ASB em solução tampão de PBS (pH=7,4). *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASB:PIA a 296 K, 303 K e 310 K. $C_{ASB} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{PIA} = 1,11; 2,21; 3,30; 4,39; 5,46; 6,54; 7,60; 8,66 \times 10^{-6}$ mol/L, $T = 296$ K e $\lambda_{exc} = 280$ nm. 64

Figura 30 – Gráfico de duplo logaritmo para associação ASB:PF a 296 K, 303 K e 310 K. *Inset*: Gráfico de van't Hoff, a partir dos dados da constante de ligação (K_b) nas três temperaturas de estudo. 65

Figura 31 – Sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência da ASB e absorção do supressor PIA. $C_{ASB} = C_{PIA} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L a 310 K. 66

Figura 32 – Espectros de DC para ASB livre e ASB associada a PIA a 310 K. $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{PIA} = 2,22 \times 10^{-6}$ mol/L. 67

Figura 33 - (A) Representação da superfície molecular da ASB para o melhor resultado de ancoramento molecular para associação ASB:PIA no subdomínio IIA (função *ChemPLP*). **(B)** Representação dos resíduos de aminoácidos participantes da interação ASB:PIA no subdomínio IIA. Carbono: pink (PIA), verde (ASB), amarelo (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul (figuras geradas com o *software* PyMOL). 68

Figura 34 – Espectros de emissão de fluorescência dos fluoróforos internos da ASB e sua supressão pela adição de α -lap. ASB em solução tampão de PBS (pH=7,4) a 298 K. *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASB: α -lap a 288 K, 293 K e 298 K. $C_{ASB} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{\alpha-lap} = 0,42; 0,83; 1,24; 1,64; 2,05; 2,45; 2,85$ e $3,25 \times 10^{-6}$ mol/L, $T = 298$ K e $\lambda_{exc} = 280$ nm. 69

Figura 35 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para associação ASB: α -lap a 288 K, 293 K e 298 K. *Inset*: Gráfico de van't Hoff, a partir dos dados de Stern-Volmer modificado nas três temperaturas de estudo. 70

Figura 36 – Gráfico de duplo logaritmo para associação ASB: α -lap a 288 K, 293 K e 298 K. 71

Figura 37 – Espectros de DC para ASB livre e ASB associada a α -lap em diferentes concentrações de ligante a 298 K. $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{\alpha\text{-lap}} = 0,39; 0,79; 1,57$ e $3,10 \times 10^{-5}$ mol/L. 73

Figura 38 – Representação do melhor resultado de ancoramento molecular para associação ASB: α -lap no subdomínio IIA (função *ChemPLP*). Carbono: laranja (α -lap), verde (ASB), bege (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul (figuras geradas com o *software* PyMOL). 74

Figura 39 – Espectros de emissão de fluorescência da ASH e sua supressão pela adição de BZL (A), MTZ (B) e MZ (C). ASH em solução tampão de PBS (pH=7,4) a 310 K. *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASH:BZL (A), ASH:MTZ (B) e ASH:MZ (C) a 298 K, 303 K e 310 K. $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{BZL} = C_{MTZ} = C_{MZ} = 0,56; 0,84; 1,12; 1,40; 1,67; 1,95; 2,22 \times 10^{-6}$ mol/L, pH = 7.4 e $\lambda_{exc} = 280$ nm.. 76

Figura 40 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para associação ASH:BZL (A), ASH:MTZ (B) e ASH:MZ (C) a 296 K, 303 K e 310 K. *Inset*: Gráfico de van't Hoff, a partir dos dados de Stern-Volmer modificado nas três temperaturas de estudo. 77

Figura 41 – Espectros de DC para ASH livre e ASH associada com BZL (A), MTZ (B) e MZ (C) em pH = 7,4 a 310 K. $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{BZL} = C_{MTZ} = C_{MZ} = 2,22 \times 10^{-6}$ mol/L. 80

Figura 42 – (A) Representação do melhor resultado de ancoramento molecular para associação ASH:BZL no subdomínio IIA (função *ChemPLP*). (B) Representação do melhor resultado de ancoramento molecular para associação ASH:MTZ no subdomínio IIA (função *ChemPLP*). (C) Representação do melhor resultado de ancoramento molecular para associação ASH:MZ no subdomínio IIA (função *ChemPLP*). Carbono: pink (BZL), laranja (MTZ) e bege (MZ), verde (ASH), amarelo (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul (figuras geradas com o *software* PyMOL). 83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Compostos Biologicamente Ativos Estudados (Planta de origem – substância)	1
1.1.1 <i>Talinum triangulare</i> – Feofitina 18-FP	1
1.1.2 <i>Croton cajucara</i> Benth – 19- <i>nor</i> -clerodano (<i>t</i> -DCTN)	2
1.1.3 <i>Ouratea hexasperma</i> – Flavonóide Glicosilado (PF)	4
1.1.4 <i>Luxemburgia nobilis</i> – Lofirona B (LF-B)	4
1.1.5 <i>Aspidosperma cylindrocarpon</i> – Alcalóide plumerânico (PIA)	5
1.1.6 Ipê (<i>Tabebuia spp.</i>) – Naftoquinona: α -lapachona	6
1.1.7 Fármacos antiparasitários – Benzonidazol (BZL), Metronidazol (MTZ) e Megazol (MZ)	9
1.2 Aminoácidos e Proteínas	12
1.2.1 Albumina Sérica Bovina e Albumina Sérica Humana	16
1.3 Estudo da Interação entre Albuminas Séricas e Compostos Bioativos	18
1.4 Absorção de Luz no Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	19
1.5 Absorção de Luz Circularmente Polarizada Dicroísmo circular - Cálculo da Porcentagem de Estrutura Hélice-α	20
1.5.1 Cálculos da Porcentagem de Estrutura Hélice- α	21
1.6. Estudos de Fluorescência de Proteínas	22
1.6.1 Estudos de Supressão de Fluorescência	23
2. OBJETIVO	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1.1 Aparelhos	27
3.1.2 Reagentes	27
3.2 Métodos	29
3.2.1 Soluções	30
3.2.2 Estudos Espectroscópicos na Região do Ultravioleta/Visível (UV-Vis)	30
3.2.3 Estudos Espectroscópicos de Emissão de Fluorescência	30
3.2.4 Estudos Espectroscópicos de Dicroísmo Circular	31
3.2.5 Estudos Espectroscópicos de Fluorescência Resolvida no Tempo	31
3.2.6 Estudos Computacionais por Ancoramento Molecular	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33

4.1 Equações Empregadas na Análise dos Dados Experimentais	33
4.1.1 Espectroscopia de Fluorescência	33
4.1.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)	37
4.2 Interação entre Albumina Sérica Humana (ASH) com Feofitina (18-FP)	38
4.2.1 Absorção Molecular na Região do UV-Vis	38
4.2.2 Espectroscopia de Fluorescência	39
4.2.3 Modelagem Molecular	41
4.3 Interação entre Albumina Sérica Bovina (ASB) com <i>trans</i>-desidrocrotonina (<i>t</i>-DCTN)	43
4.3.1 Espectroscopia de Fluorescência	43
4.3.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)	47
4.3.3 Modelagem Molecular	48
4.4 Interação entre Albumina Sérica Bovina (ASB) com flavonóide glicosilado (PF; 7-<i>O</i>-β-<i>D</i>-glicopiranosil-6-(3-metilbut-2-enil)-3,5,4'-trihidroxiavona)	50
4.4.1 Espectroscopia de Fluorescência	50
4.4.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)	54
4.4.3 Modelagem Molecular	55
4.5 Interação entre Albumina Sérica Bovina (ASB) com lofirona B (LB-B)	57
4.5.1 Espectroscopia de Fluorescência	57
4.5.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)	61
4.5.3 Modelagem Molecular	62
4.6 Interação entre Albumina Sérica Bovina (ASB) com alcaloide plumerânico (PIA)	63
4.6.1 Espectroscopia de Fluorescência	63
4.6.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)	66
4.6.3 Modelagem Molecular	67
4.7 Interação entre Albumina Sérica Bovina (ASB) com α-lapachona (α-lap)	68
4.7.1 Espectroscopia de Fluorescência	68
4.7.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)	72
4.7.3 Modelagem Molecular	73
4.8 Interação entre Albumina Sérica Humana (ASH) com fármacos anti-chagásicos: benzonidazol (BZL), metronidazol (MTZ) e megalzol (MZ)	74
4.8.1 Espectroscopia de Fluorescência	74
4.8.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)	79
4.8.3 Modelagem Molecular	81

5. CONCLUSÕES	84
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
7. ANEXO	97

1. INTRODUÇÃO

Os compostos orgânicos exógenos, que possuem atividade biológica, seja esta benéfica (fármacos) ou não (venenos, toxinas) são, geralmente, distribuídos pelo organismo através da circulação sanguínea. Como, em grande número de casos, a sua solubilidade em fase aquosa é limitada, a interação com proteínas carreadoras presente no plasma sanguíneo é fundamental. Dentre estas, destacam-se as albuminas séricas.

Esta dissertação estuda a interação entre certas substâncias bio-ativas e as albuminas séricas, bovina e humana.

Para isto, estudou-se experimentalmente a fluorescência e o dicróismo circular das proteínas e sua alteração, ou não, pela adição dessas substâncias. Paralelamente, foram avaliadas essas interações através de estudos teóricos, empregando métodos quânticos de determinação de energia x estrutura e de ancoramento de moléculas orgânicas no interior de proteínas.

1.1 Compostos Biologicamente Ativos Estudados (Planta de origem – substância)

1.1.1 *Talinum triangulare* – Feofitina 18-FP

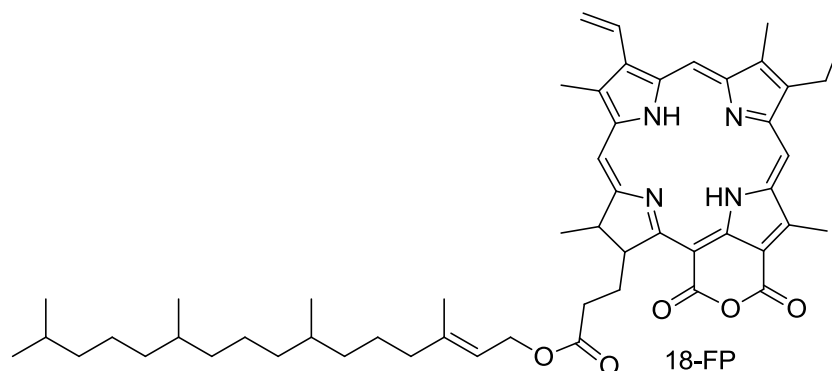
A família Portulacaceae consiste em ervas anuais carnudas, com aproximadamente 30 gêneros e cerca de quinhentas espécies, predominantemente de regiões tropicais e subtropicais da África e das Américas, mas algumas espécies podem ocasionalmente ser encontrados na Europa, Ásia e Oceania [Rodrigues *et al.* (2003) e Ekpo *et al.* (2007)]. O gênero *Talinum* pertence à família Portulacaceae; uma destas espécies, *Talinum triangulare* (*syn Talinum fruticosum auct. non* (L.) Juss.), popularmente conhecida no Brasil como João Gomes, língua de vaca, caruru do Pará e cariru [Kohda *et al.* (1992)], é um alimento vegetal não convencional, consumido principalmente na região norte, especialmente na Amazônia e Pará, devido ao seu alto teor nutricional, que pode ser utilizado na alimentação infantil como um substituto do espinafre (*Spinacia oleracea*) [Rodrigues *et al.* (2003)].

Relatos na literatura científica mostram que *triangulare* tem atividades antioxidantes e o extrato hidrometanólico do caule é uma fonte de alantoína, ácido aspártico, e saponinas, assim como metabólitos especiais como acrilamidas, dentre outros compostos nitrogenados. Os extratos de diclorometano e acetato de etila das folhas são ricos em compostos da classe de metabólitos especiais, chamados de feofitina, análogos de porfirinas, que têm a capacidade de formar complexos com metais [Amorim *et al.* (2013) e Amorim *et al.* (2014a)].

Estudos recentes têm mostrado que o extrato hidroetanólico das folhas de *triangulare* tem atividade antitumoral em linhagens celulares [Amorim *et al.* (2014b)]. Além disso, a atividade estimulante da função cerebral em ratos de laboratório é atribuída a ingestão da planta [Ofusori *et al.* (2008)].

Para o tratamento de certos tipos de cânceres por terapia fotodinâmica, pode-se usar feofitinas – moléculas orgânicas classificadas como segunda geração de fotossensibilizadores [Ben Dror *et al.* (2009)]. A feofitina (17*R*,18*R*)-purpurina-18-fetil éster (18-FP, Esquema 1) – isolada da planta *triangulare* – além de absorver luz em comprimento de onda a 400 nm, correspondente à banda de Soret [Giovannetti (2012)], também absorve comprimentos de onda maiores, 550 nm e 700 nm. A descoberta e desenvolvimento de moléculas que absorvem radiação no infra-vermelho próximo (600-900 nm) oferecem novas oportunidades, tanto para terapia fotodinâmica, quanto como agentes de contraste para imagens médicas. Isto devido à alta penetração da irradiação no tecido, sem causar danos à saúde [Luo *et al.* (2011)].

A aplicação destes fotossensibilizadores pode ser intravenosa ou por onda de pressão; nos dois casos há difusão para a corrente sanguínea.



Esquema 1

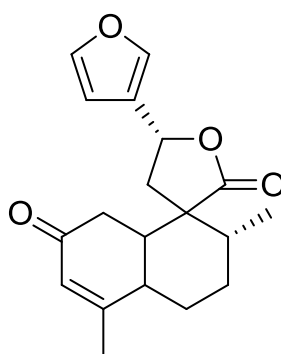
1.1.2 *Croton cajucara* Benth – 19-*nor*-clerodano (*t*-DCTN)

Croton cajucara Benth. (Euphorbiaceae), popularmente conhecida como "sacaca", é uma árvore da região amazônica, norte do Brasil, utilizada na medicina popular. A casca do caule da planta tem sido usada para o tratamento de fígado, estômago, rins, distúrbios e diminuição dos níveis de colesterol no fluido sanguíneo [Van Den Berg *et al.* (1993) e Di Stasi *et al.* (1994)]. *Cajucara* é uma rica fonte de diterpenos do tipo clerodânico, [Maciel *et al.* (1998)] sendo que a *trans*-desidrocrotonina, um diterpeno 19-*nor*-clerodânico (*t*-DCTN – Esquema 2), é o principal componente da casca do caule da sacaca. Este composto é um dos mais representativos clerodânicos bioativo relatado na literatura e tornou-se um alvo

importante para a pesquisa pré-clínica. Na verdade, os estudos farmacológicos empregando *t*-DCTN confirmou alguns de seus efeitos, tais como: anti-inflamatório, analgésico [Carvalho *et al.* (1996), anti-tumoral [Grynberg *et al.* (1999)], antiúlcera [Hiruma-Lima *et al.* (1999) e Rodriguez *et al.* (2004)], hipolipidêmico e cardioprotetor [Silva *et al.* (2005)]. Também tem sido demonstrado que a *t*-DCTN apresenta atividade antimutagênica e não induz atividade clastogênica, apoptótica e citotóxica [Santos *et al.* (2008)].

Por outro lado, casos de hepatite aguda e crônica têm sido relatados na região amazônica em pacientes que utilizaram *cajucara* em dietas para reduzir colesterol [Soares (2004)] e foi estabelecido que pacientes crônicos tratados com uma infusão de sua casca sofreram alguns efeitos tóxicos. Esta toxicidade foi atribuída, pelo menos parcialmente, para o *t*-DCTN [Maciel *et al.* (2000) e Rodríguez *et al.* (2004)] e pode ser amenizada pela utilização de encapsulação do princípio ativo em lipossomas, assegurando uma liberação gradual e controlada na organismo [Lapenda *et al.* (2013)]

Na literatura tem sido observado que a molécula de *t*-DCTN interage favoravelmente com fosfolipídeos [Filho *et al.* (2010)] e afeta a distribuição de lipídeos no sangue [Silva *et al.* (2001)]. Até agora, nenhum trabalho sobre o estudo de ligação de *t*-DCTN com albumina sérica foi relatado. Como a albumina sérica é o principal veículo para a biodistribuição de moléculas no sangue humano, é muito importante compreender a interação entre *t*-DCTN:albumina.

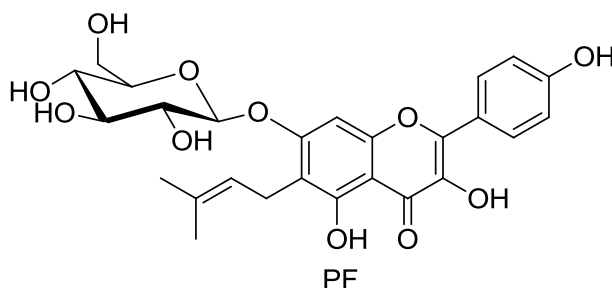


t-DCTN

Esquema 2

1.1.3 *Ouratea hexasperma* – Flavonóide Glicosilado (PF)

A família Ochnaceae compreende cerca de 27 gêneros e 600 espécies distribuídas em zonas tropicais e subtropicais em todo o mundo. Já o gênero *Ouratea* compreende aproximadamente 300 espécies tropicais que ocorrem principalmente na América do Sul, tendo sido relatada seu uso na medicina popular para o tratamento de desconforto gástrico, disenteria e diarreia [Heywood (1978), Daniel *et al.* (2005) e Sastre (2007)]. *Ouratea* e os outros gêneros da família Ochnaceae são uma rica fonte de flavonóides e biflavonóides. Geralmente os biflavonóides são encontrados como flavonas, dímeros de chalcona e, raramente, como biisoflavonas, e podem ser utilizados como marcadores quimiotaxonômicos de gênero [Fidelis *et al.* (2014)]. Além dos flavonóides e biflavonóides, vários metabólitos tem sido isolados a partir deste gênero, tais como triterpenos, diterpenos, esteróides, monossacáridos, e triacilglicerídeos [de Carvalho *et al.* (2008)]. Alguns flavonóides, como 7-O- β -D-glicopiranosil-6-(3-metilbut-2-enil)-3,5,4'-triidroxiflavona (PF, Esquema 3), bem como extratos de espécies *Ouratea* apresentam atividades biológicas importantes, como citotóxica, antitumoral, antiviral, vasodilatador, antimicrobiano e um inibidor da DNA topoisomerase [Daniel *et al.* (2007), Fidelis *et al.* (2012) e Fidelis *et al.* (2014)], 4,6,7].

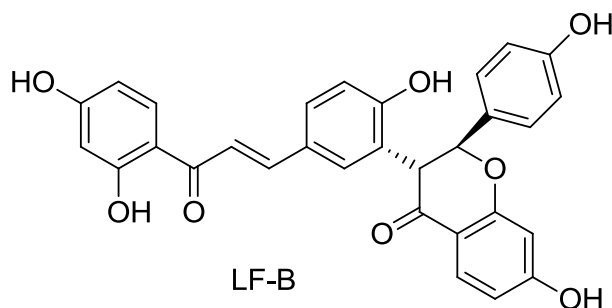


Esquema 3

1.1.4 *Luxemburgia nobilis* – Lofirona B (LF-B)

Espécies Ochnaceae dos gêneros *Luxemburgia* e *Ouratea* são frequentes no Brasil e são uma rica fonte de chalconas, flavonóides e biflavonóides [Oliveira *et al.* (2005)]. Estes compostos apresentam atividades biológicas importantes, tais como citotoxicidade, antitumoral, antiviral, vasodilatação, antimicrobiana e inibição da DNA topoisomerase [Fidelis *et al.* (2014)]. A molécula (2*S*,3*R*)-3-(5-((*E*)-3-(2,4-diidroxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)-2-hidroxifenil)-7-hidroxi-2-(4-hidroxifenil) croman-4-ona, lofirona B (LF-B, Esquema 4) é um flavonóide que contém uma porção de chalcona, que pode ser encontrado nas raízes de *Luxemburgia nobilis*. Diferentes estudos biológicos revelaram que lofirona B previne danos

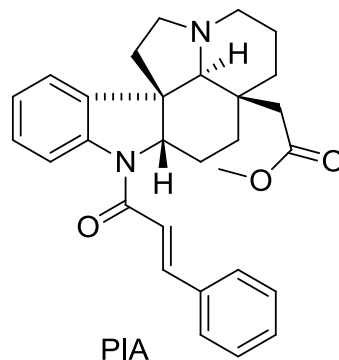
oxidativos induzidos pela AFB₁ em hepatócitos de ratos [Ajiboye *et al.* (2016)], atividade anticancerígena, antimutagenica e antioxidante [Ajiboye *et al.* (2014a)], como também tem a capacidade de aumentar a expressão e a atividade específica de enzimas citoprotetores (glutaciona-S-transferase, epóxido hidrolase, e uridil glicuronosil-transferase) [Ajiboye *et al.* (2014b)].



Esquema 4

1.1.5 *Aspidosperma cylindrocarpon* – Alcalóide plumerânico (PIA)

A família Apocynaceae consiste em 424 gêneros, divididos em 17 tribos que estão subdivididos em cinco subfamílias: Rauwolfioideae, Apocynoideae, Asclepioideae, Periplocoideae e Secamonioidae. Cerca de 400 espécies de Apocynaceae foram identificadas e agrupadas em 41 gêneros no Brasil, 78% dos quais são encontrados somente no região Amazonica - entre eles, *Aspidosperma cylindrocarpon* a partir das séries *Polyneura* (popularmente conhecido no Brasil como peroba-osso ou peroba-rosa) [Guimarães *et al.* (2012)]. Tem um elevado teor de alcalóides indólicos e têm sido extensivamente estudadas na área de fitoquímica e farmacologia [Pereira *et al.* (2007)]. Muitos alcalóides indólicos com diferentes atividades biológicas foram descritos na literatura. Entre eles, pode-se citar anidrovinblastina, vinblastina e vincristina com efeitos antitumorais, [Almagro *et al.* (2015)], usambarensina, com atividade espasmolítica e diidrotoxiferina, calebassina, C-curarina e afrocurarina como agentes competitivos para bloqueadores neuromusculares [Angenot *et al.* (1975)]. Além disso, reserpina mostra atividade letal contra larvas de *Artemia franciscana* [Quiquard *et al.* (2003)] e aspidolimidina e aspidolalbina apresenta atividade antimalárica [Oliveira *et al.* (2009)]. O alcaloide plumerânico N¹-cinamoil-12-metoxicilindrocarina (ou (2β, 12β, 19α)-1-[(2E)-3-fenilprop-2-enoil]aspidospermidin-21-oato de metila) (PIA, Esquema 5) é um alcalóide indólico com atividade antimalárica, obtido a partir da casca do caule de *Aspidosperma cylindrocarpon* [Guimarães *et al.* (2013)].

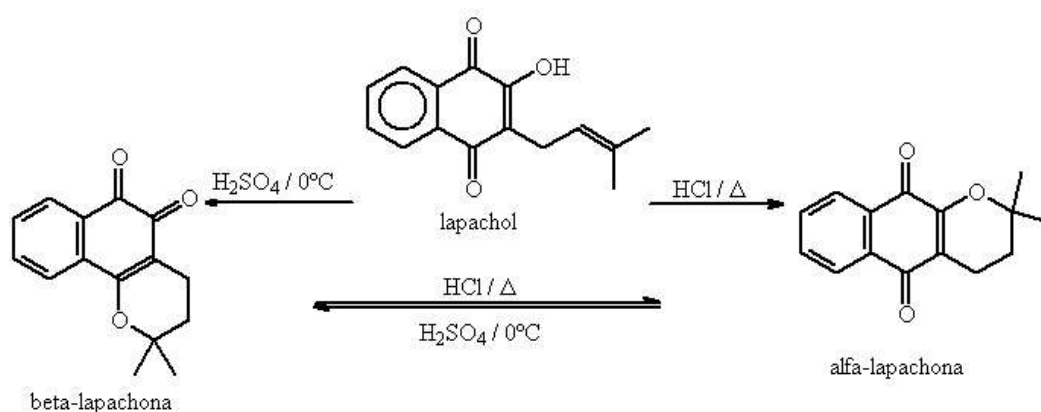


Esquema 5

1.1.6 Ipê (*Tabebuia spp.*) - Naftoquinona: α -lapachona

As quinonas podem ser definidas quimicamente como compostos formados a partir da oxidação de fenóis. Na natureza as quinonas são encontradas em várias famílias de plantas, fungos, bactérias e insetos, e se destacam por apresentar atividade antimalária [Santos *et al.* (2004), Fieser (1927) e Fieser *et al.* (1948)], antitumoral [Silva *et al.* (2003), Liu *et al.* (2004) e Asche (2005)], antiviral [Pinto *et al.* (1987)], anti-inflamatória [Almeida *et al.* (1990)], antibacteriana [Guiraud *et al.* (1994)], antifúngica [Garnier *et al.* (1996) e Almeida *et al.* (1990)], tripanossomicida [Pinto *et al.* (2000), De Moura *et al.* (2001) e Garnier *et al.* (1996)], moluscicida [Santos *et al.* (2000), Dos Santos *et al.* (2001), Asche (2005) e Barbosa *et al.* (2005)], leishmanicida [Teixeira *et al.* (2001)], antiprotozoário [De Moura *et al.* (2001) e Zani *et al.* (1997)] e inibidora da enzima transcriptase reversa do vírus HIV [Stagliano *et al.* (2006) e Zani *et al.* (1997)]. Naftoquinonas são substâncias com grande importância na química medicinal, devido à sua capacidade de atuar como um agente oxirredutor através da parte quinoidal, podendo assim atuar no transporte de elétrons e processos de fosforilação oxidativa.

A α -lapachona (2,2-dimetil-3,4-diidro-2H-benzo [g] cromeno-5,10-diona, α -lap) é uma naftoquinona de ocorrência natural em pequenas quantidades nas árvores da espécie *Tabebuia* (família Bignoniaceae), presente na maior parte da América do Sul e Central. Essas árvores são comumente chamadas de ipê ou pau d'arco no Brasil e "*lapacho*" na Argentina e em outros países de língua espanhola [Bernardes (2001)]. α -lap além de ser obtida como produto natural, pode também ser sintetizada a partir da isomerização de lapachol (2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona), uma quinona, que é mais abundante e facilmente extraída da mesma fonte, sendo que em condições apropriadas pode obter outro isômero – a β -lapachona – conforme é representado no esquema 6 [Bernardes (2012)].



Esquema 6

Os extratos de várias espécies de *Tabebuia* têm uma extensa história de utilização na medicina popular; além disso, as atividades farmacológicas (antimicrobiana, antiinflamatória e antiparasítica) destes extratos, das substâncias neles contidas e dos derivados químicos destas substâncias, também vem sendo largamente estudadas cientificamente há muito tempo [Silva *et al.* (2003) e Alves *et al.* (2004)].

Do ponto de vista químico, a atividade biológica apresentada pelas quinonas está diretamente ligada ao ciclo redox como consequência de sua estrutura química, e assim induzir o estresse oxidativo nas células [Ferraz *et al.* (2001)], através da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) tais como: ânions radicais superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (HO^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) [Almeida *et al.* (1990)].

A geração das ERO no ambiente celular é responsável pela condição descrita como estresse oxidativo, causando danos irreversíveis em algumas biomoléculas-chave, como DNA e proteínas [Salas *et al.* (2008)], podendo levar até mesmo à apoptose [Garnier *et al.* (1996)]. O ciclo redox descrito na Figura 1 foi proposto como um mecanismo biológico de atuação das quinonas [Salas *et al.* (2008), Pinto *et al.* (2000), de Moura *et al.* (2001) e da Silva *et al.* (2003)].

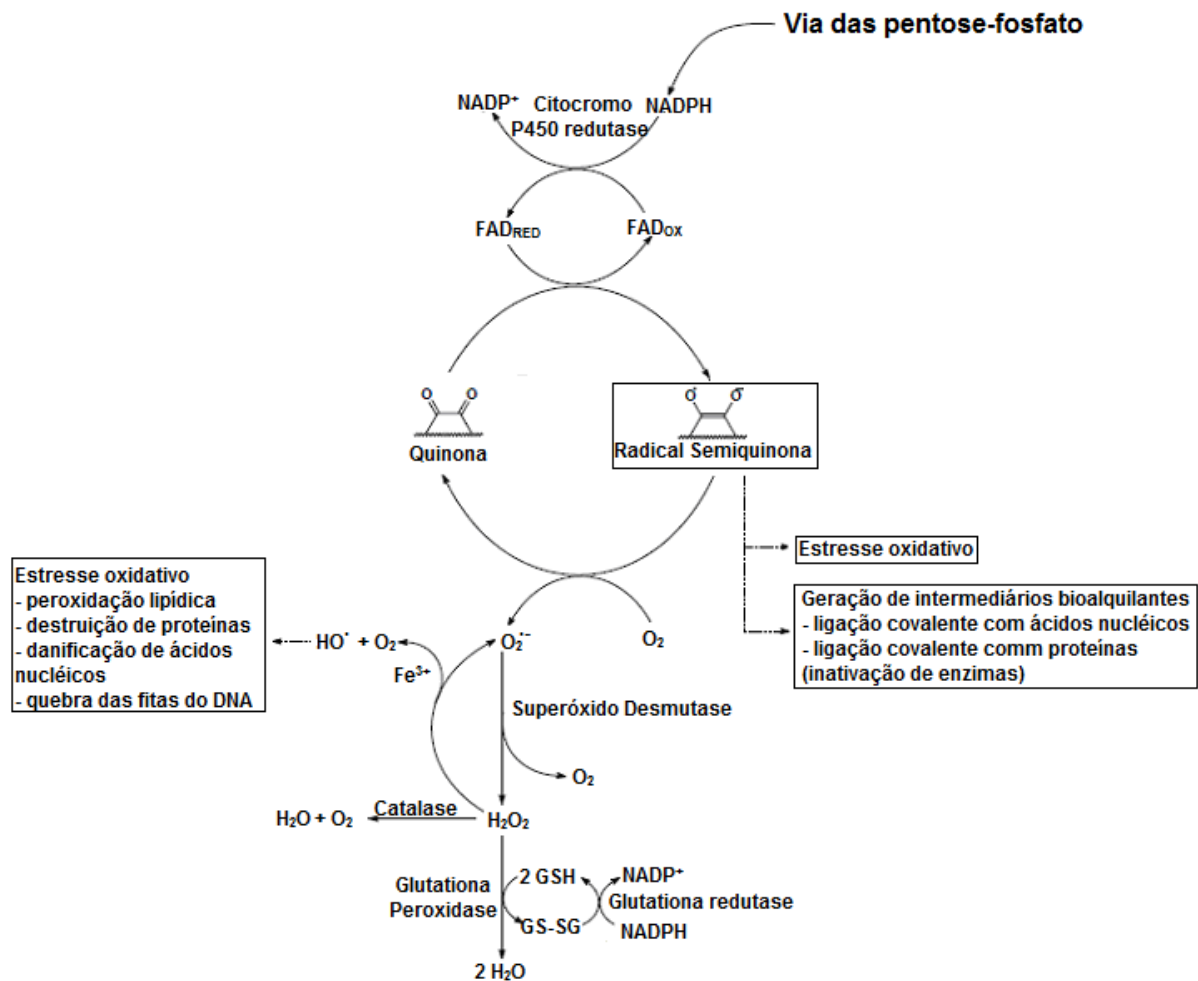
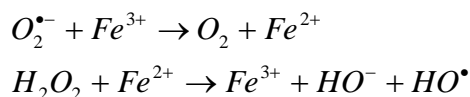


Figura 1 – Resumo esquemático do ciclo oxidativo das quinonas, representado pela α -lapachona.

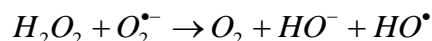
O mecanismo proposto envolve inicialmente um processo de redução do substrato quinônico (SQ) através da transferência de um elétron ($SQ^{\cdot-}$) ou de dois elétrons ($SQ^{\cdot-2}$) a partir da enzima NADPH citocromo P450 redutase (P450R). NADH citocromo b5 redutase (b5R) e NADH ubiquinona oxidoreductase [Wang *et al.* (2010), Yan *et al.* (2008), Holtz *et al.* (2003)]. Na etapa seguinte o radical semiquinona, formado pela redução de um elétron, pode sofrer oxidação, em condições aeróbicas, restaurando a quinona inicial, e gerando o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Esse ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em solução aquosa, e na presença de oxigênio molecular, desencadeia uma série de reações subsequentes gerando peróxido de hidrogênio, que na presença de ferro (Fe^{2+}) forma o radical hidroxila (HO^{\cdot}) através da reação de Fenton [Asche (2005) e Zani *et al.* (1997)]. Alternativamente a formação do radical hidroxila pode se dar por uma reação do peróxido de hidrogênio com ($O_2^{\cdot-}$), numa reação conhecida como de Haber-Weiss [Brumark *et al.* (1989)] (esquema 7) O radical hidroxila é a espécie reativa de oxigênio que causa os maiores danos celulares devido ao seu

elevado potencial de oxidação (2,8 eV), com a sua ação sendo direcionada tanto para as bases nitrogenadas do DNA quanto para as unidades de carboidratos, resultando na quebra da ligação N-glicosídica.

Reação de Fenton



Reação de Haber-Weiss



Esquema 7

A atividade biológica das quinonas, baseadas em seu potencial redox, depende estritamente da sua estrutura. Sendo assim, grupos substituintes aceptores de elétrons ligados diretamente ao sistema quinônico serão capazes de alterar a densidade eletrônica sobre o sistema conjugado da dicetona e terão efeitos significativos em sua eficiência como substratos geradores de EROs

Devido a esse processo, as quinonas têm forte citotoxicidade tanto sobre as células cancerígenas quanto sobre as normais, atuando também sobre as enzimas como as topoisomerasas, que são críticas para a replicação do DNA [Stagliano *et al.* (2006)].

Outra característica química importante para a atividade biológica das quinonas, está correlacionada com a sua habilidade em atuar como ácidos de Lewis (eletrófilo) e, dessa forma participar como substrato em reações nucleofílicas nos processos metabólicos e, como consequência, gerar derivados que podem apresentar uma maior toxicidade [El-Najjar *et al.* (2011)].

1.1.7 Fármacos antiparasitários – Benzonidazol (BZL), Metronidazol (MTZ) e Megazol (MZ)

Em 1909, o pesquisador Carlos Chagas, descobriu uma doença infecciosa que acometia operários do interior de Minas Gerais. Esta era causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, e por ele ter descoberto tal protozoário a doença ficou conhecida como doença de Chagas [Bernardes (2001)].

O mal de Chagas, como também é chamado, é transmitido, principalmente, por um inseto da subfamília *Triatominae*, conhecido popularmente como barbeiro. Este animal de hábito noturno se alimenta, exclusivamente, do sangue de animais vertebrados. Vive principalmente em frestas de casas de madeira, antigamente chamadas de pau a pique, camas, colchões, depósitos, ninhos de aves e troncos de árvores [Shikanai-Yasuda *et al.* 1990].

Conforme o ciclo do parasita da doença de Chagas (Figura 2), observa-se que o bicho barbeiro ao sugar o sangue de um animal com a doença, este inseto passa a carregar consigo o protozoário na forma epimastigota. Ao se alimentar novamente, desta vez do sangue de uma pessoa saudável, geralmente na região do rosto, ele tem o hábito de defecar na pele do indivíduo. Com o ato das pessoas coçarem a região onde foram picadas, facilita a penetração do parasita, presentes nas fezes, pela pele. Os parasitas passam a viver, inicialmente, no sangue, na forma tripomastigota (na forma de célula alongada com flagelo) e, depois, penetram nas células e assumem a forma amastigota (forma ovóide e sem flagelo), a qual se multiplica rapidamente. O grande número de amastigotas provocam o rompimento celular e os tripanossomídeos entram novamente na corrente sanguínea e reassumem a forma flagelada, podendo invadir fibras musculares, principalmente nas da região do coração, intestino e esôfago [Kropf *et al.*, 2000].

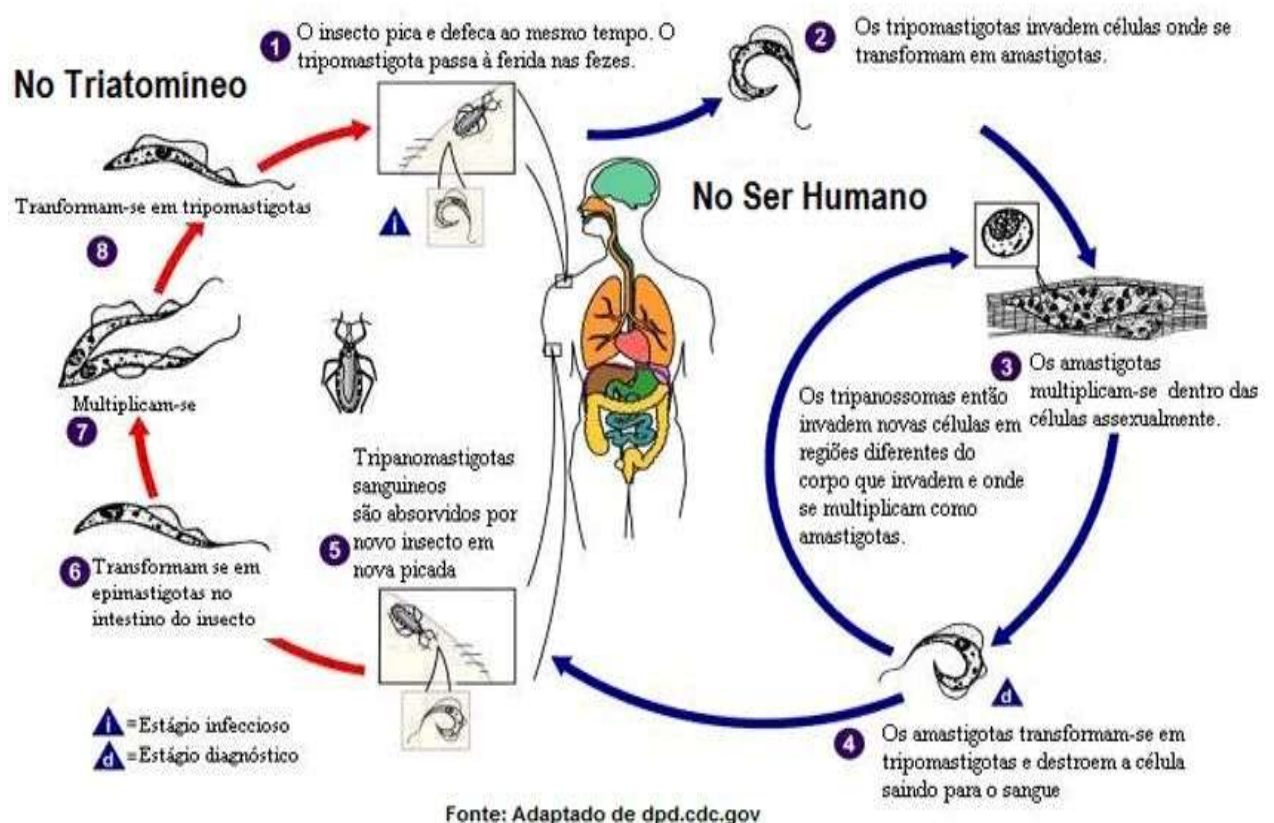


Figura 2. Ciclo do parasita da doenças de Chagas. Adaptado de *dpd.cdc.gov*, acessado em 03/07/2016.

A transfusão de sangue contaminado e transmissão de mãe para filho, durante a gravidez, são outras formas de se contrair a doença. Recentemente descobriu-se que pode ocorrer a infecção oral: são os casos de pessoas que adquiriram a doença ao ingerirem caldo

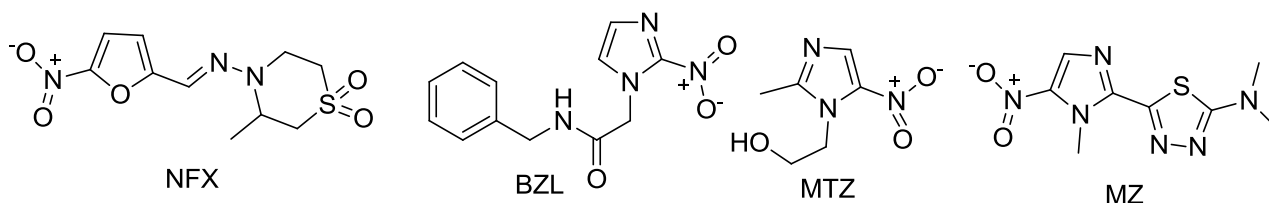
de cana ou açaí moído contendo, acidentalmente, o inseto. Acredita-se que houve, nesses casos, invasão ativa do parasita, via aparelho digestivo [Kropf *et al.* 2000].

Desde 1970 o nitroimidazol, Benzonidazol (BZL, esquema 8) tem sido indicado para tratamento de pacientes na fase aguda da doença (fase que surge após a infecção, que dura em média dois meses). O índice de cura é de aproximadamente 70%, entretanto não há evidências que o mesmo traga benefícios na fase crônica. Posteriormente outro nitroimidazol, Metronidazol (MTZ, esquema 8) começou a ser comercializado para tratamento das infecções provocadas por protozoários e bactérias anaeróbicas. O antigo fármaco Nifurtimox (MZ, esquema 8) também utilizado como antichagásico foi abolido de uso da América Latina, pelos seus efeitos colaterais [Shikanai-Yasuda *et al.*, 1990].

Os nitro heterociclos 4-[(5-nitrofurfurilideno) amino -3- metil tio morfolina-1,1-dióxido] (nifurtimox-NFX, *Lampit*, Bayer (não disponível no Brasil) , Esquema 8) e N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida (benzonidazol-BZL, Esquema 8) são utilizados no tratamento da doença de Chagas. BZL, um derivado de nitroimidazol, é melhor tolerado quando comparado com NFX, um derivado de 5-nitrofurano, e geralmente considerado o medicamento de escolha (o índice de cura é de aproximadamente 70% na fase aguda) [Messenger *et al.* (2015)]. No entanto, outros derivados de nitroimidazol apresentam actividade contra a doença de Chagas. Assim, 1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol (metronidazol-MTZ, Esquema 8) foi avaliado em fase aguda e crônica da doença no Panamá, envolvendo 1307 pacientes, com idade compreendida entre 6 meses e 73 anos. A droga foi bem tolerada por todos os pacientes em ambas as fases da doença, e as reações sorológicas foram negativas em todos os pacientes (100%) sem cardiomiopatia [Bern (2015)] Um derivado de iodeto de MTZ foi sintetizado recentemente e, em seguida, complexado com ciclodextrina, com o objetivo de desenvolver um método mais seguro e mais eficaz para o tratamento de infecções por *Trypanosoma cruzi*. O análogo de iodeto de MTZ e o seu complexo de ciclodextrina foram 10 vezes mais ativo do que o MTZ, demonstrando que a presença de um átomo de iodo na cadeia lateral aumenta a atividade antiparasitária, mantendo a sua citotoxicidade [Lopes *et al.* (2011)]. Os tratamentos para doença de Chagas são ainda muito insatisfatórios devido ao desenvolvimento de resistência do *Trypanosoma cruzi*, bem como efeitos secundários graves dos medicamentos.

Assim, como parte dos esforços para desenvolver novos compostos que visam o tratamento de infecções parasitárias, um novo derivado de nitroimidazol 5-(1-metil-5-nitro-1*H*-2-imidazolil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina (megazol-MZ, esquema 8) foi proposto como uma potencial alternativa frente aos fármacos comerciais, mesmo apresentando alta toxicidade [Poli *et al.* (2002)] Subsequentemente, várias modificações estruturais foram introduzidos no

MZ, incluindo substituições dos dois anéis do núcleo de base, substituição do grupo tiazólico por oxadiazólico, substituição da parte nitroimidazólica por nitrofurano ou nitrotiofeno, e substituições no átomo de nitrogênio exocíclico; no entanto o megalzol ainda é biologicamente mais ativo do que o seus derivados [Chauvière *et al.* (2003) e Carvalho *et al.* (2016)].



Esquema 8

A doença de Chagas, por ser considerada uma doença negligenciada, não é muito bem explorada pelas indústrias farmacêuticas e por isso o maior investimento para descoberta de novas moléculas antichagásicas é feito principalmente por órgãos governamentais de países que são acometidos por tal doença. Por isso, o estudo de novas moléculas para combater essa doença, assim como o estudo de farmacocinética (estudo de carregamento de moléculas até o local de ação) e farmacodinâmica (estudo da ação da molécula no local) de possíveis antichagásicos é de extrema relevância como pesquisa em universidades e órgãos públicos brasileiros.

1.2 Aminoácidos e Proteínas

As proteínas são biopolímeros constituídos por unidades monoméricas ligadas – por ligações do tipo amida, ditas ligações peptídicas -, que contém, cada uma dessas unidades, um grupamento ácido carboxílico e uma amina ligada ao carbono adjacente à carboxila: são os α -aminoácidos (ou aminoácidos, simplesmente). Na natureza existem 20 aminoácidos proteicos (Tabela 1) com estruturas distintas, variando em tamanho, forma, carga, capacidade de formação de ligações de hidrogênio, características hidrofóbicas e reatividade química, cuja classificação leva em conta principalmente a polaridade das suas cadeias e a presença ou ausência de cargas [Berg *et al.* (2008)].

Tabela 1 – Valor de constante de dissociação (pK), ponto isoeletrônico (pI) e classificação da polaridade (Apolar ou Polar) dos aminoácidos normalmente encontrados em proteínas. Adaptado de Lehninger *et al.* (2002).

Nomes Abreviados			pK ₁	pK ₂	pK _R	
Aminoácido	Comum	Letra	α -COOH	α -NH ₃	Grupo R	pI
Grupo R alifáticos, apolares						
Alanina	Ala	A	2,34	9,69	-	6,02
Glicina	Gly	G	2,34	9,60	-	5,97
Prolina	Pro	P	1,99	10,60	-	6,30
Valina	Val	V	2,32	9,62	-	5,97
Isoleucina	Ile	I	2,36	9,68	-	6,02
Metionina	Met	M	2,28	9,21	-	5,75
Leucina	Leu	L	2,36	9,60	-	5,98
Grupo R aromáticos						
Fenilalanina	Phe	F	1,83	9,13	-	5,48
Tirosina	Tyr	Y	2,20	9,11	10,07 (fenol)	5,66
Triptofano	Trp	W	2,38	9,39	-	5,66
Grupos R não carregados, mas polares						
Serina	Ser	S	2,21	9,15	-	5,68
Treonina	Thr	T	2,63	10,43	-	6,53
Cisteína	Cys	C	1,96	10,28	8,18 (sulfidril)	5,07
Asparagina	Asn	N	2,02	8,80	-	5,41
Glutamina	Gln	Q	2,17	9,13	-	5,65
Grupos R carregados positivamente						
Lisina	Lys	K	2,18	8,95	10,53 (ϵ -amino)	9,74
Histidina	His	H	1,82	9,17	6,0 (imidazol)	7,59
Arginina	Arg	R	2,17	9,04	12,48 (guanidino)	10,76
Grupos R carregados negativamente						
Glutamato	Glu	E	2,19	9,67	4,25 (carboxil)	3,22
Aspartato	Asp	D	2,09	9,82	3,86 (carboxil)	2,97

Em uma proteína as subunidades monoméricas relativamente simples constituídas com o mesmo conjunto de 20 aminoácidos, ligados covalentemente em diferentes combinações e sequências lineares, fornecem a chave para a estrutura de milhares de proteínas diferentes. Assim, cada uma das sequências de aminoácidos que formam as proteínas pode dar origem a diversos produtos com funções variadas, como: proteínas transportadoras, hormônios, fibras musculares, revestimento da pele, proteínas do cristalino ocular, anticorpos, matriz óssea, enzimas, antibióticos, venenos de cobras, proteínas de reserva de sementes, casco de

tartarugas, penas de aves, além de outras substâncias com distintas atividades biológicas. [www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/298.pdf acessado em 05/06/2016]

A estrutura molecular das proteínas é muito complexa; por essa razão é tipicamente dividida em níveis distintos de organização: a sequência de aminoácidos numa proteína (unidos por ligações peptídicas) é chamada de estrutura primária; a estrutura secundária corresponde a certos arranjos tridimensionais comuns de fragmentos da cadeia principal, mantidos por ligações de hidrogênio (folha β pregueada, hélice α , etc.); a estrutura terciária é o arranjo tridimensional de uma cadeia polipeptídica (e, conseqüentemente, dos elementos de estrutura secundária) determinado por interações entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, incluindo ligações de hidrogênio e de dissulfeto, além de forças de atração ou repulsão eletrostática e de forças de van der Waals. A estrutura quaternária aplica-se somente a proteínas constituídas por duas ou mais cadeias polipeptídicas que podem estabelecer entre elas ligações de hidrogênio, atrações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e/ou ligações de dissulfeto entre cisteínas de cadeias diferentes. Esse tipo de estrutura refere-se à disposição espacial dessas cadeias, ou seja ao arranjo espacial das subunidades (Figura 3). Um exemplo deste tipo de estrutura quaternária é a da hemoglobina, que é composta por quatro subunidades [Voet *et al.* (2008)].

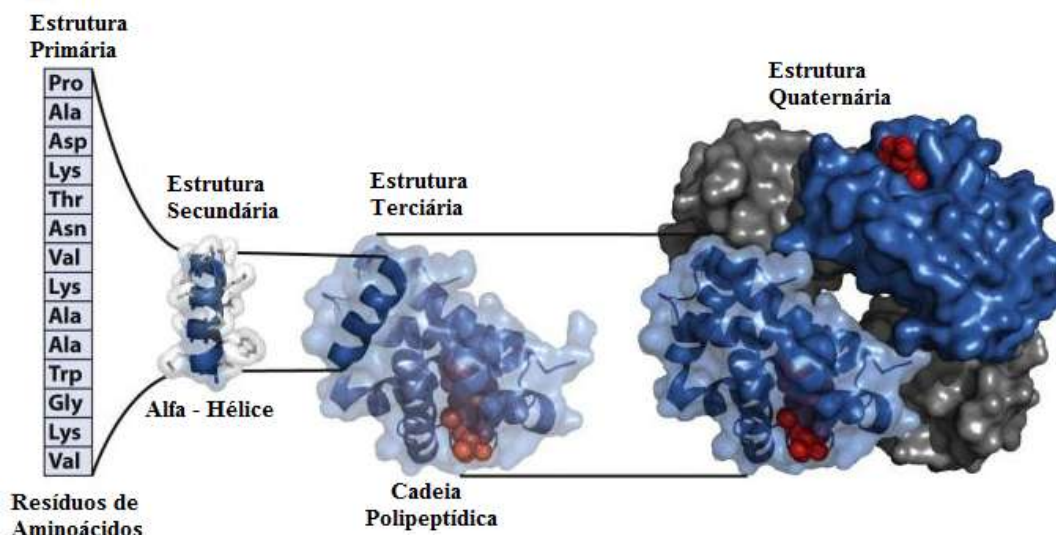


Figura 3 - Representação dos diversos níveis organizacionais de uma proteína. Adaptado de Berg *et al.*, 2008.

A atividade proteica é dependente da topologia da proteína e essa topologia está relacionada com os níveis de organização da proteína [Lehninger *et al.* (2002)]: como exemplo, a polaridade e a carga dos resíduos de aminoácidos que formam a estrutura primária interferem na estrutura terciária. Se a sequência de aminoácidos for constituída

majoritariamente por resíduos de caráter lipofílico, tais como valina (Val), isoleucina (Ile), leucina (Leu), metionina (Met) e fenilalanina (Phe), a cadeia tende a compactar-se, devido ao efeito hidrofóbico, expulsando as moléculas de água do interior da proteína, onde elas teriam mobilidade restrita. Dessa maneira aumenta a entropia (ΔS) do sistema, contribuindo para uma energia livre de Gibbs (ΔG) negativa – espontaneidade – para o processo de enovelamento. Se a sequência de aminoácidos for constituída majoritariamente por resíduos de caráter polar, a estrutura da proteína tende, ao contrário, a destender-se. Dessa forma os resíduos polares terão maior contato com as moléculas de água (solvente), formando ligações de hidrogênio com estas ($\Delta H < 0$), o que também dá uma contribuição negativa a ΔG [Kuriyan *et al.* (2012)].

Geralmente os resíduos de aminoácidos com carga, como exemplo lisina (Lys), glutamato (Glu) e histidina (His), encontram-se no exterior da proteína (na parte polar); caso haja resíduos com a mesma carga, um próximo ao outro, ocorre repulsão eletrostática e, caso haja resíduos com cargas opostas próximos, há atração eletrostática. Isso influencia no enovelamento da proteína. Lembrando-se que pode haver resíduos carregados no interior da proteína (região apolar), desde que haja resíduos de cargas opostas para formar interação íon-íon, que é muito forte em meios apolares (baixa constante dielétrica) [Kuriyan *et al.* (2012)].

Devido à sua grande estrutura química (elevado peso molecular), a maioria das proteínas formam soluções coloidais. Nos animais superiores as proteínas constituem cerca de 50% do peso seco dos tecidos e são classificadas em duas categorias [Stryer (1995) e Lehninger *et al.* (2002)]:

Proteínas Globulares: tem forma esférica ou elipsóide, solúveis em meio aquoso, podem ter um ou mais domínios estruturais, possuem um núcleo (em inglês, *core*) hidrofóbico rodeado externamente por resíduos hidrofílicos em contato com o solvente. São proteínas de grande atividade funcional, como exemplo, enzimas, anticorpos e hormônios [Campos (2008)].

Proteínas Fibrosas: são proteínas em que as cadeias de aminoácidos se ordenam de maneira paralela, formando fibras ou lâminas estendidas, em geral são pouco solúveis em água e possuem estruturas alongadas, repetitivas. Geralmente são empregadas como materiais estruturais nos organismos vivos, tendo como principais funções as de proteção, conectividade e sustentação, como exemplo as fibras do tecido conjuntivo [Voet *et al.* (2008)].

1.2.1 Albumina Sérica Bovina e Albumina Sérica Humana

As albuminas pertencem a uma classe de proteínas globulares que apresentam um alto valor biológico, estando presente na clara do ovo, no leite e no sangue. No sangue é a principal proteína, que se encontra em grande abundância no plasma, e é sintetizada no fígado. A concentração normal de albumina no sangue animal varia entre 3,5 a 5,0 gramas por decilitro, correspondendo a cerca de 50% das proteínas plasmáticas e, por isso, é uma das proteínas mais estudadas [Ribeiro (2010)]. Muitos pesquisadores têm estudado a estrutura e as propriedades das albuminas séricas e suas interações com outras proteínas e ligantes com o intuito de compreender as suas funções no organismo [Majorek *et al.* (2012)].

Albuminas séricas constituintes do sistema circulatório têm diversas funções fisiológicas, incluindo a manutenção da pressão osmótica [Cui *et al.* (2008)], o transporte, distribuição e metabolismo - facilita a disponibilidade de substratos para as rotas metabólicas - de diversos ligantes endógenos e exógenos (por exemplo, fármacos, metabólitos, ácidos graxos, aminoácidos, hormônios, esteróides, cátions e ânions de metais, como cálcio, cobre, zinco, níquel, mercúrio, prata e ouro), resultando no aumento de solubilidade desses compostos no plasma, o que pode diminuir sua toxicidade, e/ou protegê-los contra a oxidação ou outro tipo de reação [Peters *et al.* (1985), Yue *et al.* (2008a), Shaw *et al.* (2008) e Curry (2011)].

A ligação entre fármacos e albumina sérica é um fator determinante e importante para a compreensão da interação do organismo com a droga (estudo farmacocinético), já que influencia a distribuição, excreção, metabolismo e interação com o alvo biológico [Li *et al.* (2009)].

Em experiências laboratoriais, a Albumina Sérica Humana (ASH ou, em inglês *Human Serum Albumin* – HSA) é geralmente substituída pela Albumina Sérica Bovina (ASB ou em inglês BSA - *Bovine Serum Albumin*) devido à sua maior disponibilidade e menor custo comercial. Como a ASH partilha de 76% de identidade e 88% de similaridade de sequência com a ASB, os resultados obtidos com a albumina bovina são, geralmente, muito semelhantes aos que seriam obtidos com a humana [Curry (2011)]. As estruturas da ASB e ASH consistem em três domínios estruturalmente semelhantes (I, II, e III), cada um contendo dois subdomínios, um A e outro B [Paul *et al.* (2010)]. Nesses subdomínios há uma cavidade de ligação principal com ligantes; portanto, no total, essas albuminas possuem cerca de 6 cavidades principais para interação [Tian *et al.* (2007)].

A ASH é um polipeptídeo não-glicosilado com 585 resíduos de aminoácidos, contendo 17 ligações de dissulfeto (que ajudam a manter a estrutura terciária), uma cisteína livre, um resíduo de triptofano (Trp-214) localizado no subdomínio IIA e aproximadamente 67% de estrutura na forma de hélice- α [Bhattacharya *et al* (2000), Cui *et al.*, (2008), Stan *et al.* (2009) e Takehara *et al.* (2009)]. Na ASH, os domínios I, II e III contêm os resíduos de aminoácidos 1-195, 196-383, 384-585, respectivamente [Bujacz (2012)]. Em contrapartida, ASB é um polipeptídeo não-glicosilado com 583 resíduos de aminoácidos, contendo 17 ligações de dissulfeto, uma cisteína livre, dois resíduos de triptofano (Trp-134 e Trp-212), sendo o primeiro e o segundo localizados no subdomínio IB e IIA, respectivamente e 68% de estrutura na forma de hélice- α [Satheshkumar *et al.* (2014)]. Na ASB, os domínios I, II e III contêm os resíduos de aminoácidos 1-179, 180-384, 385-583, respectivamente [Bujacz (2012)] (Figura 4).

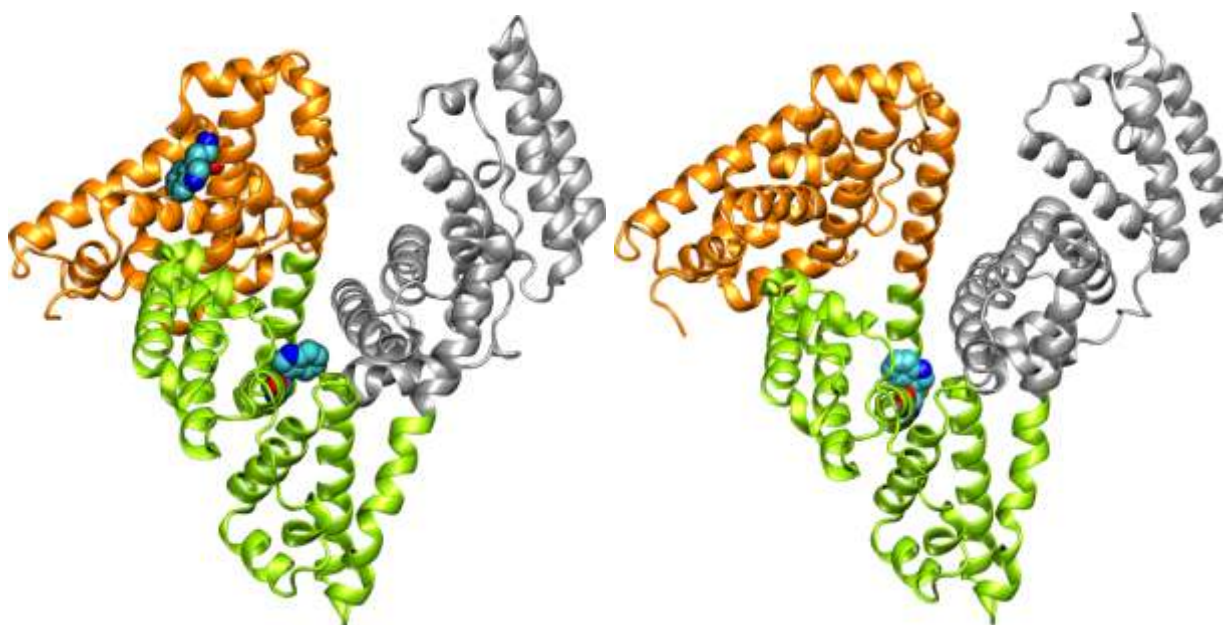


Figura 4 - Da esquerda para direita, estrutura cristalográfica da ASB (*pdb*: 3V03) e ASH (*pdb*: 1N5U) com a distinção de seus domínios I (**castanho**), II (**verde**) e III (**cinza**), respectivamente. Na ASB o triptofano Trp-134 está localizado no domínio I (**castanho**) e o Trp-212 no domínio II (**verde**), já na ASH o Trp-214 está localizado no domínio II (**verde**).

Na técnica de espectroscopia de fluorescência o resíduo de aminoácido triptofano (Trp) é frequentemente usado para o estudo de ligação dessas albuminas com moléculas endógenas e exógenas. Na ASB, para distinguir em qual das duas cavidades portadoras de triptofano ocorre a interação preferencial com os ligantes, pode-se realizar um estudo de

competição, utilizando algum ligante cuja cavidade de ligação preferencial seja a IIA, como exemplo os fármacos comerciais varfarina, fenilbutazona e cetoprofeno, ou a IB, como exemplo o fármaco comercial ibuprofeno [Guo *et al.* (2010), Wang *et al.* (2010), Li *et al.* (2015) e Jattinagoudar *et al.* (2016)].

1.3 Estudo da Interação entre Albuminas Séricas e Compostos Bioativos

Dentre as técnicas mais convencionais empregadas para detectar a interação entre um composto bioativo e a albumina sérica (ASB e ASH) estão: espectroscopia de fluorescência no estado estacionário, espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo, espectroscopia de absorção molecular no UV-Visível, espectroscopia de dicroísmo circular (DC), espectroscopia Raman, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e métodos teóricos *via* modelagem molecular e cálculos semi-empíricos [Guo *et al.* (2010), Hu *et al.* (2010), Xia *et al.* (2010), Chinnathambi *et al.* (2014), Chaves *et al.* (2015) e Chaves *et al.* (2016)].

A espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis é empregada para verificar se há associação entre albumina com moléculas biologicamente ativas através da evidencia de deslocamentos no máximo de absorção dos resíduos de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e principalmente triptofano) em 280 nm [Lakowicz (2006)].

A espectroscopia de fluorescência no estado estacionário é um dos métodos mais empregados para se estudar as interações moleculares envolvendo proteínas, isso porque é uma técnica altamente sensível, seletiva, rápida, simples e com fundamento teórico abundante. Medindo-se a variação de emissão de fluorescência intrínseca da albumina através da técnica de supressão de fluorescência, podemos medir a acessibilidade de supressores aos grupos fluoróforos. Esta informação, junto com algumas equações - Stern-Volmer, Stern-Volmer modificado, duplo logaritmo, raio de Förster, van't Hoff e energia livre de Gibbs - pode ajudar a prever o mecanismo e o tipo de interação dos compostos bioativos com a albumina sérica [Yue *et al.* (2008b), Zhang *et al.* (2009) e Tunç *et al.* (2014)].

A espectroscopia de dicroísmo circular é uma técnica muito empregada para estudos qualitativos e quantitativos de alterações conformacionais em macromoléculas, em especial para análise de perturbações estruturais na estrutura secundária de albuminas séricas com adição de moléculas biologicamente ativas [Stan *et al.* (2009)].

Os experimentos de fluorescência resolvida no tempo podem ser úteis na confirmação do principal mecanismo envolvido no processo de supressão de fluorescência, pois um

mecanismo estático não apresentará nenhuma mudança significativa no tempo de vida do fluoróforo após adição de diferentes concentrações de supressor. Por outro lado um mecanismo dinâmico que tem como característica fundamental uma constante de velocidade de supressão dependente da viscosidade do meio, o tempo de vida do fluoróforo sofrerá alterações significativas com o aumento da concentração do supressor [Cheng *et al.* (2009)].

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear também é utilizada para investigar interações entre pequenas moléculas com macromoléculas. [Figueiredo *et al.* (2007) e Chaves *et al.* (2016)]. Entretanto esta técnica não foi empregada nos trabalhos relatados nesta dissertação.

Métodos teóricos por ancoramento molecular (do inglês *molecular docking*) é altamente empregado para sugerir a principal cavidade de interação das albuminas séricas frente aos compostos biologicamente ativos. Além disso, serve para identificar os principais resíduos de aminoácidos e os tipos de interações intermoleculares envolvidos na interação ligante-proteína, de forma a complementar os resultados espectroscópicos. Já os cálculos semi-empíricos são mais refinados e por isso são utilizados para obter valores de variação de entalpia (ΔH) da associação ligante-proteína, dessa forma pode-se comparar com o valor de entalpia experimental e por através de análise termodinâmica sugerir qual a principal cavidade de interação dos ligantes na proteína [Chaves *et al.* (2016) e Rajendiran *et al.* (2016)]

1.4 Absorção de Luz no Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A absorção de luz é descrita pela absorbância (A) e é definida pela Equação 1 [Lakowicz 2006].

$$A = \log(I_0/I) \quad (1)$$

Onde:

A - absorbância;

I₀ - intensidade da luz incidente;

I - intensidade após a luz percorrer uma distancia l no meio.

A lei de Lambert-Beer (Equação 2) relaciona a absorbância e a concentração do soluto através do coeficiente de extinção molar, ou coeficiente de absorção molar, ou absortividade molar (ϵ).

$$A = \epsilon.c.l \quad (2)$$

Onde:

- A - absorvância;
- c - concentração da espécie que absorve a luz (em mol/L);
- l - distância que a luz percorre no meio (em cm) e
- ϵ - coeficiente de extinção molar (em L/cm.mol).

Efeitos de deslocamento na banda de absorção máxima da ASH, próximo à região de $\lambda_{\max} = 280$, referente a transição $\pi\pi^*$, que está diretamente associada ao resíduo cromofórico do triptofano, podem indicar a formação de um complexo de associação (interação ligante) entre os compostos bioativos e proteína. Um deslocamento para menores comprimentos de onda, quando sob complexação, quando comparado com o espectro de absorção da proteína livre, indicam um ambiente químico mais hidrofóbico, enquanto que o oposto, um deslocamento batocrômico, está diretamente associado a um ambiente químico mais hidrofílico próximo ao resíduo de triptofano.

1.5 Absorção de Luz Circularmente Polarizada (Dicroísmo circular - DC) - Cálculo da Porcentagem de Estrutura de Hélice α .

O dicroísmo circular (DC) é uma técnica sensível. O DC é uma forma de espectroscopia que faz uso da absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário (direita) ou no sentido anti-horário (esquerda), que possibilita monitorar mudanças conformacionais em proteínas, [Yue *et al.* (2008a)] sendo geralmente usado para a determinação da estrutura secundária de macromoléculas [Kelly *et al.* (2005) e Cheng *et al.* (2009)]. O DC é a diferença de absorção (A) da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita: $DC = A_E - A_D$ (Equação 3).

$$DC = A_E - A_D. \quad (3)$$

Onde:

- DC - dicroísmo circular;
- A_E - absorvância para a luz circularmente polarizada para a esquerda e
- A_D - absorvância para a luz circularmente polarizada para a direita.

O dicroísmo circular molar ($\Delta\epsilon$), (Equação 4), é definido como a diferença entre os coeficientes de extinção a esquerda e a direita [Fasman (1996), Woody (1995) e Hecht (1998)].

$$\Delta\epsilon = \epsilon_E - \epsilon_D = (A_E - A_D)/c.l \quad (4)$$

Onde:

$\Delta\varepsilon$ - dicroísmo circular molar (em L/mol.cm);

ε_E - coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a esquerda (em L/mol.cm)

ε_D - coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a direita (em L/mol.cm).

Todos os instrumentos comerciais de DC (Figura 6), medem a variação de absorbância (ΔA) ($\Delta A = A_E - A_D = (\varepsilon_E - \varepsilon_D).c.l$). Por razões históricas, entretanto, os aparelhos de DC são calibrados para elipticidade (θ) (Equação 5). [Woody (1995) e Fasman (1996)] e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf].

$$\theta(\text{em deg}) = 180.\ln 10.\Delta A/4\pi = 32,98\Delta A \quad (5)$$

Onde:

θ - elipticidade (em deg (graus));

ΔA - variação de absorbância.

Para eliminar os efeitos do caminho ótico e da concentração, a elipticidade (θ) é expressa na forma de elipticidade molar (θ_m), (Equação 6) [Woody (1995). Fasman (1996) e Hecht (1998)], que também é representada por MRE (elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual).

$$\theta_m = 1000/c.l = 3298\Delta\varepsilon \quad (6)$$

Onde:

θ_m - elipticidade molar (em deg.cm².dmol⁻¹);

θ - elipticidade (em deg (graus));

c - concentração da espécie que absorve a luz;

l - distância que a luz percorre no meio (em cm) e

$\Delta\varepsilon$ - dicroísmo circular molar (em L/cm.mol).

1.5.1 Cálculos da Porcentagem de Estrutura Hélice- α .

Estimativas acerca do % de hélice- α para a estrutura secundária de ASH na ausência e na presença de supressor podem ser estimadas usando as Equações 7 e 8 [Stan *et al.* (2009)].

$$MRE = \frac{\theta}{(10.n.l.C_p)} \quad (7)$$

Onde:

MRE = elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual (deg.cm²/dmol);

θ = elipticidade observada (mdeg);

n = número de amino ácidos residuais ou resíduos de amino ácido (582 para ASH);
 l = comprimento ótico da cubeta (1 cm);
 C_p = concentração molar de ASH ($1,00 \times 10^{-6}$ mol/L).

$$\% \text{ hélice } - \alpha = \left[\frac{(-MRE_{208} - 4000)}{(33000 - 4000)} \right] \times 100 \qquad \% \text{ hélice } - \alpha = \left[\frac{(-MRE_{222} - 2340)}{30300} \right] \times 100 \quad (8)$$

Onde:

MRE_{208} - elipticidade residual significativa em 208 nm (deg.cm²/dmol);

MRE_{222} - elipticidade residual significativa em 222 nm (deg.cm²/dmol);

% hélice- α - percentual de α -hélice na estrutura da ASH

1.6 Estudos de Fluorescência de Proteínas

Nas aplicações bioquímicas de fluorescência sempre se utiliza a fluorescência intrínseca. Em proteínas, os três aminoácidos aromáticos, fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) são os responsáveis pelo processo de emissão. O triptofano, que é o fluoróforo com o maior rendimento quântico de fluorescência, está presente em aproximadamente 1 mol % na proteína. As proteínas possuem normalmente um número reduzido de Trp em sua estrutura, o que facilita a interpretações dos dados espectrais.

Do ponto de vista espectroscópico a grande vantagem da utilização do triptofano na interpretação estrutural das proteínas reside no fato de que sua emissão é sensível ao ambiente químico em que se encontra. Sendo assim, mudanças no espectro de emissão de fluorescência a partir do Trp estão associadas a alterações conformacionais da estrutura secundária das proteínas. [Lakowicz (2006)].

Os espectros de absorção molecular e emissão de fluorescência da tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) e triptofano (Trp) estão mostrados na Figura 5. Na tabela 2 estão representados os coeficientes de absorvidade molar para a tirosina, fenilalanina e triptofano.

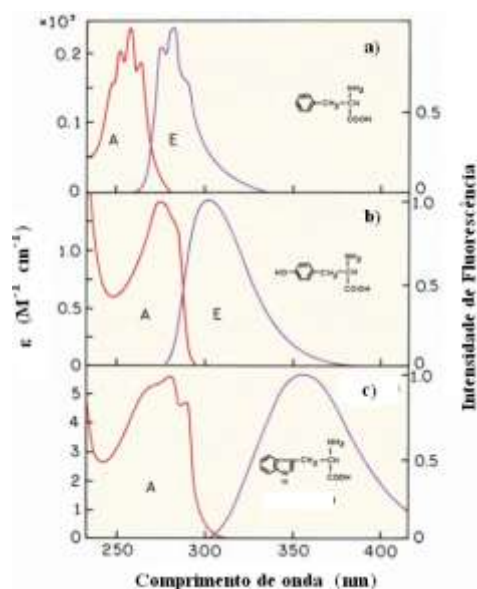


Figura 5 – Espectro de absorção e emissão de fluorescência para os aminoácidos a) fenilalanina, b) tirosina e c) triptofano [modificado de Lakowicz (2006)].

Tabela 2 – Coeficiente de absorvidade molar para Phe, Tyr e Trp em solução aquosa neutra a 296 K.

Aminoácido	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ε ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
Fenilalanina, Phe	257	282	200
Tirosina, Tyr	274	303	1400
Triptofano, Trp	280	340	5600

[Lakowicz (2006)]

1.6.1 Estudos de Supressão de Fluorescência

Nos processos de transferência de energia de uma molécula no estado excitado (singlete, no caso da supressão de fluorescência) para outra, o supressor, no estado fundamental (singlete), podem ser divididos em dois grupos. O primeiro, radiativo, consta do chamado mecanismo trivial [Turro (1978)], em que o fluoróforo emite um fóton que é capturado pelo supressor. Ele não nos interessa aqui.

No segundo grupo, constam os mecanismos de Dexter (ou mecanismo de troca eletrônica), em que os dois parceiros entram em contato direto, com interação de suas funções de onda e, através da troca eletrônica, afastam-se desse contato com a excitação eletrônica intercambiada: o fluoróforo original passa ao estado fundamental e o supressor passa ao estado excitado singlete. E o outro mecanismo, o de Förster, que pode ocorrer de distâncias consideráveis (da ordem de 10 Å ou mais), e que se baseia na interação entre dipolos: o dipolo

do fluoróforo excitado, sendo capaz de induzir a excitação do dipolo do supressor (perdendo, o primeiro, a energia de excitação).

A dependência de cada mecanismo com a distância entre doador de energia (ou de excitação, o fluoróforo), e o acceptor, o supressor (R_{DA}) é diferente:

para o mecanismo de Dexter: $k_{ET}(\text{troca}) = KJ \exp(-2R_{DA}/R_{DA}^0)$ (9)

para o mecanismo de Förster: $k_{ET}(\text{dipolo-dipolo}) = \alpha \frac{\kappa^2 k_D^0}{R_{DA}^6} J(\epsilon_A)$ (10)

(Onde k_{ET} é a constante cinética para a transferência de energia, para cada mecanismo.)

A Figura 6 compara essas dependências.

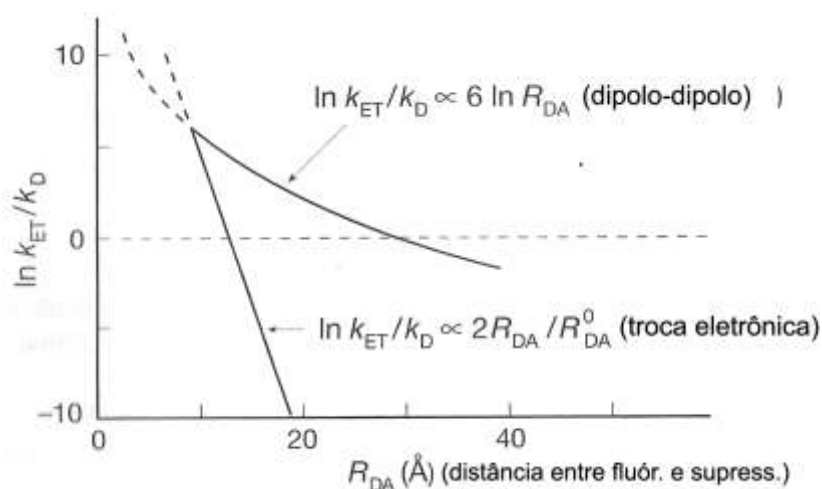


Figura 6 - Variação da eficiência da transferência de energia pelos mecanismos dipolo-dipolo (Förster) e de troca eletrônica (Dexter) com a separação entre doador e receptor de energia.

$J(\epsilon_A)$ no mecanismo de Förster é a integral espectral de sobreposição entre a fluorescência do doador e a absorção do receptor (Figura 7).

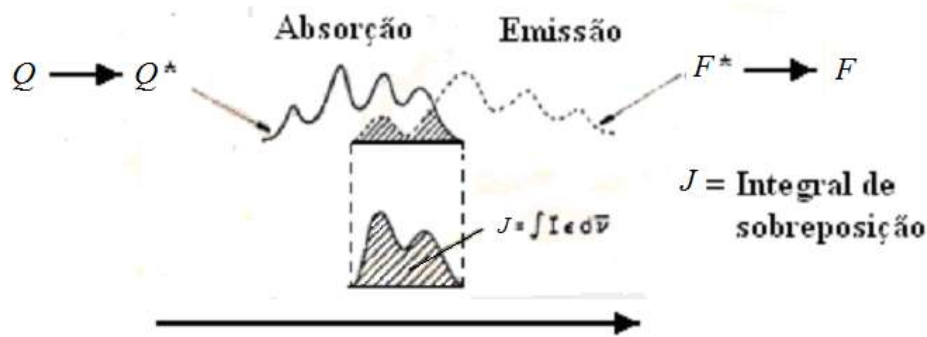


Figura 7 – Representação esquemática da integral de sobreposição para o processo de Transferência de energia ressonante (não-radiativa) de Förster [modificado de Turro (1978)].

Caso a supressão da fluorescência se dê por moléculas de supressor em livre difusão em meio fluido, a velocidade máxima do processo é limitada pela constante de difusão do

meio: diz-se que este é um processo de **supressão dinâmica**. Pode ocorrer também, que as moléculas do fluoróforo (doador), antes de serem excitadas pela radiação, se associem, por contato direto ou por associação à uma estrutura que contenha o fluoróforo, (como as proteínas de que tratamos aqui) com algumas moléculas do supressor: deixa de existir a possibilidade de fluorescência daquele – tudo ocorre como se a frequência de colisões com os supressores fosse muito maior que a permitida pela máxima velocidade de difusão; diz-se que está ocorrendo **supressão estática**.

2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo estudar a interação de albuminas séricas (ASB e ASH) com diferentes compostos sintéticos e produtos naturais biologicamente ativos através de técnicas espectroscópicas de absorção no UV/Vis, dicroísmo circular, fluorescência no estado estacionário e fluorescência resolvida no tempo, assim como através de métodos computacionais de ancoramento molecular. Como a ligação entre fármacos e albumina sérica é um fator determinante e importante para a compreensão da interação do organismo com a droga (estudo farmacocinético), por influenciar a distribuição, excreção, metabolismo e interação com o alvo biológico, tal estudo irá contribuir para melhor compreensão da biodistribuição de diferentes classes de moléculas no plasma sanguíneo e dessa forma fornecer dados para o desenvolvimento de estratégias que permitam a utilização terapêutica segura de cada composto estudado.

As substâncias estudadas e sua simbologia estão mostradas na Figura 8.

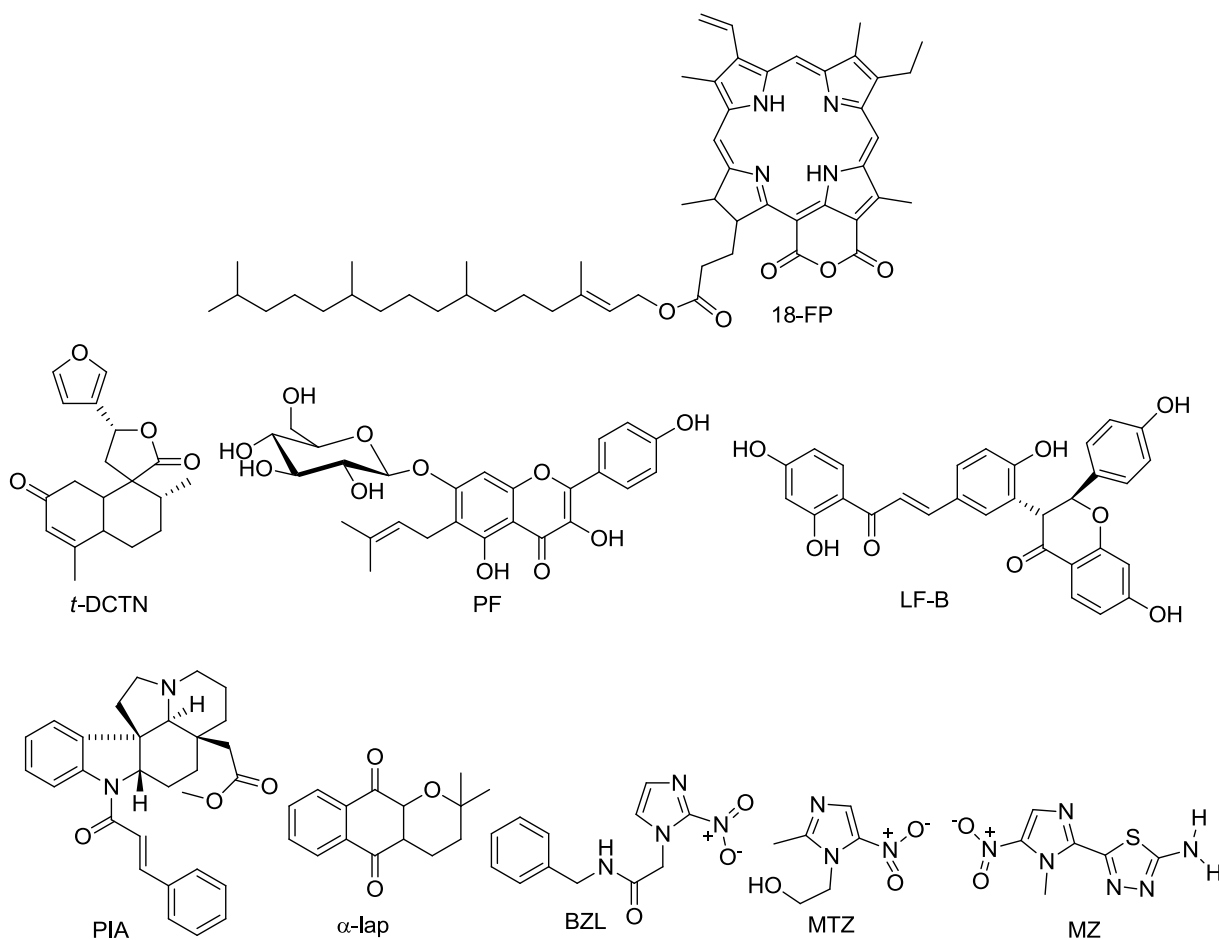


Figura 8 – Estruturas químicas e a simbologia usada na representação dos compostos estudados neste trabalho.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Aparelhos

Os espectros na região do ultravioleta (UV) e os espectros de fluorescência no estado estacionário foram realizados em um espectrofluorímetro Jasco modelo J-815 com cela de quartzo de 1 cm de passo ótico, equipada com sistema termostatizado Jasco PFD-425S15F, com precisão de 0,1°C.

Os espectros de dicroísmo circular foram feitos no espectropolarímetro Jasco modelo J-815, com cela de quartzo de 1 cm de passo ótico, equipada com sistema termostatizado Jasco PFD-425S15F, com precisão de 0,1°C.

Os experimentos de fluorescência resolvida no tempo foram realizados utilizando-se um espectrofluorímetro Edinburgh FLS-920, onde foi empregado, para excitação, um laser de diodo pulsado da Edinburgh Instruments ($\lambda_{exc} = 280 \pm 10$ nm; pulso de 850 ps; 1,8 μ W/pulso), com monitoramento da emissão a 345 nm.

3.1.2 Reagentes

A feofitina (18-FP) foi extraída e isolada das folhas da planta *triangulare* (Portulacaceae), caracterizada de acordo com a literatura [Amorim *et al.* (2014)] e cedida gentilmente pela Prof.^a Dr.^a Márcia Cristina Campos de Oliveira do DEQUIM-UFRRJ. A amostra *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN) foi extraída e isolada da planta *cajucara* Benth. (Euphorbiaceae), caracterizada de acordo com a literatura [Maciel *et al.* (2000)] e gentilmente fornecida pela Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida M. Maciel do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. O flavonóide prenilado glicosilado (PF; 7-O- β -D-glicopiranosil-6-(3-metilbut-2-enil)-3,5,4'-triidroxiflavona) foi extraído dos galhos da planta *hexasperma* (St.-Hil.), isolado e caracterizado de acordo com a literatura [Carvalho *et al.* (2008)] e gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Luciano Ramos Suzart do DEQUIM-UFRRJ. A amostra de lofirona B (LF-B) foi extraída e isolada das raízes da planta *nobilis* (Ochnaceae), caracterizada de acordo com a literatura [Tih *et al.* (1989) e Kaewamatawong *et al.* (2002)] e fornecida gentilmente pelo Prof. Dr. Mário G. de Carvalho do DEQUIM-UFRRJ. A amostra PIA (alcaloide plumerânico, N¹-cinamoil-12-metóxi-cilindrocarina) foi extraída e isolada da casca do caule da planta *cylindrocarpon*, caracterizada de acordo com a

literatura [Guimarães *et al.* (2013)] e fornecida gentilmente pelo Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho do DEQUIM-UFRRJ. A amostra α -lapachona (α -lap) foi sintetizada pela Dra. Andrea Rosane da Silva (ex-aluna do PPGQ-UFRRJ) a partir do lapachol, por tratamento com mistura ácida de HCl com ácido etanóico, a quente. A síntese, purificação e caracterização foi realizada de acordo com a literatura [Dewar *et al.* (1985)], sendo que a amostra já estava disponível no laboratório. Os fármacos antiparasitários benzonidazol (BZL), metronidazol (MTZ) (fármacos comerciais) e megazol (MZ – em fase de testes) foram fornecidos gentilmente pela Dra Solange L. Castro, do Instituto Oswaldo Cruz - Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil. Para todas as moléculas biologicamente ativas, foram feitos espectros de massa de alta resolução para confirmar a pureza de cada amostra.

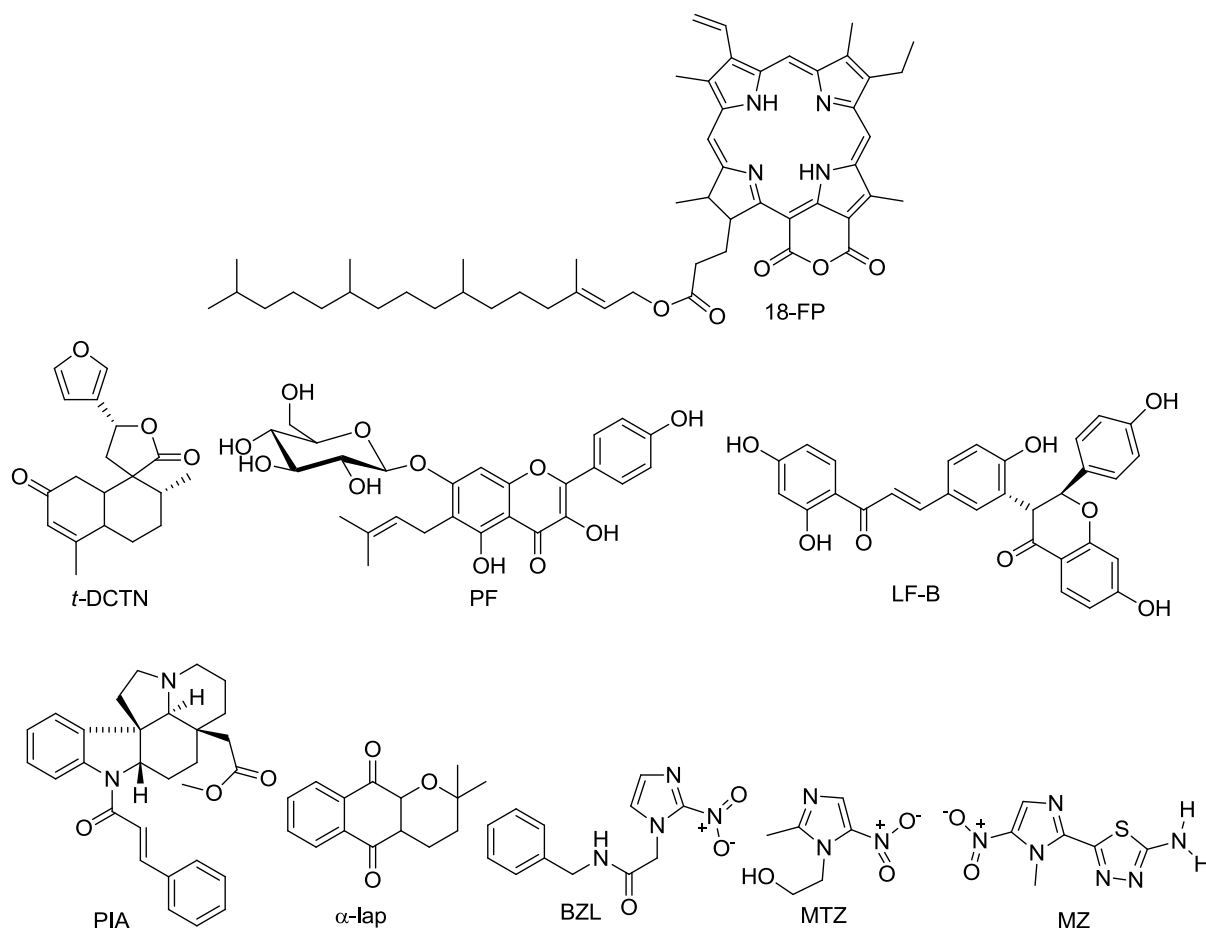


Figura 8 – Estruturas químicas e a simbologia usada na representação dos compostos estudados neste trabalho.

Etanol, grau espectrofotométrico, foi adquirido da Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias-RJ, Brasil.

Albumina Sérica Humana (ASH), Albumina Sérica Bovina (ASB), e tampão fosfato salina (do inglês *phosphate buffer solution* - PBS) são produtos comerciais comprados da empresa americana Sigma-Aldrich, São Luis, E.U.A.

Água, grau milli-Q, foi obtida através do aparelho DIRECT-Q, modelo MILLIPORE, que se encontra na sala 22 do DEQUIM-UFRRJ no LBBMA (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes).

3.2 Métodos

As amostras (18-FP, *t*-DCTN, PF, LF-B, PIA, α -lap, BZL, MTZ e MZ) foram analisadas pela técnica de espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário ($\lambda_{exc} = 280$ nm; T = 296 K, 303 K, 310 K e T = 288 K, 293 K, 298 K para α -lap). As amostras (*t*-DCTN, PF, LF-B, PIA, α -lap, BZL, MTZ e MZ) foram analisadas por espectroscopia de dicroísmo circular com temperatura de 310 K, contudo para α -lap empregou-se a temperatura de 298 K. A espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo foi executada apenas para a amostra PIA, à temperatura ambiente (T \approx 298 K). As amostras (18-FP, PF e PIA) foram analisadas por espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis à temperatura de 310 K para PF e PIA, e temperatura ambiente (T \approx 298 K) para 18-FP. Os estudos teóricos por ancoramento molecular foram executados para todas as amostras (18-FP, *t*-DCTN, PF, LF-B, PIA, α -lap, BZL, MTZ e MZ).

Tabela 3 – Experiências realizadas para cada amostra. Espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário (FES), espectroscopia de dicroísmo circular (DC), espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo (FRT), espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis (UV-Vis) e ancoramento molecular (AM).

Supressor	FES	DC	FRT	UV-Vis	AM	Albumina
18-FP	X	-	-	X	X	ASH
<i>t</i> -DCTN	X	X	-	-	X	ASB
LF-B	X	X	-	-	X	ASB
PF	X	X	-	X	X	ASB
PIA	X	X	X	X	X	ASB
α -lap	X	X	-	-	X	ASB
BZL	X	X	-	-	X	ASH
MTZ	X	X	-	-	X	ASH
MZ	X	X	-	-	X	ASH

3.2.1 Soluções

- Soluções estoque de concentração $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L das amostras 18-FP, *t*-DCTN, PF, LF-B, PIA, α -lap, BZL, MTZ e MZ em etanol;
- Solução de tampão fosfato salina (PBS). Uma pastilha de PBS dissolvido em 200 mL de água, grau milli-Q, contêm 0,01 mol/L de tampão fosfato, 0,0027 mol/L de KCl e 0,137 mol/L de NaCl e pH = 7,4 a 298 K;
- Soluções estoque de concentração $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L de ASH e ASB em solução tampão de PBS (pH = 7,4);
- Soluções $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L de ASH e ASB em solução tampão de PBS (pH = 7,4).

3.2.2 Estudos Espectroscópicos na Região do Ultravioleta/Visível (UV-Vis)

Foram registrados espectros de absorção na região do UV-Vis para 3 mL de solução de albumina sérica (ASB e ASH - $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L) em solução tampão de PBS (pH = 7,4) e para as amostras 18-FP (varredura 250-750 nm), PF (varredura 300-500 nm) e PIA (varredura 300-500 nm) em etanol, foram registrado espectros em concentração de $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

3.2.3 Estudos Espectroscópicos de Emissão de Fluorescência

Inicialmente registrou-se o espectro de emissão de fluorescência de uma alíquota de 3 mL de uma solução de albumina sérica (ASB e ASH) em PBS (pH = 7,4) com concentração de $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L ($\lambda_{exc} = 280$ nm) nas temperaturas de 296 K, 303 K e 310 K para 18-FP, *t*-DCTN, PF, LF-B, PIA, BZL, MTZ e MZ e 288 K, 293 K, 298 K para α -lap, de modo a obter a intensidade de fluorescência inicial (F_0), sendo, em seguida, realizadas sucessivas adições de alíquotas de cada amostra (18-FP, *t*-DCTN, PF, LF-B, PIA, α -lap, BZL, MTZ e MZ) a partir de sua respectiva solução estoque ($1,00 \times 10^{-3}$ mol/L em etanol), de modo a obter um valor de supressão inicial ($F_0 - F$) com aproximadamente 10% do valor inicial da fluorescência da albumina sérica (F_0). Como cada molécula tem uma capacidade diferente de suprimir a emissão de fluorescência da albumina sérica, foram empregadas diferentes concentrações de moléculas biologicamente ativas, até atingir os 10% de supressão inicial, citados acima. As concentrações de cada alíquota de cada supressor foram: 0,55; 1,10; 1,65; 2,19; 2,73; 3,27; 3,81; $4,34 \times 10^{-6}$ mol/L para 18-FP; 0,24; 0,47; 0,70; 0,83; 1,15; $1,37 \times 10^{-4}$ mol/L para *t*-DCTN; 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,74; $3,09 \times 10^{-5}$ molL⁻¹ para PF; 1,11; 2,21; 3,30; 4,39; 5,46; 6,54; 7,60; $8,66 \times 10^{-6}$ molL⁻¹ para LF-B; 0,28; 0,56; 0,84; 1,12; 1,40; 1,67; 1,95;

$2,22 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ para PIA; 0,42; 0,83; 1,24; 1,64; 2,05; 2,45; 2,85; $3,25 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ para α -lap e 0,56; 0,84; 1,12; 1,40; 1,67; 1,95; $2,22 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$.

3.2.4 Estudos Espectroscópicos de Dicroísmo Circular

As condições utilizadas para estas análises foram: varredura (faixa) de 200 nm a 260 nm, e controle de temperatura de 310 K para *t*-DCTN, PF, LF-B, PIA, BZL, MTZ e MZ e 298 K para α -lap. A linha de base foi medida com uma solução aquosa de tampão PBS (pH = 7,4). Para a realização das análises de dicroísmo circular, foi colocada em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico, uma alíquota de 3 mL de uma solução de albumina com uma concentração de $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ tamponada com PBS (pH = 7,4); foi registrado o espectro inicial e a elipticidade inicial. A essa solução foram adicionadas alíquotas de supressores a partir de suas respectivas soluções estoque ($1,00 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ em etanol) com as concentrações mínima, média e máxima utilizadas nos estudos de fluorescência: *t*-DCTN (0,24; 0,70 e $1,15 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$), PF (0,34; 1,37; 2,74 e $3,09 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$), LF-B (1,11; 4,39; 6,54 e $8,66 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$), PIA (utilizou-se apenas a concentração máxima, $2,22 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$), α -lap (0,35; 0,79; 1,57; e $3,10 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$), BZL, MTZ e MZ (utilizou-se apenas a concentração máxima, $2,22 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$).

3.2.5 Estudos Espectroscópicos de Fluorescência Resolvida no Tempo

Para o experimento de fluorescência resolvida no tempo, utilizou-se uma solução $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ de albumina sérica em PBS (pH 7,4) a temperatura ambiente ($T \approx 298 \text{ K}$) e adicionaram-se alíquotas de PIA de modo a obter concentrações finais de 0,28; 1,40; $2,22 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$.

3.2.6 Estudos Computacionais por Ancoramento Molecular

Para a realização dos estudos de ancoramento molecular (inglês: *molecular docking*), foi utilizada a estrutura da ASH e ASB, provenientes do Banco de Dados de Proteínas (inglês: *Protein Data Bank – PDB*) com o código de acesso 1N5U [Wardell et al. (2002)] e 4F5S [Bujacz (2012)], respectivamente. As proteínas escolhidas tem uma boa resolução: de 1,90 Å (ASH) e 2,47 Å (ASB). As moléculas de 18-FP, *t*-DCTN, PF, LF-B, PIA, α -lap, BZL, MTZ e MZ foram construídas com o método semiempírico AM1 [Dewar et al. (1985)] disponível no programa Spartan[®] 14 (*Wavefunction, Inc.*).

O ancoramento dessas estruturas na estrutura da albumina sérica foi realizado com o programa GOLD 5.2 (*CCDC Software Ltd.*), que utiliza um algoritmo genético para o ancoramento de ligantes flexíveis nos sítios de ligação da proteína. Átomos de hidrogênio foram adicionados à proteína de acordo com os estados tautoméricos e de ionização inferidos pelo programa [Jones *et al.* (1997)].

O raio de cálculo em cada cavidade proteica de estudo por ancoramento molecular foi de 10 Å e 15 Å a partir do fluoróforo Trp-214 para ASH e a partir dos fluoróforos Trp-134 e Trp-213 para ASB. Melhores resultados foram obtidos para o raio de 10 Å. Em cada corrida, o número de operações genéticas (cruzamento, migração e mutação) adotado foi de 100.000. Foi usado o procedimento de ancoramento semirrígido, já que corridas preliminares indicaram que algumas cadeias laterais deveriam estar flexíveis para um melhor ancoramento; a funcionalidade que confere flexibilidade às cadeias laterais de aminoácidos selecionados, disponível para a função de pontuação ‘*ChemPLP*’, [Korb *et al.* (2009)] foi usada com a biblioteca de rotâmeros disponível no programa [Lovell *et al.* (2000)]. A função de pontuação ‘*ChemPLP*’ é a função padrão do programa GOLD e a pontuação de cada “*pose*” identificada é calculada como o negativo da soma de uma série de termos de potencial envolvidos no processo de interação proteína-ligante, de modo que quanto mais positiva a pontuação, melhor é a interação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões acerca dos estudos de interação entre albuminas séricas com as moléculas biologicamente ativas (supressores) foram divididos em função de cada supressor estudado: **4.2.** Feofitina 18-FP, Figura 9; **4.3.** *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN), Figura 13; **4.4.** flavonóide glicosilado (PF; 7-*O*- β -*D*-glicopiranosil-6-(3-metilbut-2-enil)-3,5,4'-triidroxiflavona), Figura 18; **4.5.** Iofirona B (LF-B), Figura 24; **4.6.** alcalóide plumerânico N¹-cinamoil-12-metóxi-cilindrocarina (PIA), Figura 45; **4.7.** α -lapachona (α -lap), Figura 29; **4.8.** fármacos anti-chagásicos: benzonidazol (BZL), metronidazol (MTZ) e megazol (MZ), Figura 39.

4.1. Equações Empregadas na Análise dos Dados Experimentais

4.1.1 Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência fornece ferramentas poderosas para a monitoração da ligação de substâncias exógenas, como fármacos e fármacos potenciais, à albumina sérica, devido à sua sensibilidade, precisão, rapidez e facilidade de utilização com baixa concentração de amostra, sob condições fisiológicas [Lakowicz (2006)]. A fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano presentes na ASB (Trp-134 e Trp-212) e ASH (Trp-214) é sensível à presença de supressores. A supressão de fluorescência desses triptofanos pode revelar a acessibilidade do supressor frente a albumina e, desse modo, ajudar a compreender o mecanismo de ligação e a natureza da associação [Möller *et al.* (1997) e Nair (2015)]. Esta supressão é expressa como a diminuição do rendimento quântico de fluorescência do fluoróforo induzida por uma variedade de interações moleculares [Lakowicz (2006)].

Quanto ao mecanismo, a supressão de fluorescência pode ser induzida a uma certa distância entre o fluoróforo e o supressor, por interação dipolo-dipolo e não precisa necessariamente de contato, apesar de depender da distância entre eles (Mecanismo de Förster, ou dipolo-dipolo). [Obs.: usam-se os termos "Transferência de energia por fluorescência ressonante" ou "Transferência de energia do tipo Förster", e a abreviatura FRET, em inglês, *Fluorescence resonance energy transfer* ou *Förster's resonance energy transfer*; nestas expressões, também se usa "excitação" (inglês: *excitation*), em vez de "energia" (inglês: *energy*) [Newman *et al.* (1993)]]]. A supressão da fluorescência também

pode ocorrer por troca eletrônica entre fluoróforo e supressor (Mecanismo de Dexter ou por troca de elétrons) e, neste caso, o contato direto entre ambos é indispensável.

Quanto à cinética, a supressão da fluorescência de um fluoróforo, pode ocorrer a partir do seu estado excitado, que sofre colisões ou aproximações reversíveis, com o supressor (supressão dinâmica, que ocorre necessariamente a velocidades inferiores à velocidade de difusão nas condições reinantes) e também pode ocorrer como um resultado da formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo no estado fundamental e uma molécula supressora (neste caso, há supressão estática, cuja velocidade aparente pode ser bem superior à velocidade de difusão. [Lakowicz (2006) e Wang, *et al.* (2015)]).

A análise de Stern-Volmer é útil para estimar a acessibilidade de moléculas supressoras aos resíduos de triptofano em proteínas, bem como na compreensão dos mecanismos envolvidos na supressão da fluorescência destes [Lakowicz (2006)].

A interação de moléculas biologicamente ativas com albuminas séricas pode ser investigada pelas medições das alterações da intensidade de emissão de fluorescência intrínseca com aumento nas concentrações de supressores, empregando a equação de Stern-Volmer (Equação 11A), que fornece a constante experimental K_{SV} , que se relaciona ao tempo de vida, τ_0 , e à constante cinética k_q , como se mostra na Equação 11B.

$$(A) \quad \frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (B) \quad k_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0} \quad (11)$$

Onde: F_0 e F são as intensidades de emissão de fluorescência sem e com a presença do supressor, respectivamente; K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer, k_q é a constante de velocidade de supressão, τ_0 é o tempo de vida de fluorescência da albumina sem o supressor (10^{-8} s) [Tian *et al.* (2007)] e $[Q]$ a concentração do supressor.

A constante de ligação entre moléculas biologicamente ativas e macromoléculas (K_b) é útil para se compreender a distribuição das moléculas no plasma, nos tecidos corporais e no organismo em geral [Chaves *et al.* (2016a)]. Uma ligação muito fraca pode dificultar a distribuição de moléculas dentro do corpo, enquanto que a forte ligação demais diminui as concentrações de moléculas livres disponíveis no plasma [Zhang *et al.* (2011)]. Se há a possibilidade de mais de um sítio de ligação acessível ao supressor dentro de uma proteína, pode-se calcular K_b e o número de sítios de ligação (n), pela equação de duplo logaritmo a seguir (Equação 12):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (12)$$

Onde: F_0 e F são as intensidades de emissão de fluorescência sem e com a presença do supressor, respectivamente; K_b é a constante de ligação; n é o número de sítios de ligação e $[Q]$ a concentração do supressor.

Caso haja apenas uma cavidade principal onde ocorre a ligação entre proteína e ligante (havendo porém fluoróforos em outros sítios, inacessíveis para o ligante), para analisar se a interação entre as albuminas com os supressores é forte, moderada ou fraca, pode-se calcular a constante de Stern-Volmer modificada (K_a) [Eftink *et al.* (1981)]. Esta constante pode ser obtida de acordo com a Equação 13:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{fK_a [Q]} + \frac{1}{f} \quad (13)$$

Onde: F_0 e F são as intensidades de emissão de fluorescência sem e com a presença do supressor, respectivamente; K_a é a constante de ligação de Stern-Volmer modificada; f é a fração da fluorescência inicial que está acessível ao supressor e $[Q]$ a concentração do supressor.

Os parâmetros termodinâmicos da interação (ΔH° e ΔS°) podem ser calculados a partir da equação de van't Hoff (Equação 14A, quando usa $\ln K_a$, e Equação 14B, quando usa $\ln K_{SV}$), e o valor de ΔG° a partir da equação da energia livre de Gibbs (Equação 15):

$$(A) \ln K_a = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (B) \ln K_{SV} = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (14)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (15)$$

Onde T é a temperatura (nestes estudos, 296 K, 303 K, 310 K para *t*-DCTN, 18-FP, LF-B, PF, PIA e 288 K, 293 K, 298 K para α -lap), K_a é a constante de ligação de Stern-Volmer modificada e R é a constante dos gases (8,3145 J/molK).

Para que haja a supressão de fluorescência por FRET é preciso que haja sobreposição espectral entre a fluorescência do estado excitado do doador (fluoróforo) e a absorção do estado fundamental do acceptor (supressor) Förster (1948) e Peng *et al.* (2012)].

A eficiência da transferência de energia (E) é dada pelas Equações 16A e 16B.

$$(A) \quad E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (B) \quad r^6 = \frac{R_0^6 \cdot (1 - E)}{E} \quad (16)$$

Onde: r é a distância entre o acceptor e o doador; R_0 é a distância crítica para a eficiência de transferência de 50%, a qual pode ser determinada a partir da Equação 17:

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \Phi J \quad (17)$$

Onde: K^2 é o fator de orientação espacial do dipolo ($K^2 = 2/3$), n é o índice de refração do meio (usa-se $n = 1,336$, como valor médio para fluidos biológicos/orgânicos) [Hu *et al.* (2006)], Φ é o rendimento quântico de fluorescência do doador (triptofano da albumina sérica) na ausência do acceptor (supressor) ($\phi = 0,15$) [Hu *et al.* (2006)] e J é a integral de sobreposição entre o espectro de emissão do doador e o espectro de absorção do acceptor. J pode ser calculado conforme a Equação 18:

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F(\lambda) d\lambda} \approx \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \Delta\lambda} \quad (18)$$

Onde: $F(\lambda)$ é a intensidade de fluorescência do doador no comprimento de onda de λ até $\lambda + \Delta\lambda$ e $\varepsilon(\lambda)$ é a absorvidade molar do acceptor no comprimento de onda λ .

J também pode ser expressa em termos de frequência, ν ($\nu \cdot \lambda = c$ - velocidade da luz):

$$J = c^4 \int \frac{f_D(\nu) \varepsilon_A(\nu)}{\nu^4} d\nu \quad (19)$$

Onde $f_D(\nu)$ é a intensidade de fluorescência na frequência ν e $\varepsilon_A(\nu)$ é a absorvidade molar nessa frequência.

4.1.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)

Dicroísmo circular é uma técnica sensível para monitorar alterações conformacionais em proteínas após interações com ligantes [Varlan *et al.* (2010)]. Espectros de DC das albuminas exibem duas bandas negativas na região de UV a 208 e 222 nm, que contribuem para a transição $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ na ligação peptídica da α -hélice, respectivamente [Shi *et al.* (2015)]. Essas bandas são características das unidades estruturais de α -hélice da proteína [He *et al.* (2008)].

Para obter valores quantitativos de alterações na estrutura secundária da proteína com a adição das moléculas (biologicamente ativas), pode-se empregar algumas equações nos dados espectroscópicos de DC. A intensidade de sinal de dicroísmo circular pode ser expressa como elipticidade média por resíduo (do inglês *mean residue ellipticity* - MRE), definida de acordo com a Equação 20 [Matei *et al.* (2010)]:

$$MRE = \frac{\theta}{(10 \cdot n \cdot l \cdot C_p)} \quad (20)$$

Onde: θ é o sinal de DC observado (em mili-graus), n é o número de resíduos de aminoácidos (582 para ASB [Rogozea *et al.* (2012)] e 585 para ASH [Matei *et al.* (2010)]), l é o caminho ótico da célula (em cm) e C_p é a concentração molar da proteína (albumina, no caso - $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L). O conteúdo helicoidal da albumina, livre e na presença do supressor, pode ser calculado a partir dos valores de MRE nos dois mínimos do espectro da proteína: a 208 nm (Equação 21) e a 222 nm (equação 22):

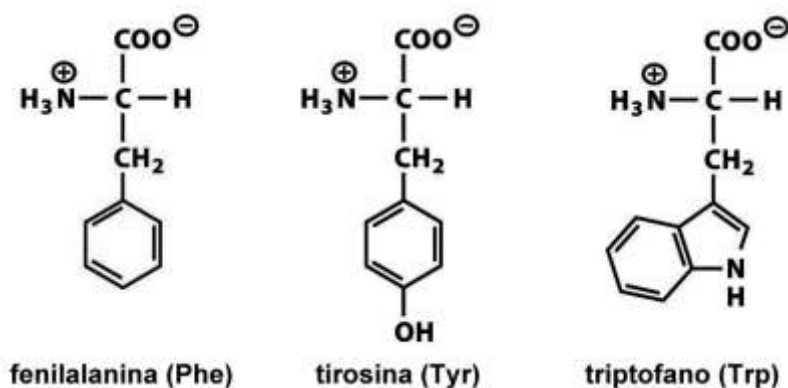
$$\% \alpha - \text{hélice} = \frac{(MRE_{208} - 4000)}{(33000 - 4000)} \times 100 \quad (21)$$

$$\% \alpha - \text{hélice} = \frac{(MRE_{222} - 2340)}{30300} \times 100 \quad (22)$$

4.2 Interação entre Albumina Sérica Humana (ASH) com Feofitina (18-FP)

4.2.1 Absorção Molecular na Região do UV-Vis

Proteínas típicas possuem uma banda de absorção molecular no ultravioleta a 280 nm, correspondente a absorção de luz por três tipos de resíduos de aminoácidos aromáticos: triptofano, fenilalanina e tirosina (abaixo). Dentre esses três resíduos aromáticos mencionados, o que tem absorção e emissão de fluorescência mais intensa é o triptofano, isso devido ao seu alto valor de absorvidade molar e rendimento quântico de fluorescência comparado com tirosina e fenilalanina [Lakowicz (2006)].



Esquema 9

Para o tratamento de certos tipos de cânceres por terapia fotodinâmica, pode-se usar feofitinas – moléculas orgânicas classificadas como segunda geração de fotossensibilizadores [Ben Dror *et al.* (2009)]. A feofitina (17*R*,18*R*)-purpurina-18-fetil éster (18-FP) – isolada da planta *triangulare* – além de absorver luz em comprimento de onda a 400 nm, correspondente à banda de Soret [Giovannetti (2012)], também absorve comprimentos de onda maiores, 550 nm e 700 nm. A descoberta e desenvolvimento de moléculas que absorvem radiação no infravermelho próximo (600-900 nm) oferecem novas oportunidades, tanto para terapia fotodinâmica, quanto como agentes de contraste para imagens médicas. Isto devido à alta penetração da irradiação no tecido, sem causar danos à saúde [Luo *et al.* (2011)].

A Figura 9 mostra o espectro de absorção molecular da ASH em solução tampão de PBS ($\lambda_{\text{absmáx}} = 280 \text{ nm}$) e da feofitina em solução de etanol ($\lambda_{\text{abs}} = 406, 550 \text{ e } 703 \text{ nm}$).

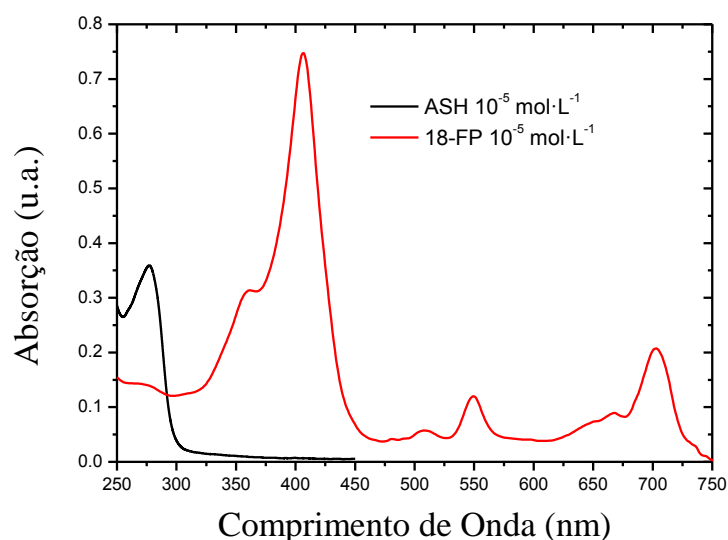
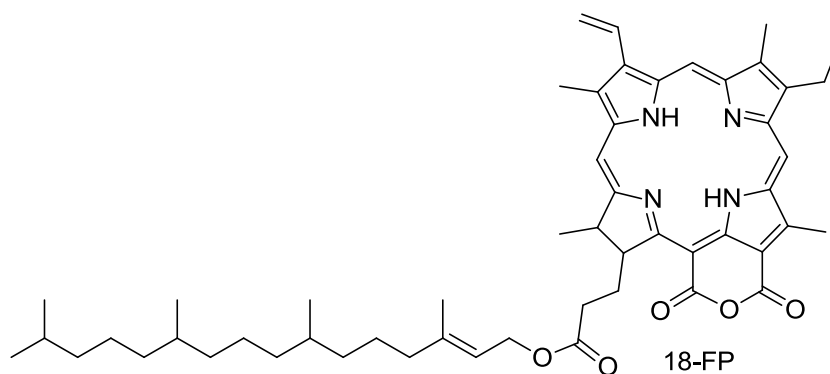


Figura 9 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) e feofitina em etanol. $C_{ASH} = C_{18-FP} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L.

4.2.2 Espectroscopia de Fluorescência

A Figura 10 mostra a supressão da emissão de fluorescência do resíduo de triptofano da ASH por adição de aliquotas da solução de 18-FP. Isto indica que a localização da molécula de feofitina dentro da proteína deve estar perto do resíduo Trp-214 [Liu *et al.* (2003)]. A ausência de alterações consideráveis no comprimento de onda de emissão máxima da ASH ($\lambda = 345$ nm) é evidência de que a presença da feofitina não exerce uma grande influência sobre a polaridade do microambiente da cavidade em torno do resíduo de triptofano [Tian *et al.* (2007)]. Como já foi mencionado, a supressão de fluorescência pode ocorrer por mecanismo estático ou dinâmico. No primeiro caso, há formação de um pré-complexo entre supressor e fluoróforo, antes mesmo que este absorva luz e forme o estado excitado; e no segundo caso a supressão ocorre durante aproximação entre os dois, a distância menor que a crítica, seguida por separação. Conforme pode ser visto na Tabela 4 e no *inset* da Figura 10 a constante de velocidade de difusão ($k_{diff} \approx 5,00 \times 10^9$ L/mols em água a 298 K) [Brune *et al.*

(1993)] tem um valor menor, comparado com o valor da constante de velocidade de supressão da associação ASH:18-FP ($k_q \approx 10^{13}$ L/mols), indicando que o provável mecanismo de supressão de fluorescência da ASH pela 18-FP é estático [Eftink *et al.* (1981) e Tian *et al.* (2007)]

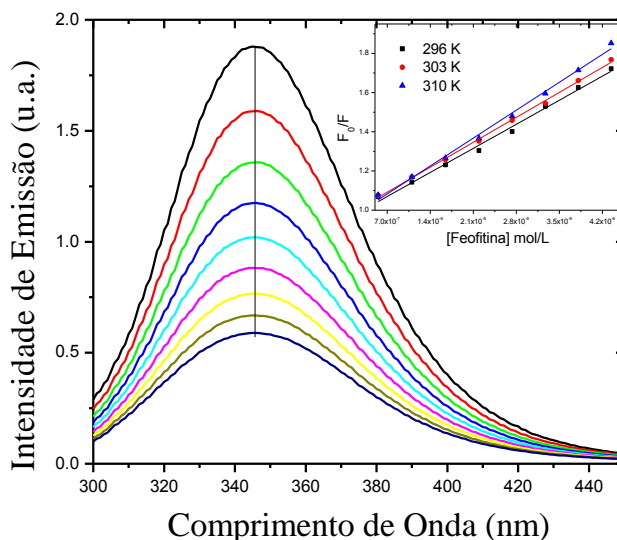


Figura 10 – Espectros de emissão de fluorescência do fluoróforo interno da ASH (Trp-214) e sua supressão pela adição da 18-FP. ASH em solução tampão de PBS (pH=7,4). *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASH:18FP a 296 K, 303 K e 310 K. $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{18-FP} = 0,55; 1,10; 1,65; 2,19; 2,73; 3,27; 3,81, 4,34 \times 10^{-6}$ mol/L, $T = 296$ K e $\lambda_{exc} = 280$ nm.

O valor da constante de ligação de Stern-Volmer modificado (K_a) está na ordem de 10^4 L/mol (Tabela 4), indicando uma interação moderada entre a albumina e a feofitina, com a formação de uma associação ASH:18-FP [Tian *et al.* (2007) e Li *et al.* (2009a)]. Portanto, esta feofitina pode ser carregada pela albumina. Associação moderada é preferencial em comparação com forte ou fraca (alto ou baixo valor de K_a , respectivamente), porque a feofitina pode ser retida irreversivelmente ou não ser carregada nestes casos. Nota-se que também há um aumento no valor de K_a com o aumento da temperatura, contudo esse aumento não é significativo. Os valores de K_a dependem da carga e estrutura da 18-FP, assim como a conformação e carga da ASH [Borisevitch *et al.* (1996)].

Para obter evidências sobre os parâmetros termodinâmicos ΔH° , ΔS° e ΔG° controladores da interação ASH:18-FP, inicialmente utilizou-se o tratamento de van't Hoff (*inset* Figura 11), unido com a equação livre de Gibbs (equação XX). Conforme mostrado na Tabela 4, os valores negativos de ΔG° são consistentes com a espontaneidade da ligação, o valor positivo de ΔH° indica que o processo de ligação da feofitina é endotérmico e o valor

positivo de ΔS° mostra que a interação ocorre principalmente devido a fatores hidrofóbicos [Timaseff (1972) e Ross *et al.* (1981)]. Tais fatores hidrofóbicos estão relacionados com a influência das moléculas de água de hidratação. Há duas possíveis contribuições que podem ser utilizadas para explicar o aumento na entropia: moléculas de hidratação da cavidade são expelidas com a entrada da 18-FP, assim como a desolvatação do ligante, que também expelle as suas próprias moléculas de hidratação. Isto provoca aumento no número de micro-estados do sistema, aumentando o valor de ΔS° .

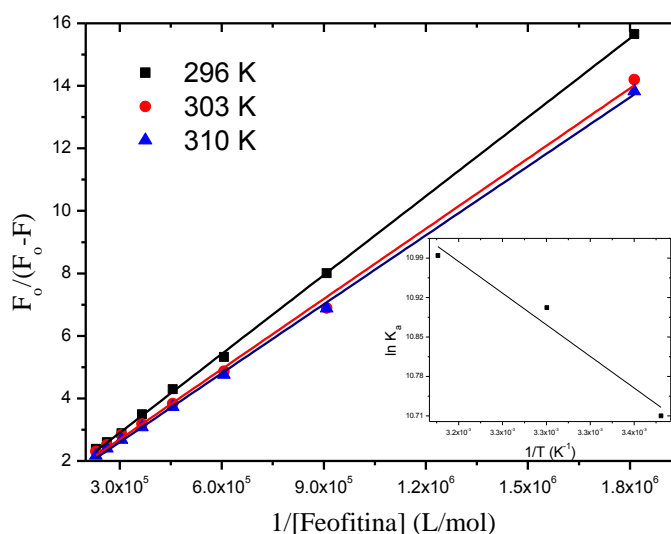


Figura 11 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para associação ASH:18-FP a 296 K, 303 K e 310 K. *Inset*: Gráfico de van't Hoff, a partir dos dados de Stern-Volmer modificado nas três temperaturas de estudo.

Tabela 4 – Valores de K_{SV} , k_q , K_a e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) da associação ASH:18-FP em 296 K, 303 K e 310 K.

T (K)	$K_{SV} \times 10^5$ (L/mol)	$k_q \times 10^{13}$ (L/mol.s)	r^2	$K_a \times 10^4$ (L/mol)	r^2	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (kJ/mol.K)	ΔG° (kJ/mol)	r^2
296	1,75±0,07	1,75	0,9927	4,48±0,06	0,9997	15,5±1,2	0,145	-26,4	0,9313
303	1,82±0,03	1,82	0,9980	5,43±0,13	0,9978	15,5±1,2	0,145	-27,4	0,9313
310	2,03±0,06	2,03	0,9946	5,95±0,08	0,9992	15,5±1,2	0,145	-28,4	0,9313

4.2.3 Modelagem Molecular

A estrutura tridimensional da ASH tem diferentes sítios de ligações, com diferentes especificidades (domínios I, II e III); onde o domínio I (sítio de Sudlow I) e domínio II (sítio de Sudlow II) são os mais importantes [Fasano *et al.* (2005)]. O sítio I também chamado de sítio de ligação da varfarina, está localizado no subdomínio IIA, enquanto o sítio II, chamado

de sítio de ligação indol/benzodiazepínico, está localizado no subdomínio IIIA. Albumina sérica humana é composta de uma cadeia polipeptídica de 585 resíduos de aminoácidos [He *et al.* (1992)] e contém somente um resíduo de triptofano, Trp-214, localizado no subdomínio IIA. Trp-214 está localizado em uma região interna da proteína com alto caráter hidrofóbico [Carter *et al.* (1994) e Moriyama *et al.* (1996)].

A partir dos estudos de supressão de fluorescência da ASH, sabe-se que a feofitina está localizada próxima ao resíduo Trp-214. Estudos por ancoramento molecular foram executados para analisar as principais interações intermoleculares entre a feofitina e os resíduos de aminoácidos presentes na cavidade do subdomínio IIA. Em acordo com os resultados experimentais, o ancoramento molecular sugere que a feofitina mesmo sendo uma molécula bastante volumosa é capaz de ser acomodada na cavidade ao lado do resíduo Trp-214, apresentando um perfil de interações favoráveis com os resíduos da cavidade.

Dentro da cavidade a feofitina interage *via* ligação de hidrogênio com quatro resíduos de aminoácidos – uma arginina e três lisinas (Figura 12A). Os resíduos Lys-198 e Lys-194 fazem ligação de hidrogênio com ambos oxigênios do grupo éster da cadeia fitil, tendo distância entre os átomos do doador e acceptor na ligação de hidrogênio de 3,26 Å e 3,06 Å, respectivamente. O grupo carboxila do anidrido cíclico recebe ligação de hidrogênio dos resíduos Arg-221 e Lys-443, com uma distância de 3,26 Å e 2,57 Å, respectivamente. Além dessas interações, o ligante aparenta interagir com a ASH através de um vasto número de interações hidrofóbicas. Os resultados de ancoramento molecular mostram que a cadeia fitila, um grupo não polar, está acomodada dentro de uma porção essencialmente hidrofóbica da ASH, onde interage primariamente com os resíduos Leu-197, Phe-205, Ala-209, Leu-346, Val-481 e Trp-214 (Figura 12B). Esta proximidade entre o supressor e o fluoróforo (Trp-214) pode explicar a eficiência da supressão de fluorescência [Lakowicz (2006)].

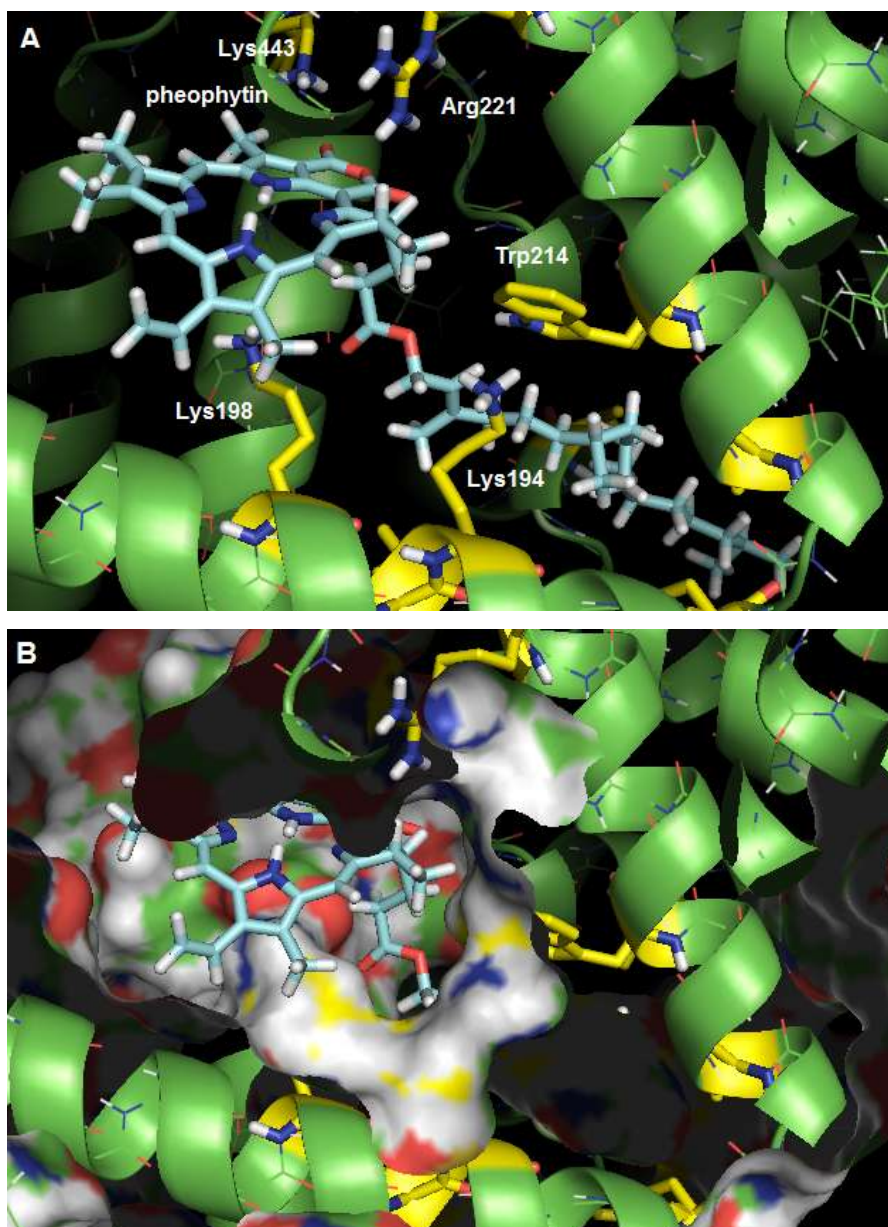


Figura 12 – (A) Melhor resultado de pontuação (do inglês *pose*) para associação ASH:18-FP por ancoramento molecular (função *ChemPLP*). (B) Representação da superfície molecular da ASH, onde pode ser vista a cadeia apolar da feofitina (grupo fitila) completamente envolvida pela porção hidrofóbica da albumina. Carbono: azul (18-FP), verde (ASH), amarelo (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul (figuras geradas com o *software* PyMOL).

4.3 Interação entre Albumina Sérica Bovina (ASB) com *trans*-desidrocrotonina (*t*-DCTN)

4.3.1 Espectroscopia de Fluorescência

A Figura 13 mostra a supressão de fluorescência da ASB ($[ASB] = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L) pela adição de sucessivas alíquotas de *t*-DCTN a 296 K, uma das três temperaturas

empregadas neste trabalho (296 K, 303 K e 310 K). O processo de supressão de fluorescência indica que o diterpeno está localizado próximo ao resíduo de triptofano, que pode ser o Trp-134 e/ou Trp-212 [Eftink *et al.* (1981)]. A ausência de mudanças significativas no máximo de emissão de fluorescência da ASB ($\lambda \approx 348$ nm) é uma evidência que a presença do *t*-DCTN não exerce qualquer influência sobre a polaridade do microambiente dentro da cavidade que contém os resíduos de triptofanos [Tian *et al.* (2007)].

O *inset* da Figura 13 fornece os valores de K_{SV} , do qual k_q pode ser calculado. Em alguns casos, o fluoróforo, com o mesmo supressor, pode ser suprimido por uma combinação de mecanismo de supressão estático e dinâmico (combinação de processos de supressão) [Lin *et al.* (2009)]. Uma vez que as constantes de velocidade de supressão obtidas ($k_q \approx 10^{11}$ L/mols, Tabela 5) são duas ordens de grandeza maiores do que a constante de velocidade de difusão ($k_{diff} \approx 5,00 \times 10^9$ L/mols em água a 298 K) [Brune *et al.* (1993)], o provável mecanismo de supressão de fluorescência é estático [Eftink *et al.* (1981), Tian *et al.* (2007) e Tian *et al.* (2015)]. Supressão estática é decida a formação de uma associação no estado fundamental entre o fluoróforo (ASB) e o supressor (*t*-DCTN). Uma vez que os valores de K_{SV} aumentam com o aumento da temperatura, o mecanismo de interação da ASB com *t*-DCTN não é tipicamente estático, sendo acompanhado por supressão dinâmica [Zhang *et al.* (2013c) e Tian *et al.* (2015)]. Isto provavelmente ocorre devido à elevada concentração de supressor, já que quantidades significativas das moléculas supressoras estão em estreita proximidade com o fluoróforo.

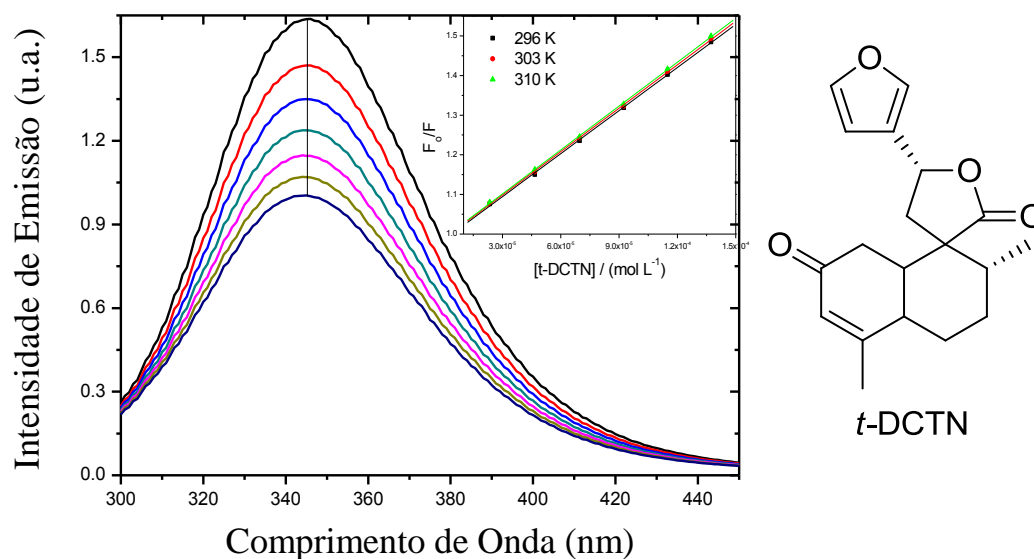


Figura 13 – Espectros de emissão de fluorescência dos fluoróforos internos da ASB e sua supressão pela adição do *t*-DCTN. ASB em solução tampão de PBS (pH=7,4). *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASB: *t*-DCTN a 296 K, 303 K e 310 K. $C_{ASB} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{t-DCTN} = 0,24; 0,47; 0,70; 0,83; 1,15; 1,37 \times 10^{-4}$ mol/L, $T = 296$ K e $\lambda_{exc} = 280$ nm.

Conforme pode ser visto na Tabela 5 e na Figura 14, os valores da constante de ligação ($K_b \approx 10^3$ L/mol), indicam uma fraca interação entre albumina e *t*-DCTN [Bakkialakshmi *et al.* (2012) e Belatik *et al.* (2012)]. Uma vez que há dois diferentes resíduos de triptofanos (Trp-134 e Trp-212) localizados em diferentes cavidades na estrutura da ASB, que estão disponíveis para interagir com o supressor, foi calculado o número de sítios de ligação (n) para saber se ambos ou apenas um destes locais é capaz de interagir com o *t*-DCTN. Os valores de n em diferentes temperaturas ($n \approx 1.0$ a 296 K, 303 K e 310 K), indicam a existência de apenas um principal sítio de ligação na estrutura da ASB para *t*-DCTN [Bakkialakshmi *et al.* (2012)].

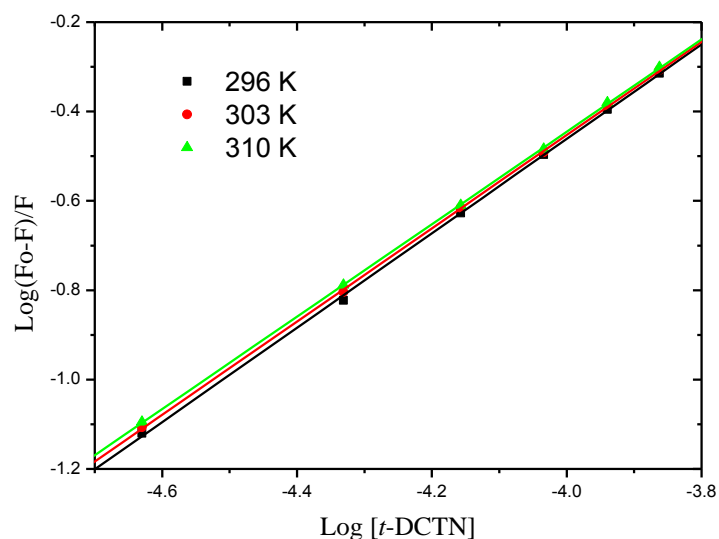


Figura 14 – Gráfico do $\log [(F_0-F)/F]$ vs. $\log [Q]$ para ASB:t-DCTN a 296 K, 303 K e 310 K.

As forças de interações entre moléculas exógenas e proteínas (van der Waals, eletrostáticas, ligação de hidrogênio e efeitos hidrofóbicos) podem estar relacionadas com os parâmetros termodinâmicos. Neste sentido, se $\Delta H^\circ > 0$ e $\Delta S^\circ > 0$ há indícios que a principal força operando na ligação é através de interações hidrofóbicas. Em contrapartida, se $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ > 0$, a principal força é a de efeito eletrostático e finalmente, se $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ < 0$, *van der Waals* e ligação de hidrogênio desempenham um papel importante na associação ASB:t-DCTN [Ross *et al.* (1981) e Bi *et al.* (2012)].

Os parâmetros termodinâmicos estão apresentados na Tabela 5 e Figura 15. Os valores negativos para energia livre de Gibbs ($\Delta G^\circ \approx -20,78$ kJ/mol) indicam ligação espontânea entre ASB e t-DCTN, com o valor positivo desfavorável de entalpia ($\Delta H^\circ = 1,04$ kJ/mol) sendo compensado pelo valor positivo da entropia ($\Delta S^\circ = 0,072$ kJ/molK) [Timaseff (1972)]. Como ΔH° e ΔS° são positivos, indicam interações tipicamente hidrofóbicas entre ASB:t-DCTN [Ross *et al.* (1981) e Bi *et al.* (2012);]. Essas interações hidrofóbicas serão exploradas nos estudos de modelagem molecular.

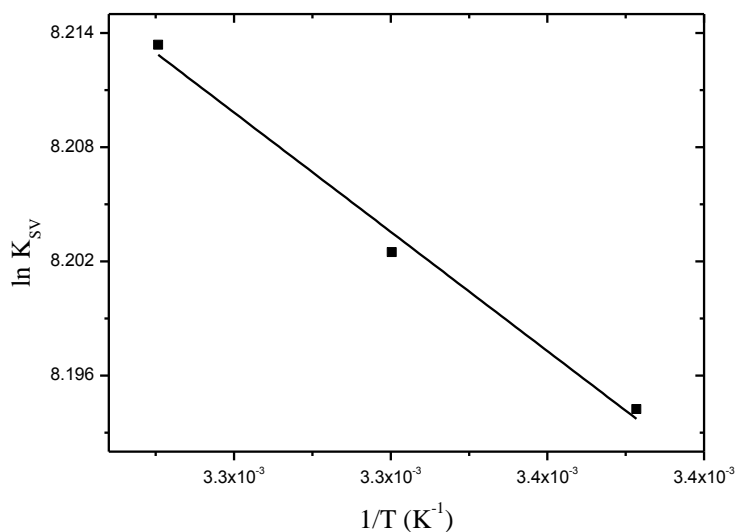


Figura 15 – Gráfico de van't Hoff a partir dos valores de K_{SV} versus o inverso da temperatura.

Tabela 5 – Valores de K_{SV} , k_q , K_b , n e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) da associação ASB:*t*-DCTN em 296 K, 303 K e 310 K.

T (K)	$K_{SV} \times 10^3$ (L/mol)	$k_q \times 10^{11}$ (L/mol.s)	r^2	$K_b \times 10^3$ (L/mol)	n	r^2	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (kJ/mol.K)	ΔG° (kJ/mol)	r^2
296	3,62±0,03	3,62	0,9999	5,81	1,06±0,01	0,9999	1,04±0,01	0,072	-20,3	0,9788
303	3,65±0,03	3,65	0,9999	5,27	1,04±0,01	0,9999	1,04±0,01	0,072	-20,8	0,9788
310	3,69±0,03	3,69	0,9999	4,92	1,03±0,01	0,9999	1,04±0,01	0,072	-21,3	0,9788

4.3.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)

Espectros de DC (200-260 nm) da ASB foram registrados na ausência e presença do *t*-DCTN, a diferentes concentrações em 310 K (Figura 16). Após o aumento da concentração de *t*-DCTN na solução de albumina, um pequeno decaimento na intensidade a 208 nm e 222 nm pode ser observado. Este dado indica uma pequena mudança na estrutura secundária da ASB, contudo a estrutura predominante permanece sendo α -hélice [Khan *et al.* (2008)]. Esse decaimento sobre a intensidade nestas duas absorções é provavelmente devido ao elevado volume estrutural do diterpeno. Quantitativamente, a 222 nm, a albumina livre apresentou 39,7% de conteúdo de α -hélice, variando para 37,2%; 35,8% e 32,7%, após a adição de concentrações de 0,24; 0,70 e 1,15 x 10⁻⁴ mol/L de *t*-DCTN, respectivamente. A pequena variação no decaimento dos valores de % α -hélice a 222 nm novamente indica alterações estruturais pouco significativas quando o *t*-DCTN se associa à ASB. Já a 208 nm, na ausência

do *t*-DCTN a ASB apresentou 40,6% de conteúdo de α -hélice, variando para 39,3%; 40,5% e 41,1% após a adição das mesmas concentrações de ligante citadas anteriormente. Como a amostra *t*-DCTN tem centros quirais que contribuem para o efeito Cotton na região de 208 nm, observa-se um pequeno aumento nos valores de % α -hélice.

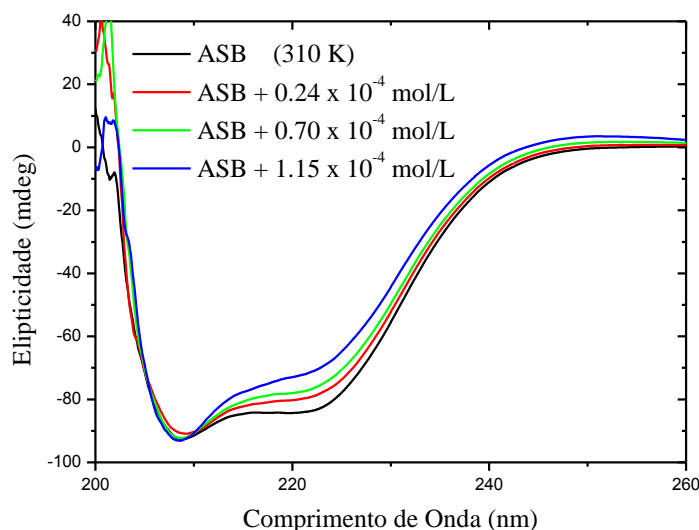


Figura 16 – Espectros de DC para ASB livre e ASB associada a *t*-DCTN em diferentes concentrações de ligante a 310 K. $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{t-DCTN} = 0,24; 0,70$ e $1,15 \times 10^{-4}$ mol/L.

4.3.3 Modelagem Molecular

A estrutura da albumina sérica bovina consiste em três domínios estruturalmente similares (I, II e III), cada um contendo dois subdomínios, A e B [Lin *et al.* (1976)]. O resíduo de aminoácido Trp-134 está localizado na superfície da proteína, na região hidrofílica (região IB), enquanto o resíduo de aminoácido Trp-212 está localizado dentro de uma cavidade hidrofóbica (região IIA) [Bhattacharya *et al.* (2009)]. De acordo com o número de sítios de ligação ($n \approx 1$), obtido a partir da supressão de fluorescência, a *t*-DCTN tem somente um sítio de ligação para a ASB [Belatik *et al.* (2012)]. A fim de obter informações sobre o local de ligação preferencial e para ajudar na compreensão mais detalhada da interação da albumina com *t*-DCTN, estudos utilizando a técnica de ancoramento molecular, foram realizados.

Os resultados de ancoramento molecular sugerem que o *t*-DCTN interage mais favoravelmente na região hidrofílica (região IB - pontuação de ancoramento 50,0), ao invés da cavidade hidrofóbica (região IIA – pontuação de ancoramento 41,5). A Figura 17A mostra o melhor resultado de ancoramento molecular e a superfície de *van der Waals* para *t*-DCTN na

região IB. A estrutura do *t*-DCTN, é um heterociclo volumoso que tem um centro hidrofóbico que é capaz de interagir na cavidade hidrofóbica da região IB, longe da porção polar centrada nos resíduos de aminoácidos de Tyr-411 e Arg-410. Os parâmetros termodinâmicos experimentais indicam interações hidrofóbicas como a principal força de ligação entre *t*-DCTN e ASB. Os resultados de ancoramento molecular sugerem que a parte hidrofóbica do *t*-DCTN participa através de uma interação hidrofóbica com quatro resíduos de aminoácidos: Leu-24, Phe-36, Val-40 e Trp-134. A superfície de *van der Waals* de cada resíduo de aminoácido apolar selecionado sobrepõe à superfície de *van der Waals* do *t*-DCTN (Figura 33A), o que indica que a interação entre eles é muito provável.

A Figura 17B mostra a superfície molecular da região IB da ASB, sugerindo que o grupo polar do *t*-DCTN - a porção furano-lactona - não tem uma interação significativa com os resíduos de aminoácidos polares de albumina, e a maior parte da estrutura do *t*-DCTN está mais exposta ao solvente do que ao ambiente interior da proteína.

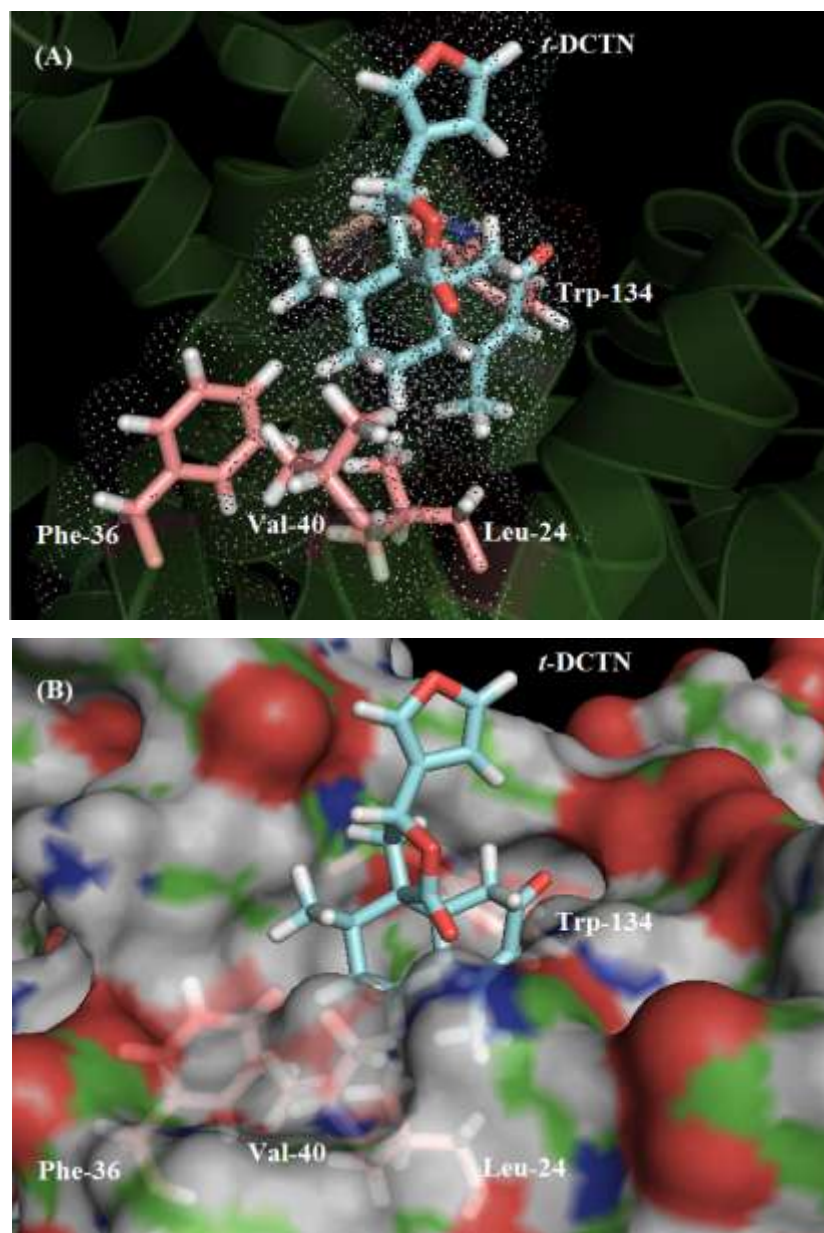


Figura 17 – (A) Melhor resultado de pontuação (do inglês *pose*) e superfície de *van der Waals* para associação ASB:*t*-DCTN por ancoramento molecular (função *ChemPLP*). (B) Representação da superfície molecular da ASB para a região IB. Carbono: azul (*t*-DCTN), verde (ASB), bege (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul (figuras geradas com o *software* PyMOL).

4.4 Interação entre Albumina Sérica Bovina (ASB) com flavonóide glicosilado (PF; 7-*O*- β -*D*-glicopiranosil-6-(3-metilbut-2-enil)-3,5,4'-triidroxiflavona)

4.4.1 Espectroscopia de Fluorescência

Como pode ser visto na Figura 18, com a adição de diferentes concentrações de supressor PF, há diminuição na intensidade de emissão de fluorescência da ASB ($\lambda_{em} = 345$

nm), enquanto que a região de emissão máxima de fluorescência permanece a mesma, indicando que a associação ASB:PF deve estar ocorrendo próxima a um dos resíduos de triptofano da albumina e que a associação do supressor não altera o microambiente na vizinhança dos fluoróforos.

Uma variedade de interações moleculares podem resultar em supressão de fluorescência, incluindo reações no estado excitado, rearranjo molecular, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e supressão colisional [Han *et al.* (2012)]. Os valores da constante de Stern-Volmer - K_{SV} - e da constante de velocidade de supressão - k_q - (Tabela 6 e *inset* da Figura 18), indicam que a supressão de fluorescência da ASB ocorre por um processo estático, porque os valores de K_{SV} diminuem com o aumento da temperatura e os valores de k_q são maiores do que a constante de velocidade de difusão ($k_{diff} \approx 5,00 \times 10^9$ L/mols em água a 298 K) [Brune *et al.* (1993)]. A supressão de fluorescência estática indica a formação de uma associação não fluorescente entre o fluoróforo (triptofano) e o supressor (PF) no estado fundamental [Tian *et al.* (2007)].

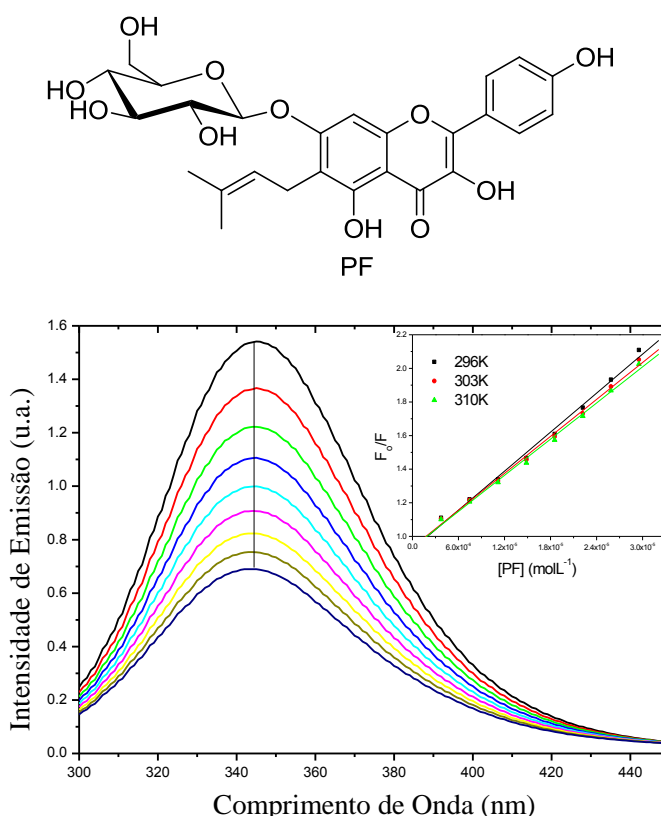


Figura 18 – Espectros de emissão de fluorescência dos fluoróforos internos da ASB e sua supressão pela adição do PF. ASB em solução tampão de PBS (pH=7,4). *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASB:PF a 296 K, 303 K e 310 K. $C_{ASB} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{PF} = 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,74; 3,09 \times 10^{-5}$ mol/L, $T = 296$ K e $\lambda_{exc} = 280$ nm.

Os valores da constante de ligação de Stern-Volmer modificada (K_a) estão na ordem de 10^4 L/mol (Tabela 6 e Figura 19), indicando uma interação moderada entre o flavonóide glicosilado e a albumina [Sulkowska (2002) e Liu *et al.* (2003)], sendo que a temperatura exerce pouco efeito em seus valores. Os valores de K_a obtidos para PF estão na mesma magnitude quando comparados com diferentes classes de flavonóides da literatura: flavona (apigenina [Yuan *et al.* (2007)]), flavanona (hesperidina [Xie *et al.* (2005)] e naringenina [Zhang *et al.* (2008)]) e isoflavona (genisteína [Mandeville *et al.* (2009)]). A constante de ligação (K_b) calculada a partir do duplo logaritmo, está na ordem de 10^5 L/mol (Tabela 6), diferindo por uma ordem de grandeza dos valores de K_a ; no entanto ambos os valores indicam interação moderada do flavonóide com albumina sérica [Xie *et al.* (2005), Li *et al.* (2006) e Liu *et al.* (2009)]. A divergência ocorre porque cada equação emprega uma aproximação matemática diferente. Observe-se que para ambos os tratamentos a temperatura tem pouca influência sobre o valor das constantes. Os valores do número de sítios de ligação (n) são aproximadamente 1 para todas as temperaturas (Tabela 6 e Figura 20), indicando que há apenas uma principal cavidade de interação da ASB para o flavonoide glicosilado (PF) [Bakkialakshmi *et al.* (2012)].

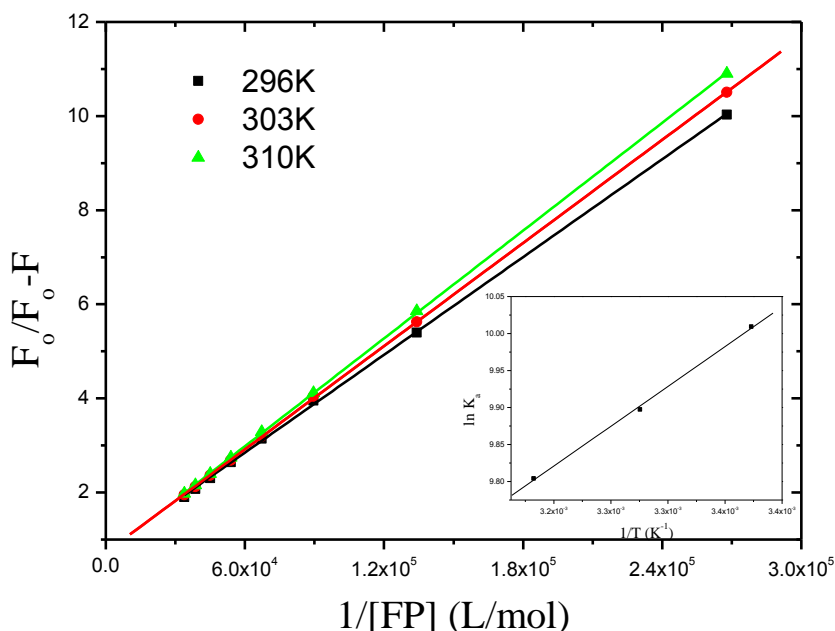


Figura 19 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para associação ASH:PF a 296 K, 303 K e 310 K. *Inset*: Gráfico de van't Hoff, a partir dos dados de Stern-Volmer modificado nas três temperaturas de estudo.

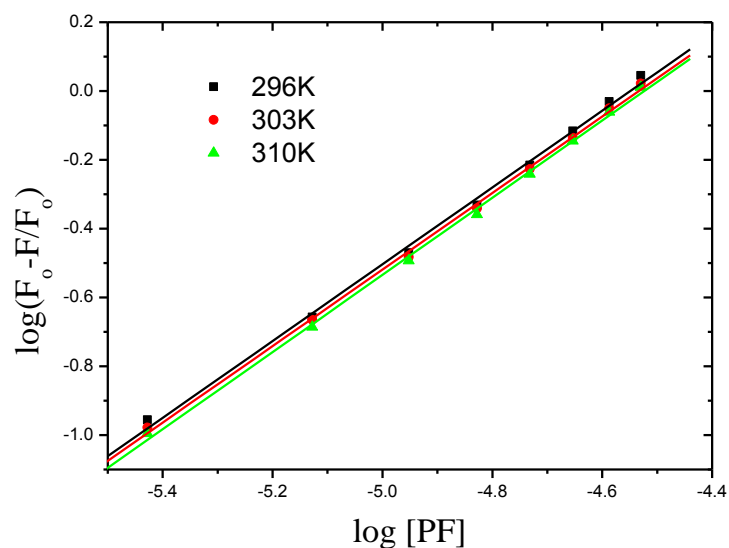


Figura 20 – Gráfico do $\log [(F_0-F)/F]$ vs. $\log [Q]$ para ASB:PF a 296 K, 303 K e 310 K.

Tabela 6 – Valores de K_{SV} , k_q , K_a , K_b e n da associação ASB:PF em 296 K, 303 K e 310 K.

T (K)	$K_{SV} \times 10^4$ (L/mol)	$k_q \times 10^{12}$ (L/mol.s)	r^2	$K_a \times 10^4$ (L/mol)	r^2	$K_b \times 10^5$ (L/mol)	n	r^2
296	$3,87 \pm 0,05$	3,87	0,9962	$2,22 \pm 0,02$	0,9998	1,19	$1,12 \pm 0,02$	0,9985
303	$3,67 \pm 0,04$	3,67	0,9973	$1,99 \pm 0,02$	0,9999	1,10	$1,12 \pm 0,01$	0,9992
310	$3,59 \pm 0,04$	3,59	0,9972	$1,81 \pm 0,02$	0,9999	1,18	$1,11 \pm 0,01$	0,9992

Os parâmetros termodinâmicos da associação ASB:PF estão listados na Tabela 7 e obtidos a partir do *inset* da Figura 19. Os valores negativos da energia livre de Gibbs (ΔG°) estão de acordo com a espontaneidade da ligação, sendo que a maior contribuição para essa espontaneidade veio da variação de entropia ($\Delta S^\circ < 0$) e entalpia ($\Delta H^\circ < 0$), portanto o processo de associação é entropicamente e entalpicamente dirigido [Wang, *et al.* (2015)]. De acordo com a teoria de Ross e Subramanian [Ross *et al.* (1981)] $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ > 0$ indicam ligação de hidrogênio e/ou forças eletrostáticas como as principais interações intermoleculares envolvidas na interação ASB:PF. Essas interações serão melhor exploradas na análise por ancoramento molecular.

Tabela 7 – Parâmetros termodinâmicos da associação ASB:PF em 296 K, 303 K e 310 K.

T	ΔH°	ΔS°	ΔG°	r^2
(K)	(kJ/mol)	(kJ/mol.K)	(kJ/mol)	
296	-11,2±1,2	0,0450	-24,6	0,9992
303	-11,2±1,2	0,0450	-24,9	0,9992
310	-11,2±1,2	0,0450	-25,3	0,9992

Na Figura 21 a sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da ASB e o espectro de absorção molecular do PF pode ser claramente visto, indicando a probabilidade de um processo de transferência de energia dipolo-dipolo (FRET) entre o fluoróforo da ASB e o estado fundamental do PF [Nair (2015)].

Na maior temperatura dessas experiências (310 K), a integral de sobreposição (J) calculada foi de aproximadamente $6,39 \times 10^{-17} \text{ L/mol.cm}^3$, sendo que os valores de R_0 e r foram de 2,24 nm e 6,54 nm, respectivamente. Uma vez que o valor de r (distância entre o resíduo de triptofano da ASB e o supressor) é menor do que 7 nm, confirmando a transferência de energia não radiativa, via FRET, entre ASB e PF [Bia *et al.* (2004)].

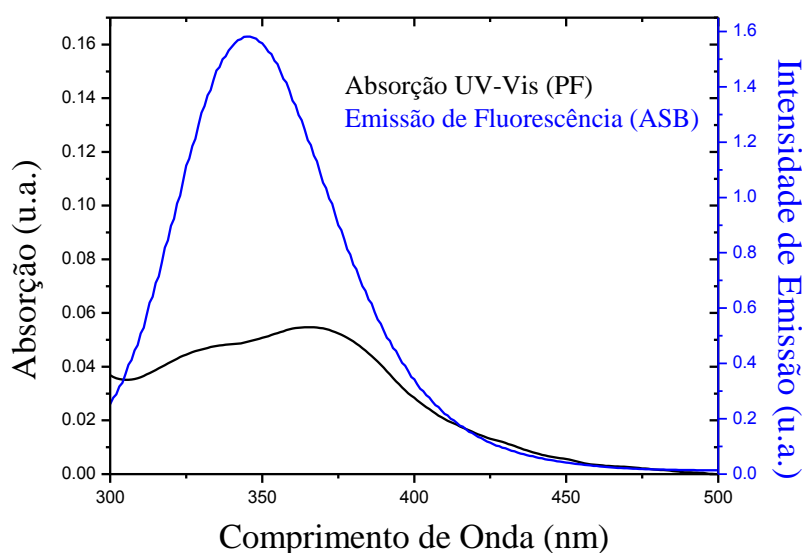


Figura 21 – Sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência da ASB e absorção do supressor PF. $C_{ASB} = C_{PF} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ a 310 K.

4.4.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)

Como mostrado na Figura 22, os espectros de CD da ASB livre e associada com PF a 310 K foram muito semelhantes em forma, indicando que a ligação não está afetando a

estrutura secundária da albumina. O conteúdo de % α -hélice, varia de 53,3% para albumina livre, a 53,0%; 52,6%; 51,4% e 50,8% com adições de 0,34; 1,37; 2,74 e 3,09 $\times 10^{-5}$ mol/L de PF, respectivamente a 208 nm. A pequena variação na % α -hélice também foi vista a 222 nm (51,5% - ASB livre – para 51,4%, 51,2%, 51,1% e 50,8% nas mesmas concentrações de PF citadas anteriormente). Isso indica que a presença, nestas quantidades, do flavonóide glicosilado não afeta significativamente a estrutura secundária da albumina [Li *et al.* (2009b)].

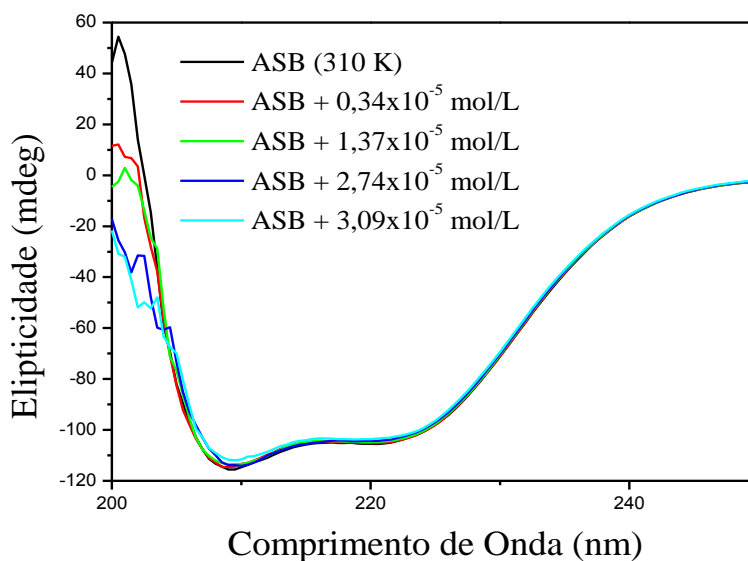


Figura 22 – Espectros de DC para ASB livre e ASB associada a PF em diferentes concentrações de ligante a 310 K. $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{PF} = 0,34; 1,37; 2,74$ e $3,09 \times 10^{-5}$ mol/L.

4.4.3 Modelagem Molecular

A fim de avaliar qual o principal sítio para interação entre ASB e o supressor PF (subdomínio IB ou IIA), estudos de ancoramento molecular foram realizados. Os valores de pontuação de ancoramento molecular, sugerem o subdomínio IIA (pontuação 90,35) ao invés do IB (pontuação 46,12), como sendo a região da albumina mais provável para a associação ASB:PF.

Como pode ser visto na Figura 23, o flavonóide glicosilado interage no subdomínio IIA, com uma variedade de resíduos de aminoácidos. A Tabela 8 apresenta as interações intermoleculares observadas para a melhor solução do cálculo computacional. Ligações de hidrogênio e interação hidrofóbica estão envolvidos no processo de associação ASB:PF. A estrutura do PF interage com os resíduos de aminoácidos Glu-152, Arg-194, Arg-198, Trp-212, Arg-217, Ser-343, Asp-450 e Ser-453 por ligação de hidrogênio. A porção glicosídica do

PF interage por meio de ligações de hidrogênio com resíduos de Ser-343, Asp-450 e Ser-453. Pode ser visto que há apenas um único resíduo de aminoácido que se comporta comoceptor de ligação de hidrogênio (Glu-152 - representado em amarelo na Figura 23), enquanto que os demais são doadores de ligação de hidrogênio. A cauda hidrófoba do ligante interage com alguns resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, tais como os resíduos Ala-341 e Val-342.

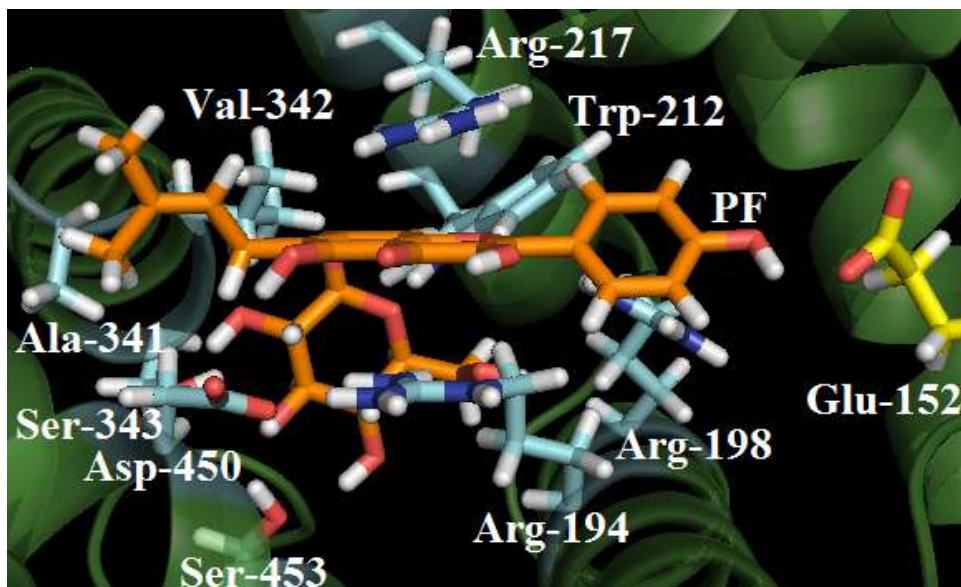


Figura 23 –Melhor resultado de pontuação (do inglês *pose*) para associação ASB:PF por ancoramento molecular (função *ChemPLP*) no subdomínio IIA. Carbono: laranja (PF), verde (ASB), azul (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul. O resíduo Glu-152 está representado em amarelo para indicar que é o único resíduo de aminoácido que interage comoceptor de ligação de hidrogênio (figuras geradas com o *software* PyMOL).

Tabela 8 – Resíduos de aminoácidos, tipos de interações intermoleculares e valores de distância das interações na associação ASB:PF no subdomínio IIA da proteína.

Resíduo de aminoácido	Interação	Doador/Aceptor	Distância (Å)
	Intermolecular	Ligação de hidrogênio	
Glu-152	Ligação de hidrogênio	Doador	3.40
Arg-194	Ligação de hidrogênio	Doador	3.30
Arg-198	Ligação de hidrogênio	Doador	3.30
Trp-212	Ligação de hidrogênio	Doador	2.20
Arg-217	Ligação de hidrogênio	Doador	3.40
Ala-341	Hidrofóbica	-	3.10
Val-342	Hidrofóbica	-	3.10
Ser-343	Ligação de hidrogênio	Doador	2.90
Asp-450	Ligação de hidrogênio	Aceptor	1.90
Ser-453	Ligação de hidrogênio	Doador	2.10

4.5 Interação entre Albumina Sérica Bovina (ASB) com lofirona B (LF-B)

4.5.1 Espectroscopia de Fluorescência

Como pode ser visto na Figura 24, não há mudanças significativas na região de emissão de fluorescência máxima da ASB livre após sucessivas adições de alíquotas de supressor (LF-B), demonstrando que a presença da lofirona B não altera o microambiente ao redor dos resíduos de aminoácidos da proteína [Silva *et al.* (2004) e Lou *et al.* (2016)].

A intensidade de emissão de fluorescência diminui como resultado de uma vasta variedade de processos que podem ocorrer por diferentes interações moleculares. Em geral supressão dinâmica está presente quando o fluoróforo excitado é desativado por contato com outra molécula, o supressor, sem qualquer alteração química nas moléculas durante este processo. No caso de supressão estática, uma associação não-fluorescente é formada entre o fluoróforo (ou a proteína de matriz na sua vizinhança) e o supressor [Trnková *et al.* (2010)]. Como pode ser visto na Tabela 9 e Figura 24, os valores K_{SV} aumentam com o aumento da temperatura. O aumento das concentrações de lofirona B provocam uma ligeira curvatura no gráfico de Stern-Volmer, indicando que o mecanismo dinâmico está ocorrendo. Por outro

lado, os valores de k_q (Tabela 9) são da ordem de 10^{13} L/mols, sendo maiores do que a constante de velocidade de difusão ($k_{diff} \approx 5,00 \times 10^9$ L/mols em água a 298 K) [Brune *et al.* (1993)], indicando que grande parte da supressão de fluorescência é provavelmente devido a associação do estado fundamental entre os resíduos de triptofano e a lofirona B (supressão de fluorescência estática) [Gentili *et al.* (2008) e Lin *et al.* (2009)]. Portanto, ambos os mecanismos de supressão estão ocorrendo na associação ASB:LF-B.

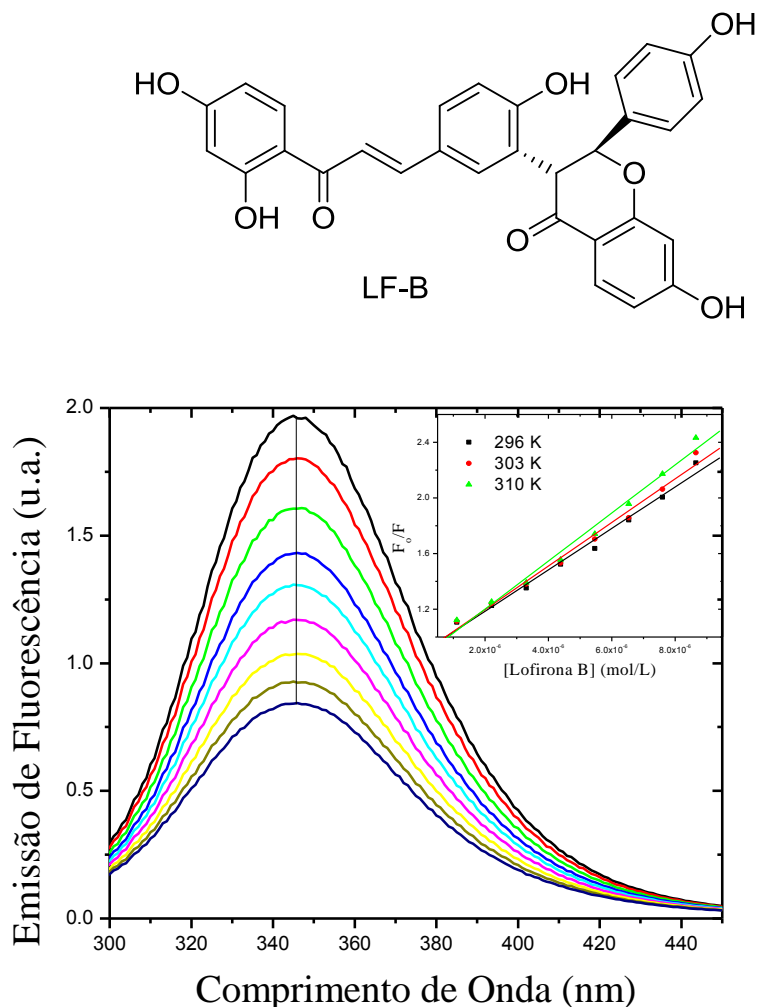


Figura 24 – Espectros de emissão de fluorescência dos fluoróforos internos da ASB e sua supressão pela adição da LF-B. ASB em solução tampão de PBS (pH=7,4). *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASB:LF-B a 296 K, 303 K e 310 K. $C_{ASB} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{LF-B} = 1,11; 2,21; 3,30; 4,39; 5,46; 6,54; 7,60; 8,66 \times 10^{-6}$ mol/L, $T = 296$ K e $\lambda_{exc} = 280$ nm.

Os valores calculados para constante de ligação de Stern-Volmer modificado (K_a) estão na ordem de 10^4 L/mol (Tabela 9, Figura 25), indicando uma interação moderada entre a albumina e a lofirona B [Tian *et al.* (2015) e Chaves *et al.* (2016b)]. Esta interação moderada é provavelmente devida ao alto volume estrutural do ligante que não favorece a sua ancoragem no interior da cavidade proteica, tal como será descrito nos resultados de

ancoramento molecular. Como pode ser visto na Tabela 9 os valores de K_a aumentam com o aumento da temperatura, o que indica que a estrutura da proteína pode acomodar melhor o ligante em 310 K do que em 296 K.

O número de sítios de ligação (n) obtidos a partir do tratamento de duplo logaritmo (Figura 26) é aproximadamente 1 (Tabela 9), sugerindo que há apenas uma principal cavidade proteica que interaja com a lofirona B [Wang, *et al.* (2016)].

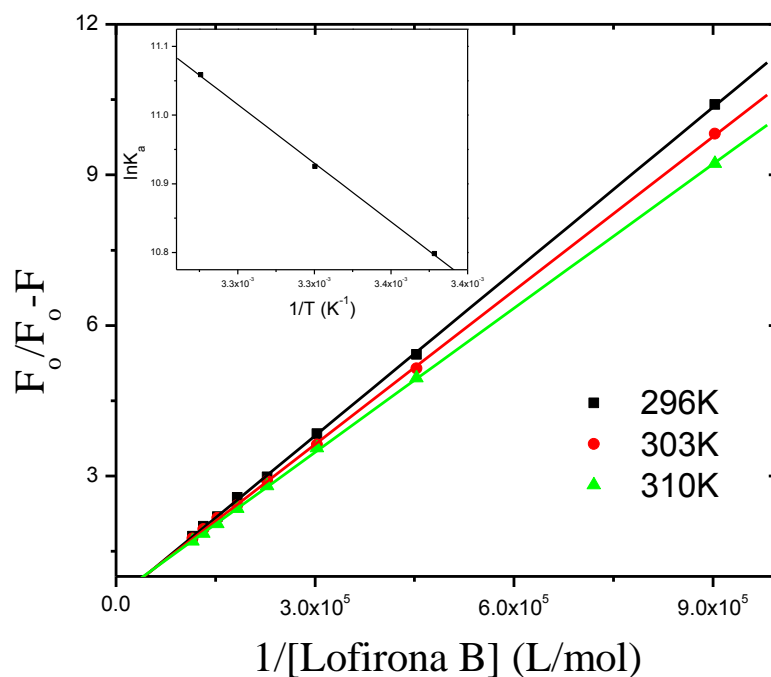


Figura 25 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para associação ASB:LF-B a 296 K, 303 K e 310 K. *Inset*: Gráfico de van't Hoff, a partir dos dados de Stern-Volmer modificado nas três temperaturas de estudo.

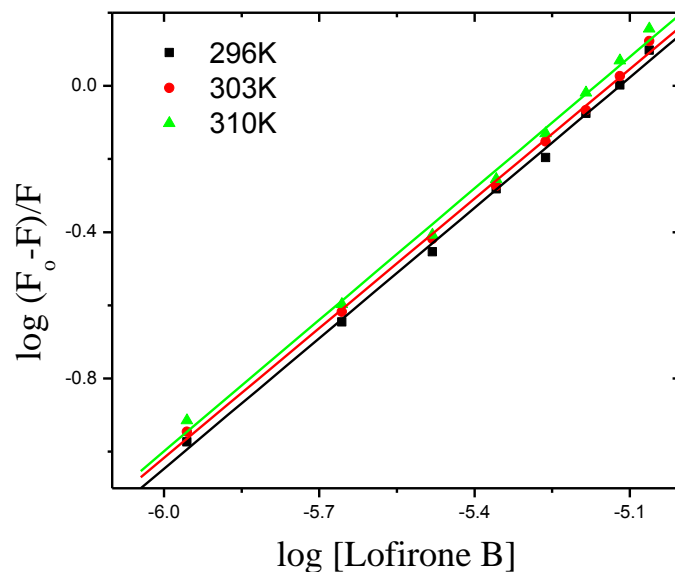


Figura 26 – Gráfico do $\log [(F_0-F)/F]$ vs. $\log [Q]$ para ASB:LF-B a 296 K, 303 K e 310 K.

Tabela 9 – Valores de K_{SV} , k_q , K_a e n da associação ASB:LF-B em 296 K, 303 K e 310 K.

T (K)	$K_{SV} \times 10^5$ (L/mol)	$k_q \times 10^{13}$ (L/mol.s)	r^2	$K_a \times 10^4$ (L/mol)	r^2	n	r^2
296	1,49±0,70	1,49	0,9847	4,89±0,02	0,9999	1,19±0,01	0,9966
303	1,57±0,74	1,57	0,9844	5,56±0,02	0,9998	1,18±0,01	0,9973
310	1,73±0,85	1,73	0,9833	6,35±0,02	0,9999	1,20±0,01	0,9949

O tratamento de van't Hoff foi usado para determinar a variação de entalpia e entropia no processo de ligação ASB:LF-B (*inset* da Figura 25). Os valores positivos para ΔH° e ΔS° são indicativos de que a ligação da lofirona B na proteína é impulsionada entropicamente e também de acordo com a Teoria de Ross e Subramanian [Ross *et al.* (1981)] tais valores indicam que ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas são as principais forças intermoleculares entre ASB e LF-B. Do ponto de vista da estrutura da água, um valor de ΔS° positivo é frequentemente considerado como evidência de interações hidrofóbicas, porque as moléculas de água que são dispostas de forma ordenada em torno do ligante e da proteína adquiram uma configuração mais aleatória após o processo de associação ASB:LF-B [Tian *et al.* (2015)]. Os valores negativos de ΔG° mostram a espontaneidade da ligação entre a albumina e a lofirona B.

Tabela 10 – Parâmetros termodinâmicos da associação ASB:LF-B em 296 K, 303 K e 310 K.

T	ΔH°	ΔS°	ΔG°	r^2
(K)	(kJ/mol)	(kJ/mol.K)	(kJ/mol)	
296	14,2±1,3	0,138	-26,6	0,9985
303	14,2±1,3	0,138	-27,6	0,9985
310	14,2±1,3	0,138	-28,6	0,9985

4.5.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)

A fim de verificar possíveis alterações na estrutura secundária de ASB após ligação com lofirona B, experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados a 310 K. Medições de CD realizadas na presença de diferentes concentrações de LF-B mostrou que a ligação a albumina provocou uma redução em ambas as bandas de absorção de ASB (Figura 27). A alteração da forma e posição no espectro CD indicam que o ligante causa uma mudança moderada na estrutura secundária da albumina [Varlan *et al.* (2010)]. Valores quantitativos a 208 nm mostram que a albumina inicialmente continha 59,1% de estrutura α -hélice e após a associação com sucessivas alíquotas de LF-B passou para 56,6%, 55,8%, 49,5% e 44,0%, na presença de concentrações de 1,11; 4,39; 6,54 e 8,66 x 10⁻⁶ mol/L de LF-B, respectivamente. Já a 222 nm, a albumina livre continha 58,8% de estrutura α -hélice, variando para 56,7%, 54,7%, 53,0% e 50,7%, com as mesmas concentrações de LF-B citadas anteriormente. Tais resultados indicam que o ligante causa alterações moderadas na estrutura secundária da albumina, contudo tais alterações não levam a mudanças tão significativas como uma desnaturação proteica [Varlan *et al.* (2010) e Khan *et al.* (2008)].

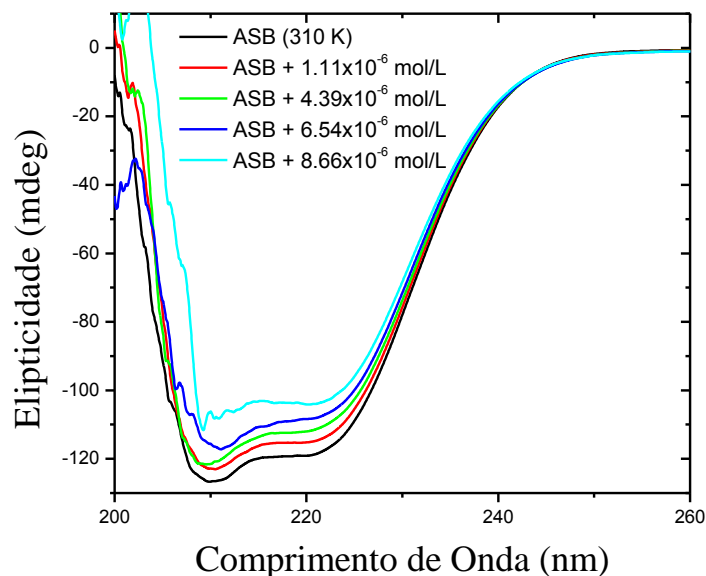


Figura 27 – Espectros de DC para ASB livre e ASB associada a LF-B em diferentes concentrações de ligante a 310 K. $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF-B} = 1,11; 4,39; 6,54$ e $8,66 \times 10^{-6}$ mol/L.

4.5.3 Modelagem Molecular

O enfoque dos cálculos computacionais está na identificação do principal sítio de ligação da ASB frente a LF-B, assim como identificar os principais resíduos de aminoácidos e suas interações intermoleculares com o ligante.

Como pode ser visto a partir dos estudos de supressão de fluorescência, o número de sítios de ligação é aproximadamente 1, portanto a lofirona B liga-se perto de apenas um dos fluoróforos presentes na estrutura de ASB (resíduo Trp-134 ou Trp-212). Os resultados de ancoramento molecular sugerem que a lofirona B é capaz de fazer uma melhor interação com o sítio do Trp-212 do que com o sítio do Trp-134 (pontuação de encaixe de 71,3 e 51,0, respectivamente). Apesar destas considerações, também foi observado que para a melhor solução obtida no local onde encontra-se o resíduo Trp-212, parte da estrutura da lofirona B (7-hidroxi-2-(4-hidroxifenil) croman-4-ona) continua a ser exposta ao meio aquoso ao invés de ser acomodada no interior do local de ligação (Figura 28A). Este resultado pode justificar os valores K_a experimentais que indicam apenas uma afinidade moderada de lofirona B para a albumina.

A partir dos resultados espectroscópicos há indicativos da existência de interações hidrofóbicas e ligação de hidrogênio como sendo as principais forças na associação entre

lofirona B e ASB. O acoplamento molecular mostrado na Figura 28B sugere que o resíduo Trp-212 interage hidrofobicamente *via t-stacking* com o anel 2,4-di-hidroxi-fenil da estrutura do ligante, a uma distância de 3,0 Å. No entanto, algumas ligações de hidrogênio também podem ser observadas: resíduos de Arg-198 e His-287 interagem através de ligações de hidrogênio com o anel 2,4-di-hidroxi-fenil da estrutura da lofirona B, com uma distância de 1,80 Å e 2,90 Å, respectivamente. Já o resíduo Lys-294 interage como um doador de ligação de hidrogênio para o grupo carbonila do anel da pirânico da lofirona B, a uma distância de 1,80 Å e o resíduo Lys-439 participa de ligação de hidrogênio com o grupo hidroxi-fenil da lofirona B, a uma distância de 2,70 Å.

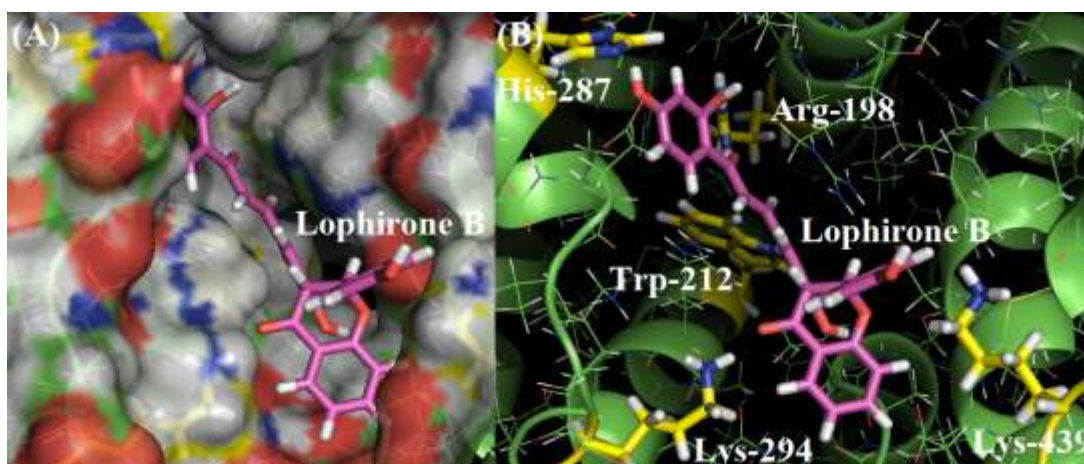


Figura 28 –(A) Representação da superfície molecular da ASB para o melhor resultado de ancoramento molecular para associação ASB:LF-B no subdomínio IIA (função *ChemPLP*). (B) Representação dos resíduos de aminoácidos participantes da interação ASB:LF-B no subdomínio IIA. Carbono: pink (LF-B), verde (ASB), amarelo (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul (figuras geradas com o *software* PyMOL).

4.6 Interação entre Albumina Sérica Bovina (ASB) com alcalóide plumerânico (PIA)

4.6.1 Espectroscopia de Fluorescência

A interação entre a albumina sérica bovina (ASB) e o alcalóide plumerânico ($2\beta,12\beta,19\alpha$)-1-[(*2E*)-3-fenilprop-2-enoil]aspidospermidin-21-oato de metila ou N^1 -cinamoil-12-metóxi-cilindrocaina (PIA) foi inicialmente estudada pela técnica de supressão de fluorescência da proteína. A Figura 29 mostra claramente que a intensidade de emissão de fluorescência da ASB diminui com a presença de sucessivas adições de PIA, indicando que a ligação do alcalóide ocorre próximo a um dos dois resíduos de triptofano da proteína (Trp-134 ou Trp-212). Além disso, um pequeno deslocamento para o vermelho (345-350 nm) é

observado com o aumento da concentração de PIA, o que sugere um aumento na hidrofobicidade do microambiente em torno do resíduo triptofano com a associação da PIA na cavidade [Topala *et al.* (2014)]. A partir do *inset* da Figura 29 é possível calcular o valor de K_{SV} , e dessa forma obter o valor de k_q . Como pode ser visto na Tabela 11, os valores de K_{SV} diminuem com o aumento da temperatura e os valores de k_q estão na ordem de 10^{13} L/mols, sendo maiores do que o valor da constante de velocidade de difusão ($k_{diff} \approx 5,00 \times 10^9$ L/mols em água a 298 K) [Brune *et al.* (1993)], indicando que o mecanismo mais provável de supressão de fluorescência é estático [Chaves *et al.* (2015)], *via* formação de uma associação no estado fundamental entre o fluoróforo e o supressor. Para confirmar esta hipótese, foram executadas experiências de fluorescência resolvida no tempo. O tempo de vida de fluorescência da ASB livre e ASB associada a PIA em três diferentes concentrações de supressor é praticamente o mesmo, variando de $5,90 \pm 0,20$ a $5,84 \pm 0,20$ ns. Esta é uma confirmação de que a supressão de fluorescência da ASB pela PIA é um processo estático [Mandal *et al.* (2010)].

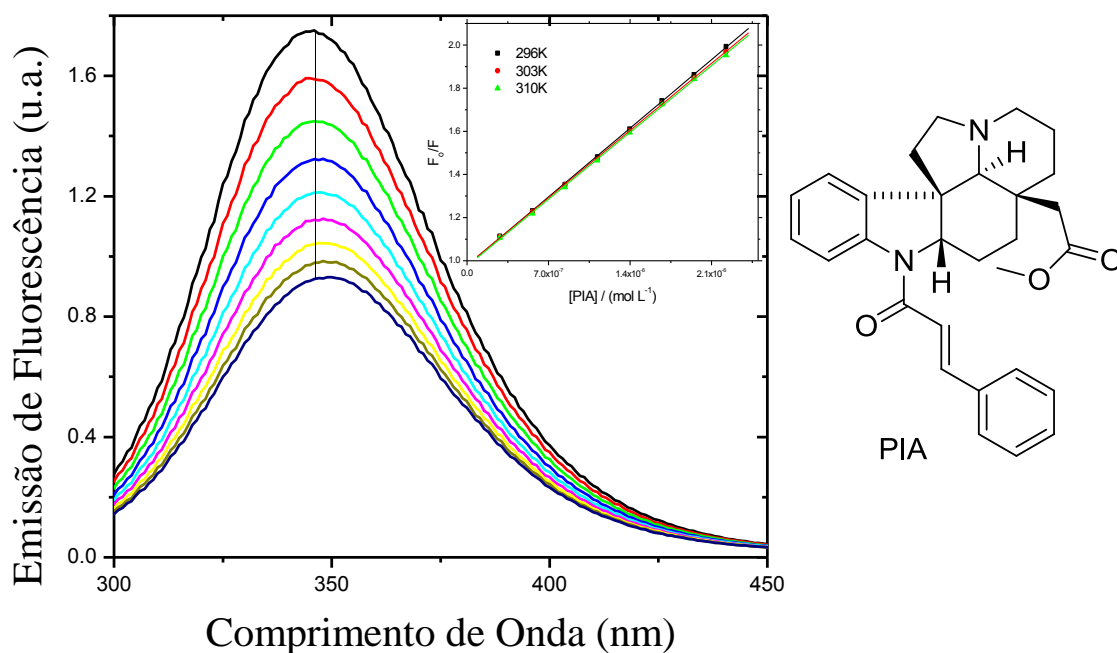


Figura 29 – Espectros de emissão de fluorescência dos fluoróforos internos da ASB e sua supressão pela adição de PIA. ASB em solução tampão de PBS (pH=7,4). *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASB:PIA a 296 K, 303 K e 310 K. $C_{ASB} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{PIA} = 0,28; 0,56; 0,84; 1,12; 1,40; 1,67; 1,95; 2,20 \times 10^{-6}$ mol/L, $T = 296$ K e $\lambda_{exc} = 280$ nm.

Os valores da constante de ligação (K_b) apresentados na Tabela 11, que são obtidos a partir dos gráficos da Figura 30, estão na gama de 10^5 - 10^6 Lmol⁻¹, o que indica uma forte

interação entre ASB e PIA [Varlan *et al.* (2010) e Shena *et al.* (2015)]. O aumento nos valores de K_b com o aumento da temperatura pode ser causado por uma ligeira expansão do sítio de ligação que pode acomodar mais moléculas de PIA em alta temperatura [Wang, *et al.* (2008)]. Como a estrutura da ASB apresenta dois resíduos diferentes de triptofano (Trp-134 e Trp-212), localizados em diferentes cavidades na estrutura de albumina, o número de sítios de ligação (n) foi calculado para saber se ambos ou apenas um destes locais é capaz de interagir com a molécula PIA. Como mostrado na Tabela 11, os valores de n em diferentes temperaturas ($n \approx 1,0$ a 296 K, 303 K e 310 K) indicam a existência de apenas um sítio de ligação principal na estrutura de ASB para PIA [Chaves *et al.* (2016b)].

Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir do *inset* da Figura 30 são apresentados na Tabela 11. A ligação de PIA a ASB é espontânea, como indicado pelos valores negativos de ΔG° , sendo acompanhados por uma variação positiva de entropia ($\Delta S^\circ > 0$). Portanto, o processo de ligação é conduzido entropicamente. Esta ligação envolve uma associação endotérmica como manifestado pelo valor positivo de ΔH° , o que é consistente com o aumento dos valores de K_b com o aumento da temperature [Suryawanshi *et al.* (2014)]. De acordo com a teoria de Ross e Subramanian, $\Delta H^\circ > 0$ e $\Delta S^\circ > 0$ sugerem ligação de hidrogênio e interação hidrofóbica como as principais forças de ligação na associação ASB: PIA [Ross *et al.* (1981)].

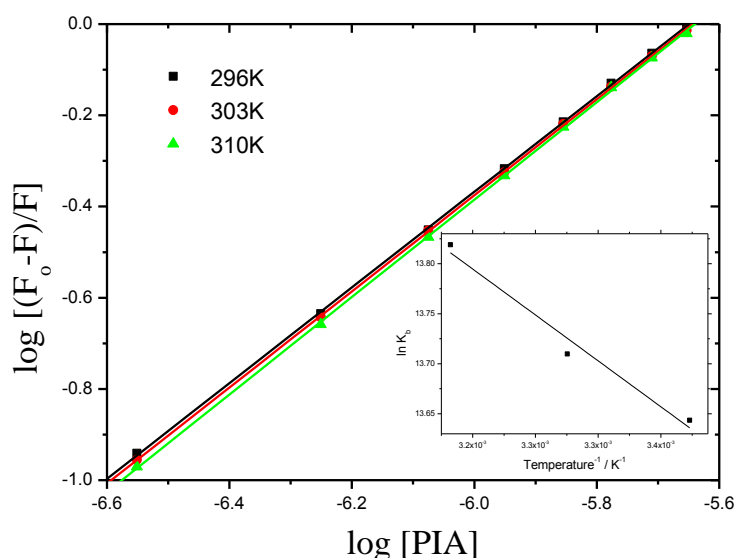


Figura 30 – Gráfico de duplo logaritmo para associação ASB:PF a 296 K, 303 K e 310 K. *Inset*: Gráfico de van't Hoff, a partir dos dados da constante de ligação (K_b) nas três temperaturas de estudo.

Tabela 11 – Valores de K_{SV} , k_q , K_b , n e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) da associação ASB:PIA em 296 K, 303 K e 310 K.

T (K)	$K_{SV} \times 10^5$ (L/mol)	$k_q \times 10^{13}$ (L/mol.s)	r^2	$K_b \times 10^6$ (L/mol)	n	r^2	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (kJ/mol.K)	ΔG° (kJ/mol)	r^2
296	4,55±0,03	4,55	0,9999	0,842	1,05±0,01	0,9999	9,54±1,10	0,146	-33,7	0,9580
303	4,45±0,02	4,45	0,9999	0,899	1,05±0,01	0,9999	9,54±1,10	0,146	-34,7	0,9580
310	4,43±0,04	4,43	0,9999	1,00	1,07±0,01	0,9999	9,54±1,10	0,146	-35,7	0,9580

O valor da integral de sobreposição (J) entre o espectro de emissão de fluorescência da ASB e o espectro de absorção da PIA (Figura 31) é $2,98 \times 10^{-14}$ L/mol cm^3 , dando $R_0 \approx 3,50$ nm, $E \approx 46\%$ e $r \approx 4,00$ nm. Uma vez que a distância entre ASB e PIA (r) está entre 2 nm e 8 nm, os valores obtidos estão em total concordância com a regra $0,5R_0 < r_0 < 1,5R_0$, portanto a transferência de energia da ASB para PIA deve ocorrer com alta probabilidade [Sarkar *et al.* (2013) e Shena *et al.* (2015)].

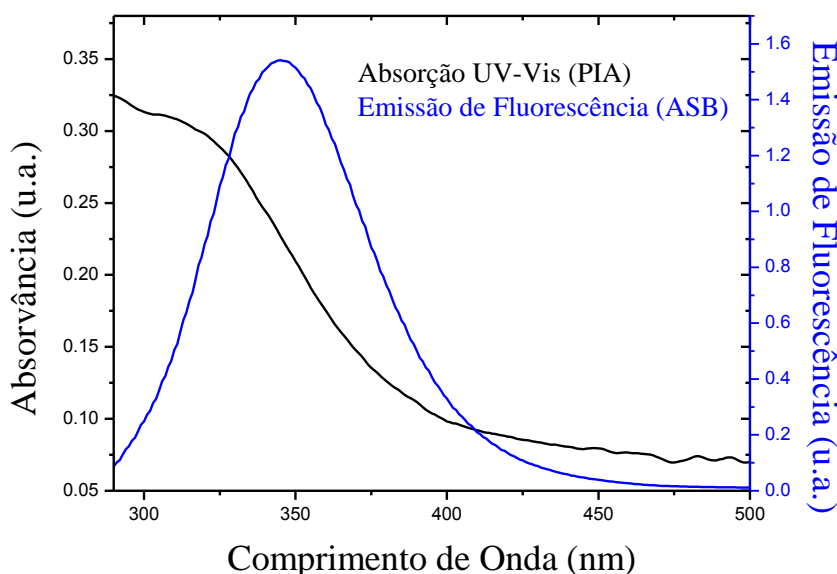


Figura 31 – Sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência da ASB e absorção do supressor PIA. $C_{ASB} = C_{PIA} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L a 310 K.

4.6.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)

Para identificar possíveis alterações estruturais na estrutura de α -hélice da ASB após a ligação com PIA, foram realizadas experiências de dicroísmo circular (CD), a 310 K, com a máxima concentração de PIA ($2,22 \times 10^{-6}$ mol/L) empregada nas análises de fluorescência. Como pode ser visto na Figura 32, o decréscimo na intensidade de absorção a 208 nm e 222

nm por adição de PIA, indica a desestabilização da estrutura helicoidal de ASB, o que sugere possíveis alterações na estrutura secundária da proteína [Zhang *et al.* (2013a)]. Quantitativamente, na ausência de PIA, a % α -hélice da estrutura secundária da ASB foi de aproximadamente 55,6% e 54,1% a 208 nm e 222 nm, respectivamente. Por outro lado, quando se adicionou o ligante PIA, estes valores passaram para 50,2% a 208 nm e 49,5% a 222 nm. A mudança conformacional foi de aproximadamente 5,4% e 4,6% em 208 nm e 222 nm, respectivamente, a 310 K, indicando apenas uma pequena mudança na estrutura secundária da proteína após a associação da PIA na ASB. Assim, essa ligação não causa alterações estruturais significativas, o que implica que a estrutura da proteína permanece como α -hélice, mesmo depois de se ligar ao composto biologicamente ativo [Zhang *et al.* (2012)].

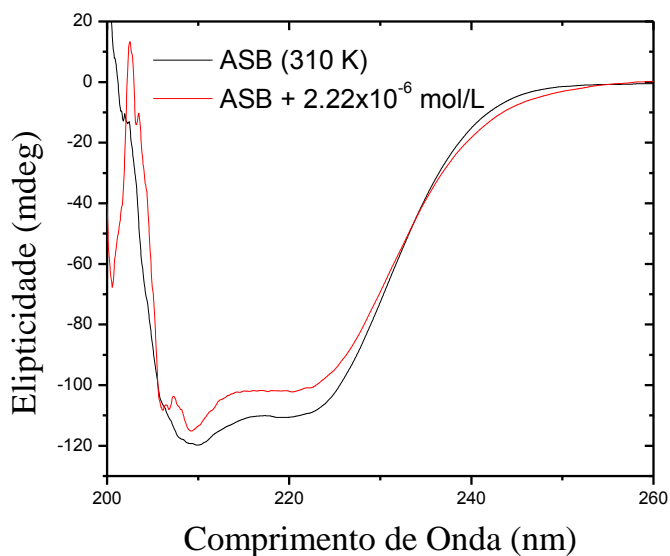


Figura 32 – Espectros de DC para ASB livre e ASB associada a PIA a 310 K. $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{PIA} = 2,22 \times 10^{-6}$ mol/L.

4.6.3 Modelagem Molecular

De modo a sugerir o sítio de ligação potencial da ASB para a molécula de PIA, bem como os principais resíduos de aminoácidos que interagem com o ligante, estudos de ancoramento molecular foram realizados.

Resultados da pontuação de ancoramento molecular sugerem uma interação mais favorável da PIA no subdomínio IIA, que contém o resíduo Trp-212 (pontuação de encaixe 66,3), do que no subdomínio IB (pontuação de encaixe 53,3). A Figura 33A representa a superfície molecular da ASB para a melhor pontuação de encaixe. Esta figura mostra que a

maior parte da estrutura da molécula PIA está acomodada no interior da cavidade proteica; isso pode explicar os elevados valores da constante de ligação obtidos nas experiências de supressão de fluorescência. A Figura 33B mostra a representação do melhor ancoramento para o alcalóide plumerânico PIA. Os resultados termodinâmicos experimentais indicam ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas como as principais forças intermoleculares que regem a associação ASB:PIA. Como pode ser observado na Figura 33B, os resultados de ancoramento molecular sugerem que o resíduo Trp-212 interage com o anel aromático da PIA por interação hidrofóbica, *via t-Stacking*, com uma distância de 2,30 Å, e o resíduo não polar Pro-446 interage com o outro anel aromático da estrutura de PIA, com uma distância de 1,50 Å. Por outro lado, ocorre ligação de hidrogênio entre um dos hidrogênios N-H do grupo guanidina do resíduo Arg-217 com o oxigênio da carbonila do grupo éster na estrutura da PIA, com uma distância de 2,00 Å. Por fim, o hidrogênio do resíduo NH da Val-342 forma uma ligação de hidrogênio com o oxigênio do grupo amida da estrutura da PIA.

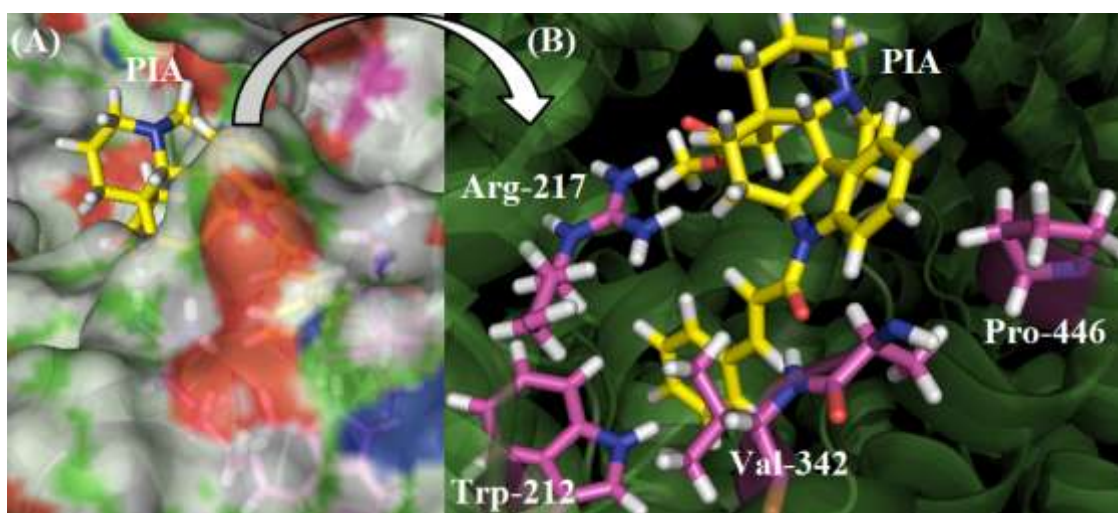


Figura 33 –(A) Representação da superfície molecular da ASB para o melhor resultado de ancoramento molecular para associação ASB:PIA no subdomínio IIA (função *ChemPLP*). (B) Representação dos resíduos de aminoácidos participantes da interação ASB:PIA no subdomínio IIA. Carbono: pink (PIA), verde (ASB), amarelo (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul (figuras geradas com o *software* PyMOL).

4.7 Interação entre Albumina Sérica Bovina (ASB) com α -lapachona (α -lap)

4.7.1 Espectroscopia de Fluorescência

A Figura 34 mostra a supressão de fluorescência do resíduo de triptofano da ASB ($C_{ASB} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) pela adição de alíquotas da solução de concentração conhecida de α -lap a 298 K, uma das três temperaturas empregadas nesta experiência (288 K; 293 K e 298

K). Este processo de supressão indica que a naftoquinona está localizado dentro da proteína e provavelmente ao lado de um dos resíduos de triptofano (Trp-134 ou Trp-212) [Liu *et al.* (2003)]. A ausência de mudanças significativas no máximo de emissão de fluorescência da ASB após as sucessivas adições de supressor é uma clara evidência de que a presença de α -lap não exerce qualquer influência sobre a polaridade do microambiente no interior da cavidade que contém o resíduo de triptofano [Tian *et al.* (2007)].

As constantes de velocidade de supressão ($k_q \approx 10^{12}$ L/mols, Tabela 12 e *inset* Figura 34) têm valores mais elevados do que a constante de velocidade de difusão ($k_{diff} \approx 5 \times 10^9$ L/mols em água a 298 K) [Brune *et al.* (1993)], indicando que o mecanismo provável de supressão de fluorescência é estático [Eftink *et al.* (1981), Tian *et al.* (2007) e Chaves *et al.* (2016c)]. Neste caso, pode ser esperada uma associação inicial não-fluorescente entre o estado fundamental do fluoróforo (resíduo triptofano na ASB) e o supressor. Conforme pode ser visto na Tabela 12 a pequena e irregular variação nos valores de K_{SV} com a temperatura não mostra uma tendência significativa.

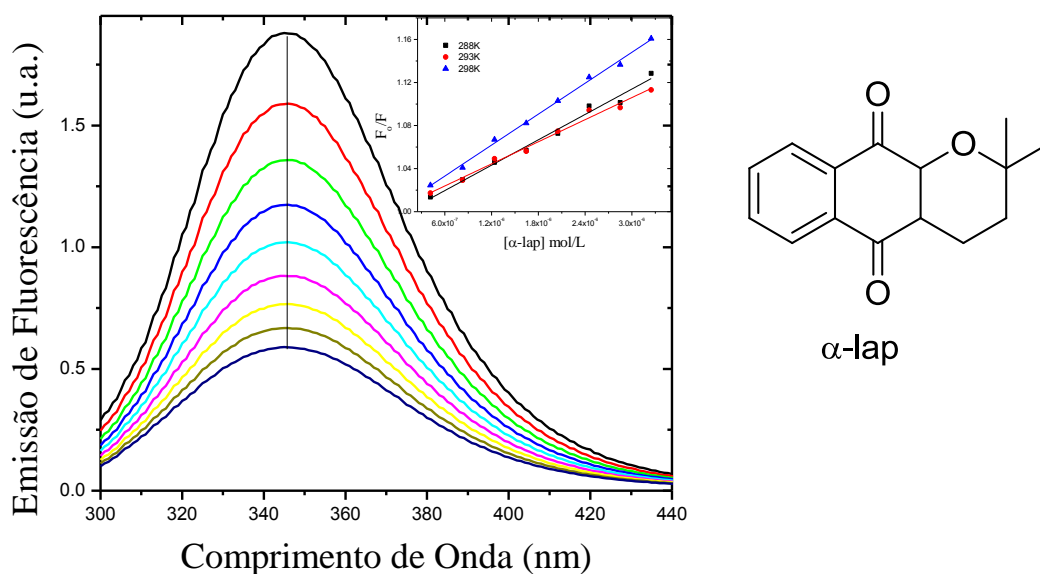


Figura 34 – Espectros de emissão de fluorescência dos fluoróforos internos da ASB e sua supressão pela adição de α -lap. ASB em solução tampão de PBS (pH=7,4) a 298 K. *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASB: α -lap a 288 K, 293 K e 298 K. $C_{ASB} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{\alpha-lap} = 0,42; 0,83; 1,24; 1,64; 2,05; 2,45; 2,85$ e $3,25 \times 10^{-6}$ mol/L, $T = 298$ K e $\lambda_{exc} = 280$ nm.

Os valores da constante de ligação de Stern-Volmer modificada (K_a) estão no intervalo de 10^4 - 10^5 L/mol (Tabela 12 e Figura 35), o que indica uma forte interação entre a albumina e o ligante α -lap [Satheshkumar *et al.* (2014) e Chaves *et al.* (2015)]. Os valores de constante de

ligação dependerão da carga e da estrutura do ligante α -lap, bem como da conformação e carga da ASB [Borissevitch *et al.* (1996)]. Como pode ser visto na Tabela 12 e Figura 36, os valores da constante de ligação (K_b) estão na ordem de 10^4 L/mol, comparáveis à gama de valores da constante de ligação de Stern-Volmer modificada (K_a). Em ambos os casos, não há nenhuma tendência consistente com a variação da temperatura. Os valores do número de sítios de ligação (n) foram de aproximadamente 1 em diferentes temperaturas (288 K, 293 K e 298 K), o que indica a existência de apenas um sítio de interação principal da ASB com a α -lap [Cheng *et al.* (2013)].

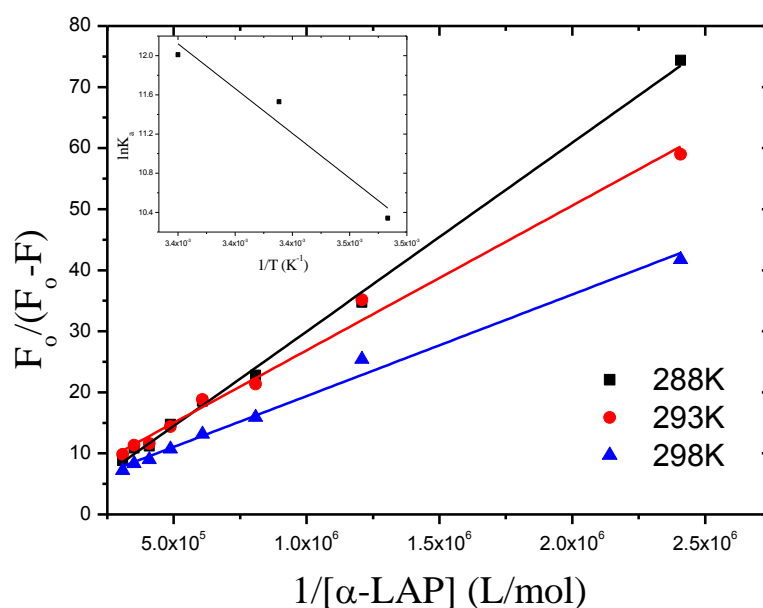


Figura 35 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para associação ASB: α -lap a 288 K, 293 K e 298 K. *Inset*: Gráfico de van't Hoff, a partir dos dados de Stern-Volmer modificado nas três temperaturas de estudo.

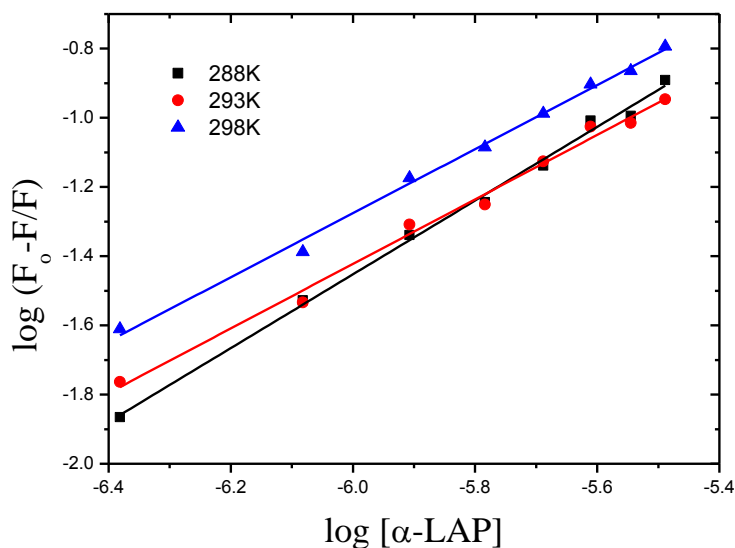


Figura 36 – Gráfico de duplo logaritmo para associação ASB: α -lap a 288 K, 293 K e 298 K.

Tabela 12 – Valores de K_{SV} , k_q , K_a , K_b e n da associação ASB: α -lap em 288 K, 293 K e 298 K.

T (K)	$K_{SV} \times 10^4$ (L/mol)	$k_q \times 10^{12}$ (L/mol.s)	r^2	$K_a \times 10^5$ (L/mol)	r^2	$K_b \times 10^4$ (L/mol)	n	r^2
288	$3,93 \pm 0,18$	3,93	0,9855	$0,310 \pm 0,10$	0,9975	8,80	$1,07 \pm 0,03$	0,9952
293	$3,42 \pm 0,16$	3,42	0,9854	$1,30 \pm 0,10$	0,9896	1,50	$0,93 \pm 0,03$	0,9905
298	$4,79 \pm 0,11$	4,79	0,9962	$1,60 \pm 0,10$	0,9896	1,90	$0,93 \pm 0,02$	0,9951

Os valores negativos de ΔG° mostrados na Tabela 13 são consistentes com ligação espontânea entre ASB e α -lap, ao passo que o valor positivo de ΔH° (Tabela 13 e *inset* Figura 35) indica que o processo de ligação é endotérmico e já o valor positivo de ΔS° (Tabela 13) mostra que a interação é principalmente devido à fatores hidrofóbicos, que pode estar relacionado com a influência de moléculas de hidratação [Ross *et al.* (1981)]. Existem duas contribuições possíveis que podem explicar o aumento da entropia: moléculas de hidratação podem ser expelidas da cavidade da proteína com a entrada da molécula α -lap e/ou a dessolvatação do ligante ao entrar na cavidade. Em ambos os casos há um aumento do número de micro-estados do sistema, o que implica em variação positiva de entropia [Chaves *et al.* (2015)].

Tabela 13 – Parâmetros termodinâmicos da associação ASB: α -lap em 288 K, 293 K e 298 K.

T	ΔH°	ΔS°	ΔG°	r^2
(K)	(kJ/mol)	(kJ/mol.K)	(kJ/mol)	
288	127 \pm 9,3	0,526	-24,9	0,9056
293	127 \pm 9,3	0,526	-27,6	0,9056
298	127 \pm 9,3	0,526	-30,2	0,9056

4.7.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)

Espectros de CD foram obtidos para avaliar as alterações na estrutura secundária da ASB após sucessivas adições de α -lap. A Figura 37 mostra os espectros de dicroísmo circular a 298 K de ASB livre ($1,00 \times 10^{-6}$ mol/L) e na presença de α -lap. Os sinais de dicroísmo circular são semelhantes, indicando que a naftoquinona não faz perturbações significativas na estrutura secundária da ASB [Yue *et al.* (2008a)]. A alteração quantitativa do conteúdo de % α -hélice, varia de 55,2% de albumina livre para 54,6%; 54,4%; 52,3% e 48,4% com adições de $0,39$; $0,79$; $1,57$ e $3,10 \times 10^{-5}$ mol/L de α -lap, respectivamente a 208 nm. A pequena variação na % α -hélice também foi vista a 222 nm (53,4% - ASB livre – para 53,0%, 52,7%, 52,1% e 51,8% nas mesmas concentrações de α -lap citadas anteriormente). Isso demonstra que a naftoquinona não ocasionar perturbações significativas na estrutura secundária da albumina [Li *et al.* (2009a)].

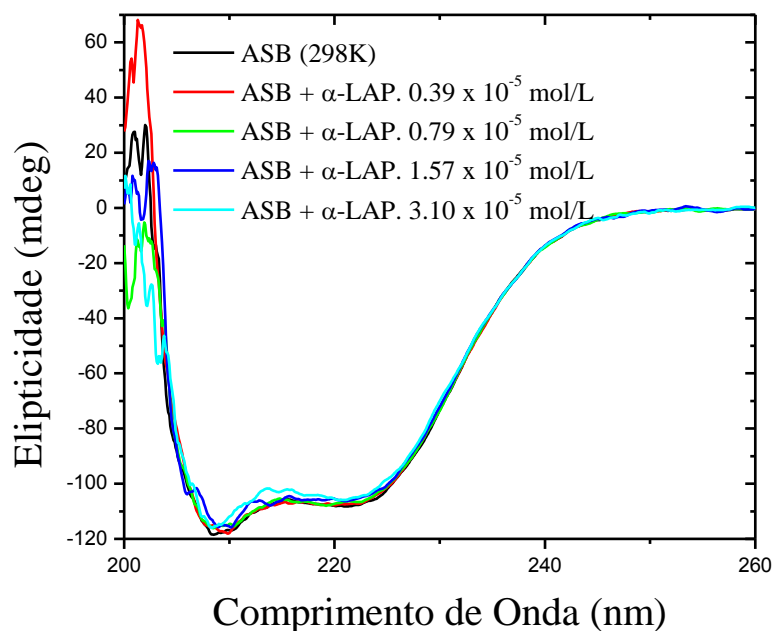


Figura 37 – Espectros de DC para ASB livre e ASB associada a α -lap em diferentes concentrações de ligante a 298 K. $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{\alpha\text{-lap}} = 0,39; 0,79; 1,57$ e $3,10 \times 10^{-5}$ mol/L.

4.7.3 Modelagem Molecular

Os resultados da ancoramento molecular sugerem que α -lap tem interações mais favoráveis com o sítio do Trp-212 (pontuação de encaixe 57,4) do que com o sítio do Trp-134 (pontuação de encaixe 44,9). Portanto, os resultados de ancoramento molecular sugerem claramente que α -lap está ligada no subdomínio IIA, onde o resíduo Trp-212 está localizado. A análise da interação entre ASB e α -lap neste local mostra que o ligante pode interagir através de ligações de hidrogênio com um resíduo de aminoácido de arginina e outro de tirosina (Figura 38). O resíduo Tyr-149 é capaz de formar uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonila da α -Lap mais próxima do oxigênio pirânico com uma distância entre doador e acceptor de ligação de 1,74 Å. O oxigênio do grupo pirânico da α -lap também pode interagir através de ligação de hidrogênio com o resíduo de Arg-259, com uma distância de 2,77 Å. Além destas interações, o ligante interage com ASB através de interações hidrofóbicas. Os resultados de ancoramento molecular sugerem que o anel aromático da naftoquinona faz uma interação *t-Stacking* com o resíduo Trp-212, a uma distância de 3,49 Å.

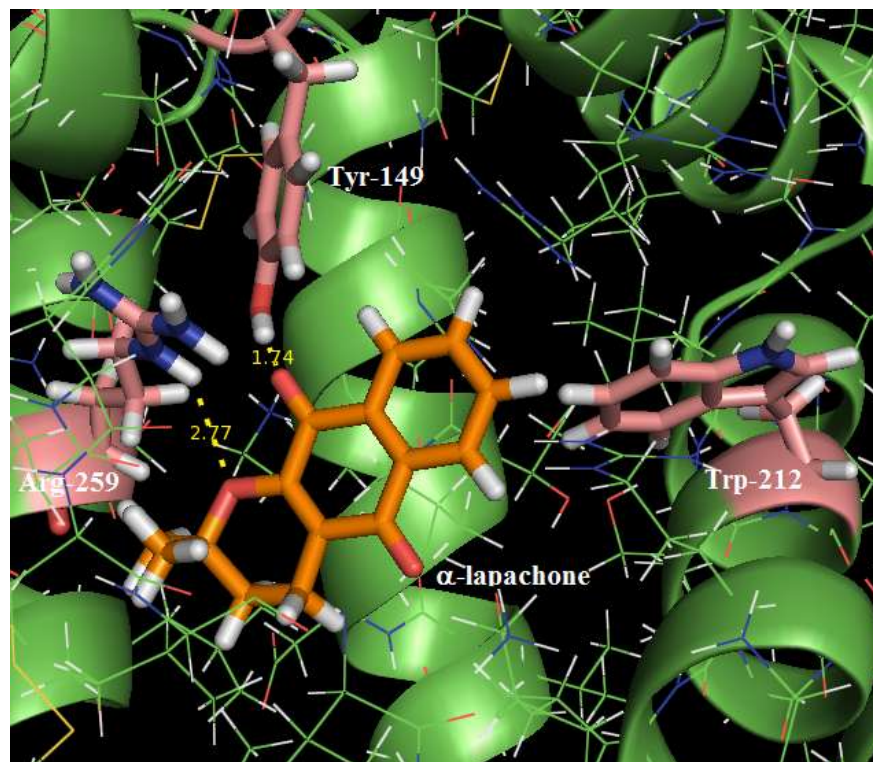


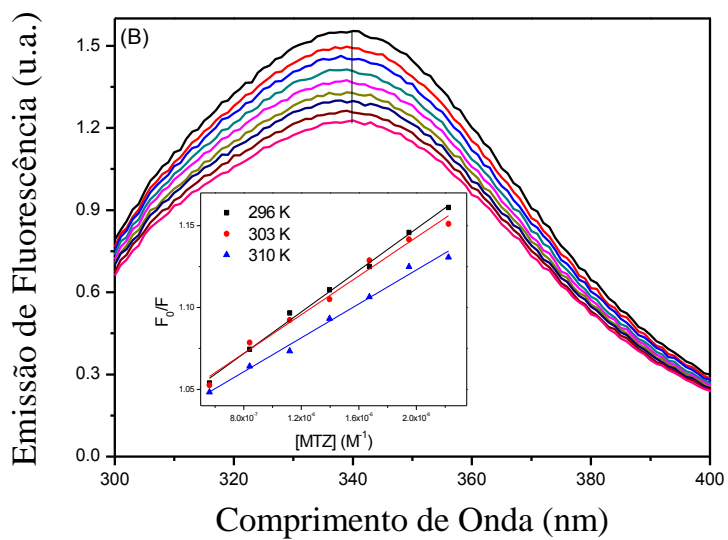
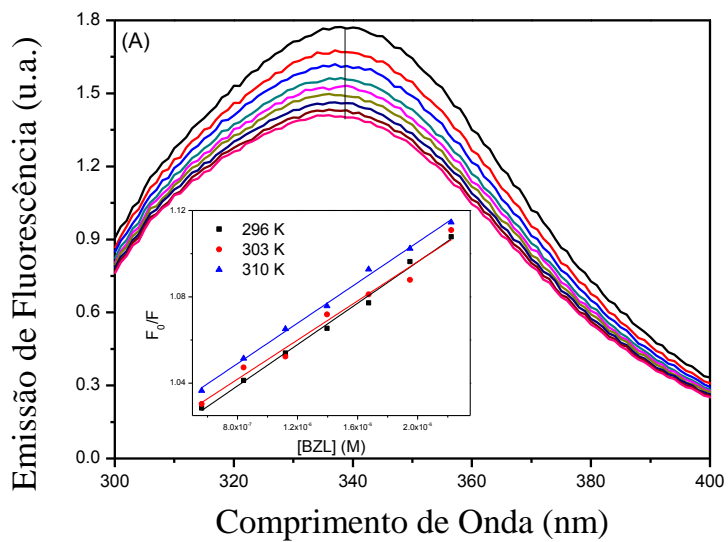
Figura 38 –Representação do melhor resultado de ancoramento molecular para associação ASB: α -lap no subdomínio IIA (função *ChemPLP*). Carbono: laranja (α -lap), verde (ASB), bege (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul (figuras geradas com o *software* PyMOL).

4.8 Interação entre Albumina Sérica Humana (ASH) com fármacos anti-chagásicos: benzonidazol (BZL), metronidazol (MTZ) e megalol (MZ)

4.8.1 Espectroscopia de Fluorescência

Como pode ser visto na Figura 39, a emissão de fluorescência do triptofano diminui com o aumento da concentração do supressor para todos os compostos utilizados neste estudo: BZL, MTZ e MZ. Além disso, não há indicação de um deslocamento significativo para o azul ou vermelho no máximo de emissão de fluorescência da albumina com as sucessivas adições de supressores. Estes resultados indicam claramente que BZL, MTZ e MZ estão localizados próximos ao resíduo de Trp-214 e que a ligação não tem qualquer efeito sobre a polaridade em torno do resíduo de triptofano. [Chaves *et al.* (2015)]. Como pode ser visto na Tabela 14, os valores de k_q são maiores do que a constante de velocidade de difusão ($k_{diff} \approx 5.0 \times 10^9$ L/mols em água a 298 K) [Brune *et al.* (1993)] indicando que a supressão de fluorescência ocorre principalmente através de um mecanismo estático, que envolve uma associação inicial no estado fundamental. [Zhang *et al.* (2013a)] Para MTZ, os valores de K_{SV} (Tabela 14)

foram inversamente correlacionados com a temperatura, enfatizando um mecanismo de supressão de fluorescência estático [Zhang *et al.* (2013b)]. Por outro lado, para BZL e MZ a pequena e irregular variação nos valores de K_{SV} com a temperatura não mostra uma tendência significativa [Chaves *et al.* (2016c)].



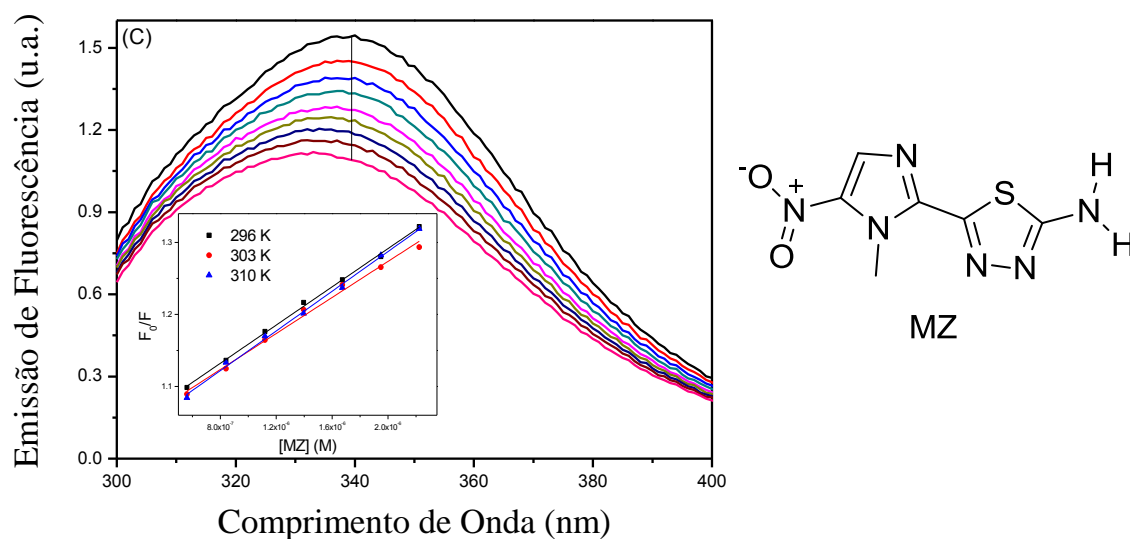


Figura 39 – Espectros de emissão de fluorescência da ASH e sua supressão pela adição de BZL (A), MTZ (B) e MZ (C). ASH em solução tampão de PBS (pH=7,4) a 310 K. *Inset*: Gráfico de Stern-Volmer para associação ASH:BZL (A), ASH:MTZ (B) e ASH:MZ (C) a 298 K, 303 K e 310 K. $C_{ASH} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{BZL} = C_{MTZ} = C_{MZ} = 0,56; 0,84; 1,12; 1,40; 1,67; 1,95; 2,22 \times 10^{-6}$ mol/L, pH = 7.4 e $\lambda_{exc} = 280$ nm.

Como pode ser visto na Tabela 14 e Figura 40, os valores da constante de ligação de Stern-Volmer modificado (K_a) estão na ordem de 10^5 L/mol, sugerindo uma elevada afinidade de ligação entre a albumina sérica e os antiparasitários BZL, MTZ e MZ. [Kalalbandi *et al.* (2015), Chaves *et al.* (2016a) e Jattinagoudar *et al.* (2016)] Para BZL e MTZ o aumento nos valores de K_a com o aumento da temperatura pode ser devido a uma ligeira expansão do sítio de ligação, que pode acomodar um maior número de pequenas moléculas a temperatura mais elevada [Chaves *et al.* (2016b)]. Por outro lado, para MZ a redução dos valores de K_a com o aumento de temperatura indica uma diminuição da estabilidade do complexo ASH:MZ a temperature elevada [Jattinagoudar *et al.* (2016)].

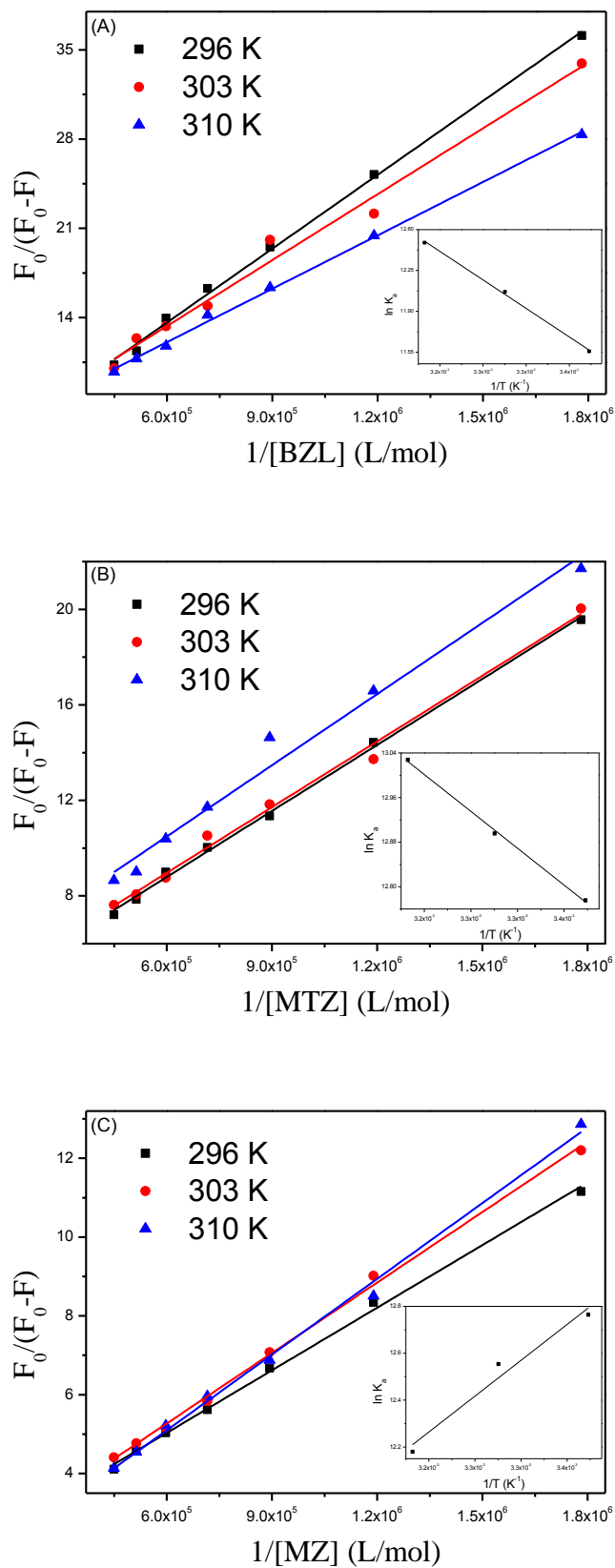


Figura 40 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para associação ASH:BZL (A), ASH:MTZ (B) e ASH:MZ (C) a 296 K, 303 K e 310 K. *Inset*: Gráfico de van't Hoff, a partir dos dados de Stern-Volmer modificado nas três temperaturas de estudo.

Tabela 14 – Valores de K_{SV} , k_q e K_a da associação ASH:BZL, ASH:MTZ e ASH:MZ em 296 K, 303 K e 310 K.

Amostra	T (K)	$K_{SV} \times 10^4$ (L/mol)	$k_q \times 10^{12}$ (L/mol.s)	r^2	$K_a \times 10^5$ (L/mol)	r^2
BZL	296	4,79±0,15	4,79	0,9942	1,04±0,97	0,9975
	303	4,53±0,30	4,53	0,9747	1,74±0,98	0,9828
	310	4,69±0,12	4,69	0,9963	2,65±0,97	0,9978
MZL	296	6,35±0,19	6,35	0,9948	3,53±0,97	0,9978
	303	5,91±0,32	5,91	0,9829	3,98±0,97	0,9916
	310	5,18±0,23	5,18	0,9886	4,55±0,98	0,9791
MZ	296	13,3±0,23	13,3	0,9982	3,50±0,97	0,9976
	303	12,5±0,48	12,5	0,9913	2,83±0,97	0,9975
	310	13,8±0,32	13,8	0,9967	1,95±0,97	0,9953

Ross e Subramanian caracterizaram os sinais dos parâmetros termodinâmicos, com vários tipos individuais de interação no processo de associação entre pequenas moléculas e proteínas [Li *et al.* (2015)] Como pode ser visto na Tabela 15 e *inset* da Figura 40, os valores de ΔH° e ΔS° são positivos para BZL e MTZ, indicando ligação de hidrogênio e interação hidrofóbica como as principais forças de ligação com ASH. Por outro lado, os valores de ΔH° negativo e ΔS° positivo para MZ sugerem ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas como as principais forças no processo de associação [Chaves *et al.* (2016b)]. Do ponto de vista da estrutura da água, a entropia positiva é frequentemente considerada como uma assinatura típica de interação hidrofoba, uma vez que as moléculas de água que estão dispostas de forma ordenada em torno do ligante e da proteína irão adquirir uma configuração mais aleatória após a associação proteína:ligante. O valor de entalpia negativa para MZ pode ser explicado quando as moléculas pequenas são parcialmente inseridas dentro de uma cavidade hidrofóbica da ASH formada por dobragem e torção da cadeia peptídica. Neste caso, a interação hidrofóbica entre a molécula e a cavidade MZ causaria um processo exotérmico [Sun *et al.* (2006) e Li *et al.* (2015)].

Tabela 15 – Valores dos parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) da associação ASH:BZL, ASH:MTZ e ASH:MZ em 296 K, 303 K e 310 K.

Amostra	T (K)	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (kJ/mol.K)	ΔG° (kJ/mol)	r^2
BZL	296	50,8±1,3	0,268	-28,5	0,9965
	303	50,8±1,3	0,268	-30,4	0,9965
	310	50,8±1,3	0,268	-32,3	0,9965
MTZ	296	13,7±1,2	0,153	-31,6	0,9965
	303	13,7±1,2	0,153	-32,7	0,9965
	310	13,7±1,2	0,153	-33,7	0,9965
MZ	296	-31,8±1,9	0,00104	-32,1	0,9400
	303	-31,8±1,9	0,00104	-32,1	0,9400
	310	-31,8±1,9	0,00104	-32,1	0,9400

4.8.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)

A fim de determinar possíveis perturbações na estrutura secundária da albumina após sua ligação com BZL, MTZ e MZ experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados com a máxima concentração de ligante utilizada nos estudos de supressão de fluorescência ($2,22 \times 10^{-6}$ mol/L), a 310 K. Como pode ser visto na Figura 41, há uma diminuição clara do sinal de CD com a adição de BZL, MTZ e MZ, indicando que existe uma perturbação na estrutura secundária da albumina após a associação dos ligantes [Manivel *et al.* (2012)]. No sinal mínimo de CD a 208 nm, observa-se diminuição da percentagem de α -hélice gradual, a partir de 63,5% em ASH livre para 61,0%, 61,8% e 61,5% com adição dos ligantes BZL, MTZ e MZ, respectivamente. Da mesma forma, em 222 nm a percentagem de α -hélice diminui gradualmente, de 59,8%, 60,0% e 60,3% em ASH livre para 58,5%, 59,2% e 59,3% com adição dos ligantes BZL, MTZ e MZ, respectivamente. Os resultados indicam uma ligeira perturbação estrutural na estrutura secundária da albumina após ligação com os nitroimidazóis, contudo tal ligação não afeta significativamente o conteúdo helicoidal da proteína [Matei *et al.* (2011)].

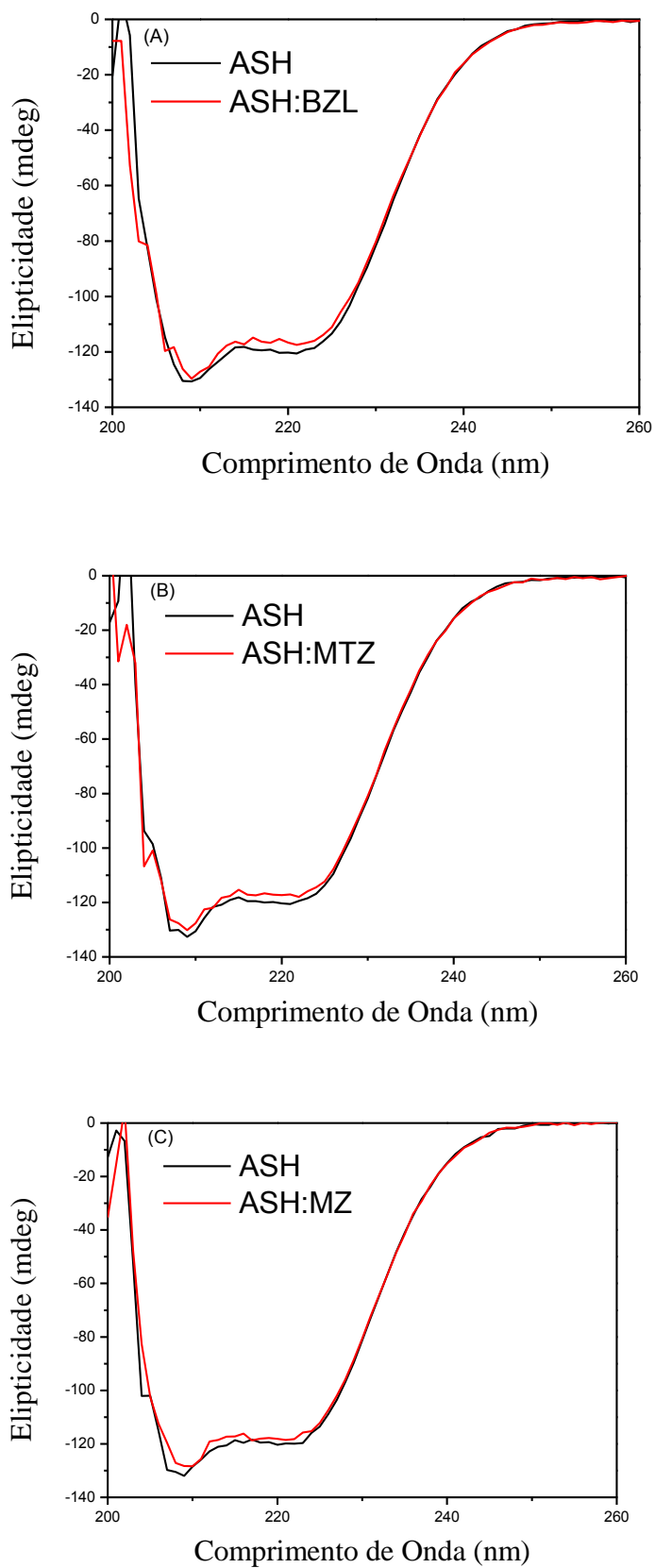


Figura 41 – Espectros de DC para ASH livre e ASH associada com BZL (A), MTZ (B) e MZ (C) em pH = 7,4 a 310 K. $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{BZL} = C_{MTZ} = C_{MZ} = 2,22 \times 10^{-6}$ mol/L.

4.8.3 Modelagem Molecular

A fim de oferecer mais detalhes sobre a interação entre os fármacos antiparasitários BZL, MTZ e MZ com ASH, foram realizados estudos de ancoramento molecular. Os resultados espectroscópicos discutidos acima mostraram que a adição de BZL, MTZ e MZ a uma solução de ASH suprime a fluorescência intrínseca da albumina, indicando que estes medicamentos antiparasitários estão localizados próximo ao fluoróforo - resíduo Trp-214. A cavidade em que este resíduo de aminoácido pode ser encontrada está localizada no subdomínio II, cuja região já foi descrita originalmente por Sudlow *et al.*, [Sudlow *et al.* (1976)] e por isso conhecida como sítio de Sudlow I.

Em acordo com os resultados experimentais, os dados de ancoramento molecular sugerem que os fármacos antiparasitários BZL, MTZ e MZ são capazes de ser ancorados na cavidade ao lado do resíduo Trp-214 que apresenta um perfil de interações favoráveis com os resíduos da cavidade. Como pode ser observado na Figura 42A, os resultados de ancoramento molecular sugerem que o anel aromático do BZL interage através de uma interação hidrofóbica com o resíduo Trp-214, a uma distância de 3,40 Å. O hidrogênio do grupo amida do resíduo Gln-220 interage através de ligação de hidrogênio com o nitrogênio do anel imidazólico (nitrogênio da posição três do anel aromático), com distância de 1,59 Å e o grupo guanidina do resíduo de Arg-221 é capaz de interagir também através de ligação de hidrogênio, mas com o oxigênio do grupo nitro da estrutura do BZL, a uma distância de 3,60 Å. O grupo carboxila do resíduo Glu-449 faz ligação de hidrogênio com o átomo de hidrogênio do grupo amina na estrutura do BZL, com distância de 2,13 Å.

Por outro lado, os resultados de ancoramento molecular para associação ASH:MTZ (Figura 42B) sugerem que o grupo amina do resíduo Trp-214 é capaz de fazer ligação de hidrogênio com o oxigênio do grupo nitro, a uma distância de 1,91 Å e o grupo hidroxila do resíduo Ser-453 com o nitrogênio do anel imidazólico (nitrogênio da posição três do anel aromático), a uma distância de 2,11 Å. Observa-se também que o grupo carboxila do resíduo Glu-449 faz ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila da estrutura do metronidazol a uma distância de 1,93 Å. Interações hidrofóbicas entre os resíduos de Leu-197 e Leu-480 com o grupo metila do ligante também foram detectados.

Finalmente, os resultados de ancoramento molecular para a interação ASH:MZ (Figura 42C) sugerem uma interação hidrofóbica (*t*-Stacking) entre o resíduo Trp-214 com o anel imidazólico do ligante a uma distância de 2,98 Å, bem como ligações de hidrogênio entre o grupo carboxila do resíduo Glu-449 e o grupo amina do ligante a uma distância de 2,78 Å.

Também foi detectada interação eletrostática entre o grupo nitro do MZ e o resíduo Lys-198, a uma distância de 1,94 Å.

As interações intermoleculares sugeridas pelos resultados de ancoramento molecular estão em total acordo com os parâmetros termodinâmicos obtidos através das análises espectroscópicas e discutidos de acordo com a teoria de Ross e Subramanian.

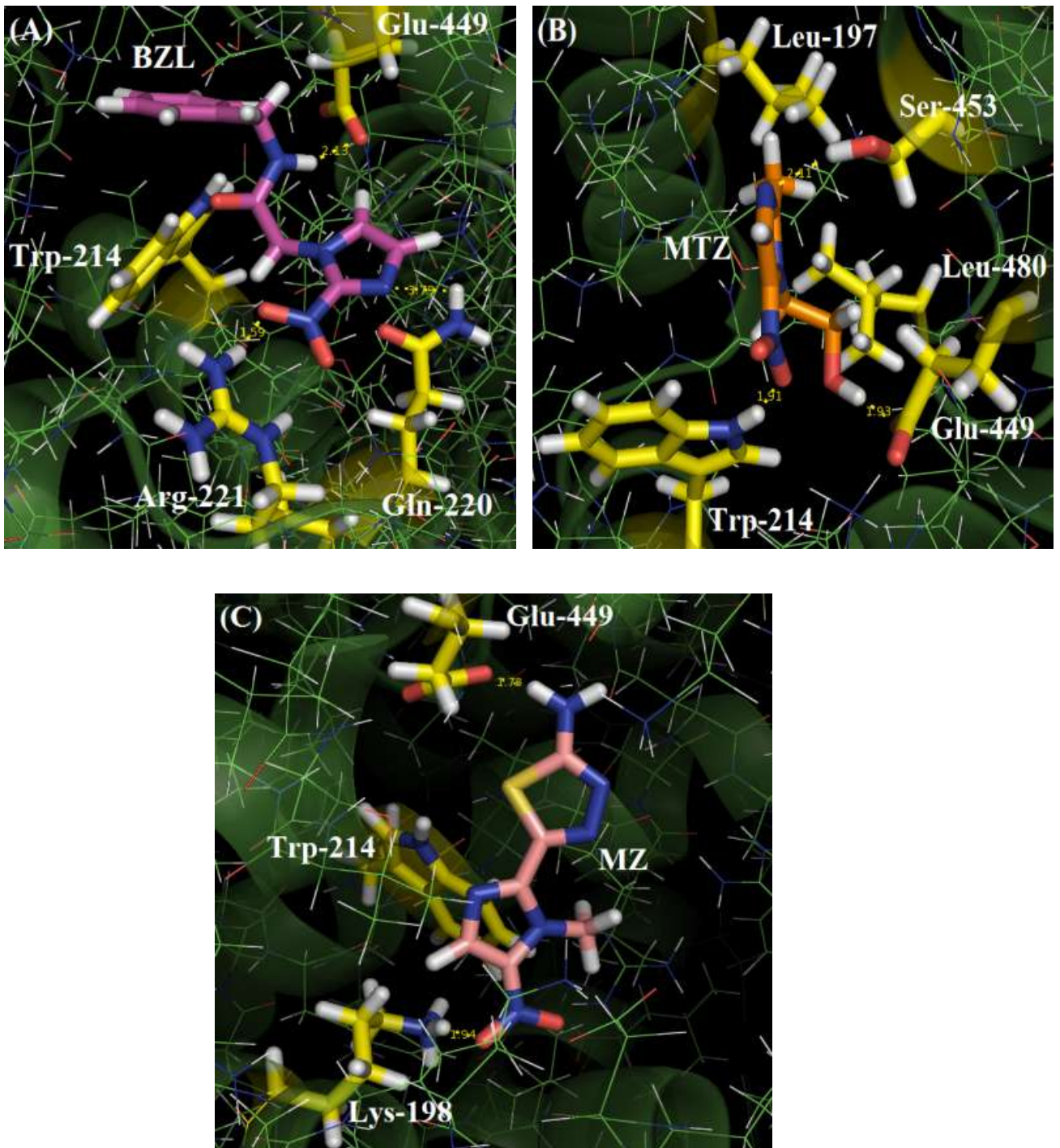


Figura 42 –(A) Representação do melhor resultado de ancoramento molecular para associação ASH:BZL no subdomínio IIA (função *ChemPLP*). (B) Representação do melhor resultado de ancoramento molecular para associação ASH:MTZ no subdomínio IIA (função *ChemPLP*). (C) Representação do melhor resultado de ancoramento molecular para associação ASH:MZ no subdomínio IIA (função *ChemPLP*). Carbono: pink (BZL), laranja (MTZ) e bege (MZ), verde (ASH), amarelo (resíduos de aminoácidos selecionados), hidrogênio: branco, oxigênio: vermelho e nitrogênio: azul (figuras geradas com o *software* PyMOL).

5. CONCLUSÕES

Os estudo por supressão de fluorescência no estado estacionário da interação entre albumina sérica humana (ASH) com 18-FP, BZL, MTZ e MZ e entre albumina sérica bovina (ASB) com *t*-DCTN, PF, LF-B, PIA e α -lap, mostraram que os valores das constantes de velocidade de supressão de fluorescência das albuminas pelos supressores (k_q) são maiores do que a velocidade de difusão em água ($k_{diff} \approx 5,00 \times 10^9$ L/mols), indicando que há formação de complexo no estado fundamental entre as albuminas com as moléculas supressoras.

Utilizou-se a técnica de espectroscopia de fluorescência com resolução temporal para confirmar tal conclusão para a amostra PIA: não houve variação significativa no tempo de vida da ASB livre, com sucessivas adições de supressor (PIA).

Para as amostras *t*-DCTN e LF-B além do mecanismo estático, também foi observado o mecanismo dinâmico, isso devido à curvatura nos gráficos de Stern-Volmer e nos valores das constantes de Stern-Volmer (K_{SV}).

Por último, para as amostras PF e PIA o cálculo das distâncias doador-acceptor (R_{DA}), baseado teoria da transferência ressonante de energia de Förster (FRET), mostra alta probabilidade de ocorrência deste mecanismo para a transferência de energia entre o fluoróforo e esses dois supressores.

Os valores termodinâmicos de energia livre de Gibbs, calculados para todas as amostras, estão em total acordo com a espontaneidade da associação. Parâmetros termodinâmicos de ΔH° e ΔS° forneceram indícios das principais interações intermoleculares na associação. As amostras 18-FP, *t*-DCTN, LF-B, PIA, α -lap, BZL e MTZ, por apresentarem $\Delta H^\circ > 0$ e $\Delta S^\circ > 0$, interagem *via* ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas com a albumina; já as amostras PF e MZ, por apresentarem $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ > 0$, interagem *via* ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas.

O cálculo do número de sítios de ligação para todas as amostras forneceu $n \approx 1,0$, indicando que há apenas uma cavidade principal da proteína onde ocorre a associação com as moléculas estudadas.

A associação albumina:supressor é:

- ◆ moderada para 18-FP, PF e LF-B,
- ◆ fraca para *t*-DCTN e

◆ forte para PIA, α -lap, BZL, MTZ e MZ,

conforme pode ser visto pela magnitude do valor das constantes de ligação (K_b para *t*-DCTN, PF, PIA e α -lap) e constantes de ligação de Stern-Volmer modificadas (K_a para 18-FP, PF e LF-B, α -lap, BZL, MTZ e MZ).

Estudos de dicroísmo circular, por intermédio da análise nos sinais de efeito Cotton negativo a 208 nm e 222 nm, mostram que não há perturbações significativas na estrutura secundária da albumina com a associação, em qualquer dos casos estudados.

Os cálculos teóricos por ancoramento molecular estão em total acordo com os resultados espectroscópicos.

◆ A amostra 18-FP na ASH interage *via* ligação de hidrogênio com os resíduos Lys-194, Lys-198, Arg-221 e Lys-443, sendo que sua porção apolar (grupo fitila) interage principalmente com os resíduos Leu-197, Phe-205, Ala-209, Trp-214, Leu-346 e Val-481.

◆ A amostra *t*-DCTN interage preferencialmente no subdomínio IB da ASB, por meio de interações hidrofóbicas com os resíduos Leu-24, Phe-36, Val-40 e Trp-134.

◆ Para a amostra PF o principal sítio de ligação com a ASB é o subdomínio IIA, onde a molécula biologicamente ativa interage *via* ligação de hidrogênio com Glu-152, Arg-194, Arg-198, Trp-212, Arg-217, Ser-343, Asp-450 e Ser-453, e também *via* interações hidrofóbicas com os resíduos Ala-341 e Val-342.

Os estudos por ancoramento molecular também sugerem que

◆ para as amostras LF-B, PIA e α -lap o subdomínio IIA da ASB é o preferencial para a interação ASB:LF-B, ASB:PIA e ASB: α -lap, sendo que a LF-B interage *via* ligação de hidrogênio com os resíduos Arg-198, His-287, Lys-294 e Lys-439, assim como *via t*-Stacking com o resíduo Trp-212.

Em contrapartida

◆ a amostra PIA interage *via* ligação de hidrogênio com os resíduos Arg-217 e Val-342 e *via* interação hidrofóbica com os resíduos Trp-212 e Pro-446.

◆ Já a α -lap interage *via* ligação de hidrogênio com os resíduos Tyr-149 e Arg-259 e *via* interação hidrofóbica com o resíduo Trp-212.

No caso dos nitroimidazóis a cavidade da ASH onde está localizado o fluoróforo interno da proteína consegue acomodar favoravelmente os fármacos antiparasitários estudados.

Resultados de ancoramento molecular sugerem que

- ◆ o BZL interage *via* ligação de hidrogênio com os resíduos Gln-220, Arg-221 e Glu-449 e já o resíduo Trp-214 *via* interação hidrofóbica.
- ◆ Para o MTZ os resíduos Trp-214, Glu-449 e Ser-453 fazem ligação de hidrogênio com o ligante e os resíduos Leu-197 e Leu-480 fazem interação hidrofóbica.
- ◆ Por último, o nitroimidazol MZ interage por ligação de hidrogênio com o resíduo Glu-449, interação hidrofóbica com Trp-214 e interação eletrostática com Lys-198.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Bujacz, *Acta Cryst.* **2012**, D68, 1278.
- A. Satheshkumar, K.P. Elango, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, 130, 337.
- Ajiboye, T.O.; Yakubu, M.T.; Oladiji, A.T. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2014a**, 28, 558.
- Ajiboye, T.O.; Yakubu, M.T.; Oladiji, A.T. *J. Evid. Based Complementary Altern.* **2014b**, 19, 20.
- Ajiboye, T.O.; Yakubu, M.T.; Oladiji, A.T. *Pharm. Biol.* **2016**, 3, 1.
- Almagro, L.; Fernández-Pérez, F.; Pedreño, M. A. *Molecules* **2015**, 20, 2973.
- Alves, G. M. “Desenvolvimento de cápsula gelatinosa mole de β -lapachona para terapias antineoplásicas em humanos”, Tese de Doutorado, UFPE, **2004**.
- Amorim, A. P. O.; Carvalho-Jr, A. R.; Castro, R. N.; Lopes, N. P.; Oliveira, M. C. C.; Carvalho, M. G. *Food Chem.* **2014a**, 160, 204.
- Amorim, A.P.; Oliveira, M.C.C.; Esteves, A.S.; Carvalho, M.G.; Gattas, C.R. Avaliação da atividade antitumoral de *Talinum triangulare* Leach. In 7° Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais e o 2° Simpósio Iberoamericano de Investigação em Câncer, Ilhéus-BA, Ilhéus, Brasil, Outubro **2014b**; 79.
- Amorim, A.P.O.; Amorim, T.A.; Oliveira, M.C.C.; Echevarria, A. *Antioxidants* **2013**, 3, 90.
- Angenot, L.; Dubois, M.; Ginion, C.; van Dorsser, W.; Dresse, A.; *Arch Int Pharmacodyn Ther.* **1975**, 215, 246.
- Asche, C.; *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**, 5, 449.
- Bakkialakshmi, S.; Chandrakala, D. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, 88, 2.
- Belatik, A.; Hotchandani, S.; Bariyanga, J.; Tajmir-Riahi, H. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 48, 114.
- Ben Dror, S.; Bronshtein, I.; Garini, Y.; O’Neal, W.G.; Jacobi, P.A.; Ehrenberg, B. *J. Photochem. Photobiol.* **2009**, 8, 354.
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. J.; Stryer, L. *Bioquímica*, 6° ed., Guanabara Koogan, 2008.
- Bern, C. N. *Engl. J. Med.* **2015**, 373, 456.
- Bernardes, B. O. “*Alguns derivados da beta-lapachona*”. Dissertação de mestrado, UFRRJ, Seropédica, **2001**.
- Bernardes, B. O. “*Síntese de novos derivados do lapachol, alfa e beta-lapachona, explorando o sistema quinônico*”, Tese de doutorado, UFRRJ, Seropédica, **2012**.

Bhattacharya, A. A.; Curry, S.; Franks, N. P. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 38731.

Bhattacharya, B.; Nakka, S.; Guruprasad, L.; Samanta, A. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, 113, 2143.

Bi, S.; Yan, L.; Pang, B.; Wang, Y. *J. Lumin.* **2012**, 132, 132.

Bia, S.; Dinga, L.; Tiana, Y.; Songa, D.; Zhoua, X.; Liua, X.; Zhang, H. *J. Mol. Struct.* **2004**, 703, 37.

Borissevitch, I.E.; Tominaga, T.T.; Imasato, H.; Tabak, M. *J. Lumin.* **1996**, 69, 65.

Brumark, A.; Cadenas, E.; *Free Radic. Bio. Med.* **1989**, 7, 435.

Brune, D.; Kim, S. *Biophysics.* **1993**, 90, 3835.

Campos, L. *Entender a Bioquímica*, 5° ed., Escolar editora, **2008**.

Carter, D.; Ho, J.X.; *Adv. Protein Chem.* **1994**, 45, 153.

Carvalho, J. C. T.; Silva, M. F. C.; Maciel, M. A. M.; Da Cunha Pinto, A.; Nunes, D. S.; Lima, R. M.; Bastos, J. K.; Sarti, S. *J. Planta Med.* **1996**, 62, 402.

Chauvière, G.; Bouteille, B.; Enanga, B.; de Albuquerque, C.; Croft, S. L.; Dumas, M.; Périé, J. *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 427.

Chaves, O. A.; Jesus, C. S. H.; Cruz, P. F.; Sant'Anna, C. M. R.; Brito, R. M. M.; Serpa, C. *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2016a**, 169, 175.

Chaves, O. A.; Amorim, A. P. O.; Castro, L. H. E.; Sant'Anna, C. M. R.; de Oliveira, M. C. C.; Cesarin-Sobrinho, D.; Netto-Ferreira, J. C.; Ferreira, A. B. B. *Molecules.* **2015**, 20, 19526.

Chaves, O. A.; Schaeffer, E.; Sant'Anna, C. M. R.; Netto-Ferreira, J. C.; Cesarin-Sobrinho, D.; Ferreira, A. B. B. *Mediterr. J. Chem.*, **2016b**, 5, 331.

Chaves, O. A.; Soares, B. A.; Maciel, M. A. M.; Sant'Anna, C. M. R.; Netto-Ferreira, J. C.; Cesarin-Sobrinho, D.; Ferreira, A. B. B.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2016c**, in press.

Cheng, X. X.; Lui, Y.; Zhou, B.; Xiao, X-H.; Liu, Y.; *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2009**, 72, 922.

Cheng, Z.; Liu, R.; Jiang, X. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol.* **2013**, 115, 92.

Chinnathambi, S.; Velmurugan, D.; Hanagata, N.; Aruna, P. R.; Ganesan, S. *J. Lumin.* **2014**, 151, 1.

Cui, F. L.; Qin, L. X., Gui-Sheng Zhang, G. S.; Yao, X. J.; Du, J.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, 42, 221.

Curry, S. X-ray crystallography of albumin, in Human Serum Albumin - New Insights on its Structural Dynamics, Functional Impacts and Pharmaceutical Applications, Ed. M. Otagiri, p. 1-29 (Chapter 1), Sojo Univ. Pub., Kumamoto, **2011**.

Daniel, J.F.S.; Alves, C.C.F.; Grivicich, I.; Rocha, A.B.; de Carvalho, M.G. *Indian J. Pharmacol.* **2007**, 39, 184.

Daniel; J.F.S.; de Carvalho, M.G.; Cardoso, R.S.; Agra, M.F.; Eberlin, M.N.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, 16, 634.

de Carvalho, M.G.; Suzart, L.R.; Cavattia, L.C.; Kaplan, M.A.C. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, 19, 1423.

de Moura, K. C. G.; Emery, F. S.; Neves-Pinto, C.; Pinto, M. C. F. R.; Dantas, A. P.; Salomão, K.; de Castro, S. L.; Pinto, A. V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, 12, 325.

Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3902.

Di Stasi, L. C.; Hiruma, C. A.; Guimaraes, E. M.; Santos, C. M. *Fitoterapia.* **1994**, 65, 529.

Eftink, M. R.; Ghiron, C. A. *Analytical Bioanal. Chem.* **1981**, 114, 199.

Ekpo, A.; Eseyin, O.; Kalu, N.; Jackson, O.; Edoho, E.J. *J. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, 3, 300.

El-Najjar, N.; Gali-Muhtasib, H.; Ketola, R. A.; Vuorela, P.; Urtti, A.; Vuorela, H.; *Phytochemistry* **2011**, 10, 353.

Fasano, M.; Curry, S.; Terreno, E.; Galliano, M.; Fanali, G.; Narciso, P.; Notari, S.; Ascenzi, P. *IUBMB Life.* **2005**, 57, 787.

Fasman, G.D. *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. Plenum Press, New York, **1996**.

Ferraz, P. A. L.; de Abreu, F. C.; Pinto, A. V.; Glezer, V.; Tonholo, J.; Goulart, M. O. F.; *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 507, 275.

Fidelis, Q.C.; Castro, R.N.; Guilhon, G.M.S.P.; Rodrigues, S.T.; Salles, C.M.C.; Salles, J.B.; de Carvalho, M.G. *Molecules* **2012**, 17, 7989.

Fidelis, Q.C.; Ribeiro, T.A.N.; Araújo, M.F.; de Carvalho, M.G. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2014**, 24, 1.

Figueiredo, I. M.; Marsaioli, A. J. *Quím. Nova.* **2007**, 30, 1597.

Filho, J. M. N.; de Melo C. P.; Santos-Magalhães, N. S.; Rosilio, V.; Maciel, M. A. M.; Andrade, C. A. S. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* **2010**, 358, 42.

Förster, T.. *Ann. Phys. Leipzig*. **1948** 2, 55.

Garnier, S.; Wolfebder, J. L.; Nianga, M.; Stoeckli-Evans, H.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry*. **1996**, 42, 1315.

Gentili, P.L.; Ortica, F.; Favaro, G. *J. Phys. Chem. B*. **2008**, 112, 16793.

Giovannetti, R., 1st ed.; Uddin, J., Ed.; *InTech Europe*: Rijeka, Croatia, Volume 1, pp. 87–108, **2012**.

Grynberg, N. F.; Echevarria, A.; Lima, J. E.; Pamplona, S. S. R.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. *M. Planta Med.* **1999**, 65, 687.

Guimarães, H. A.; Braz-Filho, R.; Vieira, I. J. C. *Molecules* **2012**, 17, 3025.

Guimarães, H. A.; Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R.; Crotti, A. E. M.; Almeida, V. S.; de Paula, R.C.; *Helv. Chim. Acta*. **2013**, 96, 1793.

Guo, X.; Han, X.; Tong, J.; Guo, C.; Yang, W.; Zhu, J.; Fu, B. *J. Mol. Struct.* **2010**, 966, 129.

Han, X.-L.; Tian, F.-F.; Ge, Y.-S.; Jiang, F.-L.; Lai, L.; Li, D.-W.; Yu, Q.-L.; Wang, J.; Lin, C.; Liu, Y. *J. Photochem. Photobiol. B* **2012**, 109, 1.

He, X.M.; Carter, D.C. Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin. *Nature* **1992**, 358, 209.

He, Y.; Wang, Y.; Tang, L.; Liu, H.; Chen, W.; Zheng, Z.; Zou, G. *J. Fluoresc.* **2008**, 18, 433.

Hecht, E. *Optics*. 3rd Ed., Addison Wesley Longman, Massachusetts, **1998**.

Heywood, V.H.; Flowering Plants of the World, Oxford University Press: London, **1978**, p. 82.

Hiruma-Lima, C. A.; Spadari-Bratfisch, R. C.; Grassi-Kassisse, D. M.; Souza Brito, A. R. M. *Planta Med.* **1999**, 65, 325.

Holtz, K. M.; Rockwell, S.; Tomasz, M.; *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 5029.

Hu, Y. J.; Liu, Y.; Zhao, R. M.; Dong, J. X.; Qu, S. S. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2006**, 179, 324.

Hu, Y.-J.; Wang, Y.; Ou-Yang, Y.; Zhou, J.; Liu, Y. *J. Lumin.* **2010**, 130, 1394.

Jattinagoudar, L.; Meti, M.; Nandibewoor, S.; Chimatadar, S. *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2016**, 152, 164.

Jones, G; Willett, P.; Glen, R.C. Leach A.R.; Taylor, R. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 727.

Kaewamatawong, R.; Likhitwitayawuid, K.; Ruangrunsi, N.; Takayama, H.; Kitajima, M.; Aimi, N. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1027.

Kalalbandi, V. K. A.; Seetharamappa, J. *Med. Chem. Comm.*, **2015**, 6, 1942.

Kelly, S. M.; Tess, T. J.; Price, N. C. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1751, 119.

Khan, S. N.; Islam, B.; Yennamalli, R.; Sultan, A.; Subbarao, N.; Khan, A. U. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, 35, 371.

Kohda, H.; Yamoaka, Y.; Morinaga, S.; Ishak, M.; Darise, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40, 2557.

Korb, O.; Stütze, T.; Exner, T. E. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49, 84.

Kropf, S.P.; Azevedo, N.; Ferreira, L.O. *Revista Ciência e Saúde Coletiva*, **2000**, 5, 347.

Kuriyan, J.; Konforti, B.; Wemmer, D. *The Molecules of Life - Physical and Chemical Principles*. 1^a Ed., **2012**.

Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 1st ed.; Springer: New York, NY, USA **2006**.

Lapenda, T. L.; Morais, W. A.; Almeida, F. J.; Ferraz, M. S.; Lira, M. C.; Santos, N. P.; Maciel, M. A.; Santos-Magalhães, N. S. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2013**, 3, 499.

Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 3^a Ed., Sarvier, São Paulo, **2002**.

Li, D.; Ji, B.; Sun, H. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol.* **2009a**, 73, 35.

Li, Q.; Seeger, S. *Sens. Actuators B Chem.* **2009b**, 139, 118.

Li, X.; Hao, Y. *J. Mol. Struct.* **2015**, 1091, 109.

Li, Y.; He, W. Y.; Dong, Y. M.; Sheng, F. L.; Hu, Z. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 1431.

Lin, H.; Lan, J.; Guan, M.; Sheng, F.; Zhang, H. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2009**, 73, 936.

Lin, V. J.; Koenig, J. L. *Biopolymers*. **1976**, 15, 203.

Liu, J.; Tian, J. N.; Zhang, J.; Hu, Z.; Chen, X. *Anal Bioanal Chem.* **2003**, 376, 864.

Liu, Y.; Qin, C.; Hou, F.; Xie, M. X. *Acta Chim. Sinica* **2009**, 67, 629.

Lopes, M. S.; Júnior, P. A. S.; Lopes, A. G. F.; Yoshida, M. I.; da Silva, T. H. A.; Romanha, A. J.; Alves, R. J.; de Oliveira, R. B. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2011**, 106, 1055.

Lou, K.; Zhu, Z.; Zhang, H.; Wang, Y.; Wang, X.; Cao, J. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, 243, 54.

Lovell, S. C.; Word, J. M.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *Proteins* **2000**, 40, 389.

Luo, S.; Zhang, E.; Su, Y.; Cheng, T.; Shi, C. A. *Biomaterials* **2011**, 32, 7127.

M.G. de Carvalho, L.R. Suzart, L.C. Cavattia, M.A.C. Kaplan, *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, 19, 1423.

Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Arruda, A. C.; Pamplona, S. G. S. R.; Vanderlinde, F. A.; Lapa, A. J.; Echevarria, A.; Grynberg, N. F.; Cólus, I. M. S.; Farias, R. A. F.; Costa, A. M. L.; Rao, V. S. N.; *J. Ethnopharmacol.* **2000**, 70, 41.

Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Brabo, S. N.; Da Silva, M. N. *Phytochemistry.* **1998**, 49, 823.

Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J.; Chruszcz, M.; Minor, W.; *Mol Immunol.*, **2012**, 52, 174.

Mandal, G.; Bardhan, M.; Ganguly, T.; *Colloids Surf. B* **2010**, 81, 178.

Mandeville, J. S.; Froehlich, E.; Tajmir-Riahi, H. A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, 49, 468.

Manivel, A.; Anandan, S. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **2012**, 395, 38.

Matei, I.; Hillebrand, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2010**, 51, 768.

Matei, I.; Ionescu, S.; Hillebrand, M. *J. Lumin.*, **2011**, 131, 1629.

Messenger, L. A.; Miles, M. A.; Bern, C. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2015**, 13, 995.

Möller, M.; Denicola, A. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2002**, 30, 175.

Moriyama, Y.; Ohta, D.; Hachiya, K.; Mitsui, Y.; Takeda, K.; *J. Protein Chem.* **1996**, 15, 265.

Nair, M. S. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2015**, 149, 58.

Ofusori, D.A.; Adelakun, A.E.; Ayoka, A.O.; Oluwayinka, O.P.; Omotoso, E.O.; Odukoya, S.A.; Adeyemi, D.O. *J. Neurol. Sci.* **2008**, 25, 239.

Oliveira, M.C.; de Carvalho, M.G.; Grynberg, N.F.; Brioso, P.S. *Planta Med.* **2005**, 71, 561.

Oliveira, V. B.; Freitas, M. S. M.; Mathias, L.; Braz-Filho, R.; Vieira, I. J. C. *Rev. Bras. Plantas Med.* **2009**, 11, 92.

Paal, K.; Shkarupin, A.; Beckford, L. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 1323.

Paul, B. K.; Samanta, A.; Guchhait, N.; *J. Phys. Chem. B.* **2010**, 114, 6183.

Peng, X.; Yu, J.; Yu, Q.; Bian, H.; Huang, F.; Liang, H. *J. Fluoresc.* **2015**, 22, 511.

Pereira, M. M.; Jácome, R. L. R. P.; Alcântara, A. F. C.; Alves, R. B.; Raslan, D. S. *Quim. Nova.* **2007**, 30, 970.

Peters T. Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry*, New York: Academic Press, 37, **1985**.

Pinto, C. N.; Dantas, A. P.; de Moura, K. C. G.; Emery, F. S.; Polequevitch, P. F.; Pinto, M. C. F. R.; de Castro, S. L.; Pinto, A. V.; *Arzneimittel-Forsch.* **2000**, 50, 1120.

Poli, P.; de Mello, M. A.; Buschini, A.; Mortara, R. A.; de Albuquerque, C. N.; da Silva, S.; Rossi, C.; Araújo, T. M.; Zucchi, D. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, 64, 1617.

- Quiquard, E. L. J. *Acta Amazonica*. **2003**, 33, 93.
- Rajendiran, N.; Thulasidhasan J. *Lumin*. **2016**, 17, 1.
- Ribeiro, A. M.; “*Estudo espectroscópico da interação entre flavonóides e albumina sérica bovina (ASB)*”. Tese de Doutorado,UFRRJ, Seropédica, **2010**.
- Rodrigues, M.I.A.; Furlan, A. Estudo Morfológico da Superfície das Sementes de Portulacaceae através da Microscopia Eletrônica de Varredura. In 54° Congresso Nacional de Botânica 3ª Reunião Amazônica de Botânica, Amazônia-UNAMA, Manaus, Brasil, Setembro **2003**; 65.
- Rodriguez, J. A.; Hiruma-Lima, C. A.; Souza Brito, A. R. M. *Hum. Exp. Toxicol*. **2004**, 23, 455.
- Rogozea, A.; Matei, I.; Turcu, I. M.; Ionita, G.; Sahini, V. E.; Salifoglou, A. *J. Phys. Chem. B*. **2012**, 116, 14245.
- Ross, P.D.; Subramanian, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. *Biochemistry*. **1981**, 20, 3096.
- Salas, C.; Tapia, R. A.; Ciudad, K.; Armstrong, V.; Orellana, M.; Kemmerling, U.; Ferreira, J.; Maya, J. D.; Morello, A.; *Bioorg. Med. Chem*. **2008**, 16, 671.
- Santos, F. V.; Silva Vieira dos Santos, V. J.; Farias, M. J.; Mesquita, S. D. F. P.; Maciel, M. A.; Pinto, A. D. C.; Cólus, I. M. D. S. *Biologia (Bratisl)*. **2008**, 63, 327.
- Sarkar, M.; Paul, S. S.; Mukherjea, K. K.; *J. Lumin*. **2013**, 142, 220.
- Sastre, C.; Six nouvelles espèces d’Ouratea (Ochnaceae) des Guyanes. *Adansonia ser.* **2007**, 3, 85.
- Satheshkumar, A.; Elango, K. P. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol*. **2014**, 130, 337.
- Shao, X.; Ai, N.; Xu, D.; Fan, X. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc*. **2016**, 161, 1.
- Shaw, A. K.; Pal, S. K. *J. Photochem. Photobiol B: Biol*. **2008**, 90, 69.
- Shena, G.-F.; Liua, T.-T.; Wanga, Q.; Jianga, M.; Shi, J.-H.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. **2015**, 153, 380.
- Shi, J.-H.; Chen, J.; Wang, J.; Zhu, Y.-Y.; Wang, Q. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol*. **2015**, 149, 630.
- Shikanai-Yasuda, M.A.; Lopes, M.H.; Tolezano, J.E. *Quím. Nova*. **1990**, 32, 70.
- Silva, D.; Cortez, C.M.; Louro, S.R.W. *Braz. J. Med. Biol. Res*. **2004**, 37, 963.
- Silva, M. N.; de Souza, M. C. B. V.; Ferreira, V. F.; *Quim. Nova*. **2003**, 26, 407.

Silva, R. M.; Oliveira, F. A.; Cunha, K. M. A.; Maia, J. L.; Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Nascimento, N. R. F.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N. *Vascul. Pharmacol.* **2005**, 43, 11.

Silva, R. M.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N.; Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, 53, 535.

Soares, M. C. P. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* **2004**, 37, 96.

Stagliano, K. W.; Emadi, A.; Lu, Z.; Malinakova, H. C. Twenter, B.; Yu, M.; Holland, L. E.; Rom, A. M.; Harwood, J. S.; Amin, R.; Johnson, A.; Yves, P.; *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 5651.

Stan, D.; Matei, I.; Mihaileseu, C; Savin, M.; Matache, M; Hillebrand, M.; Baci, I.; *Mol.* **2009**, 14, 1614.

Stryer, L. *Biochemistry*. 4th. Ed., W. H. Freeman and Company, New York, EUA, **1995**.

Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1976**, 12, 1052.

Sulkowska, A. *J. Mol. Struct.* **2002**, 616, 227.

Sun, D. Z.; Li, L.; Qiu, X. M.; Liu, F.; Yin, B. L. *Int. J. Pharm.* **2006**, 316, 7.

Suryawanshi, V. D.; Walekar, L. S.; Gore, A. H.; Anbhule, P. V.; Kolekar G. B.; *J. Pharm. Anal.* **2014**, 6, 56.

Takehara, K.; Yuri, K.; Shirasawa, M.; Yamasaki, S.; Yamada, S. *Anal. Sci.* **2009**, 25, 115.

Tian, J.; Liu, X.; Zhao, Y.; Zhao, S. *J. Lumin.* **2007**, 22, 446.

Tian, J.N.; Liu, J.; Hu, Z.D.; Chen, X.G. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 4124.

Tian, Z.-Y.; Song, L.-N.; Zhao, Y.; Zang, F.-L.; Zhao, Z.-H.; Chen, N.-H.; Xu, X.-J.; Wang, C.-J. *Molecules.* **2015**, 20, 16491.

Tih, R.G.; Sondengam, B.L.; Martina, M.T.; Bodo, B. *Phytochemistry* **1989**, 5, 1557.

Timaseff, S.N. Thermodynamics of Protein Interactions, In Proteins of Biological Fluids, 1st ed.; Peeters, H., Ed.; Oxford Pergamon Press: Oxford, UK, **1972**; Volume 1, pp. 511–519.

Topala, T.; Bodoki, A.; Oprean, L.; Oprean, R.; *Clujul Med.* **2014**, 87, 215.

Trnková, L.; Boušová, I.; Kubíček, V.; Dršata, J. *Nat. Sci.* **2010**, 2, 563.

Tunç, S.; Duman, O.; Soylu, İ.; Bozoğlan, B. K. *J. Lumin.* **2014**, 151, 22.

Turro, N. J; *Molecular Photochemistry*; Benjamin-Cummings Pub. Co.; **1978**.

Van Den Berg, M. E.; Plantas Medicinai na Amazônia- Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático; Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA, Brasil, **1993**.

Varlan, A.; Hillebrand, M. *Molecules* **2010**, 15, 3905.

Voet, D; Voet, J. G.; Pratt, C. W. Fundamentos de Bioquímica – A Vida em Nível Molecular, 2°ed., Porto Alegre:Artmed, **2008**.

Wang, N.; Ye, L.; Zhao, B. Q.; Yu, J. X.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2008**, 41, 589.

Wang, Q.; Liu, X.; Su, M.; Shi, Z.; Sun, H, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol.* 2015, 136, 321.

Wang, Q.; Liu, X.; Su, M.; Shi, Z.; Sun, H. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol.* **2015**, 136, 321.

Wang, Q.; Ma, X.; He, J.; Sun, Q.; Li, Y.; Li, H. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol.* **2016**, 53, 612.

Wang, T.; Zhao, Z.; Wei, B.; Zhang, L.; Ji, L. *J. Mol. Struct.* **2010**, 970, 128.

Wang, Y. Li.; Xia, R.; *Scien. Hortic.* **2010**, 125, 116.

Wardell, M.; Wang, Z.; Ho, J.X.; Robert, J.; Ruker, F.; Ruble, J.; Carter, D.C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 291, 913.

Woody, R.W. *Meth. Enzymol.* **1995**, 246, 34.

Xia, Y.; Zhu, Q.; Jun K. Y.; Wang, J.; Gao, X. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, 48, 918.

Xie, M. X.; Xu, X. Y.; Wang, Y. D. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, 1724, 215.

Yan, C.; Kepa, J. K.; Siegel, D.; *Mol. Pharmacol.* **2008**, 74, 1657.

Yuan, J. L.; Lv, Z.; Liu, Z. G.; Hu, Z.; Zou, G. L. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2007**, 191, 104.

Yue, Y.; Zhang, Y.; Li, Y.; Zhu, J.; Qin, J.; Chen, X.; *J. Luminesc.* **2008a**, 128, 513.

Yue, Y.; Zhang, Y.; Qin, J.; Chen, X. *J. Mol. Struct.* **2008b**, 888, 25.

Zani, C. L.; Chiari, E.; Krettli, A. U.; Murtaa, S. M. F.; Cunninghamc, M. L.; Fairlambc, A. H.; Romanha, A.; *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 2185.

Zhang, G.; Ma, Y.; Wang, L.; Zhang, Y.; Zhou, J. *Food Chem.* **2012**, 133, 264.

Zhang, J.; Chen, L.; Zeng, B.; Kang, Q.; Dai, L. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013a**, 105, 74.

Zhang, S. -L.; Chang, J. -J.; Damu, G. L. V.; Geng, R. -X.; Zhou, C. -H.; *Med. Chem. Comm.*, **2013b**, 4, 839.

Zhang, X.; Li, L.; Xu, Z.; Liang, Z.; Su, J.; Huang, J.; Li, B.; *PLoS ONE* **2013c**, 8, 1.

Zhang, Y. Z.; Zhou, B.; Zhang, X. P.; Huang, P.; Li, C. H.; Liu, Y. *J. Hazard. Mater.* **2009**, 163, 1345.

Zhang, Y.; Li, Y.; Dong, L.; Li, J. Z.; He, W. Y.; Chen, X. G.; Hu, Z. D. *J. Mol. Struct.* **2008**, 875, 1.

Zhang, Y.; Shi, S.; Sun, X.; Xiong, X.; Peng, M. *J. Inorg. Biochem.*, **2011**, 105, 1529.

7. ANEXO

Relação de trabalhos científicos realizados pelo aluno OTÁVIO AUGUSTO CHAVES durante o curso de Mestrado em Química pela UFRRJ, sendo bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Número Processo: 154693/2014-6)

Resumos Publicados em Anais de Eventos:

*CHAVES, O. A.; Sant'Anna, C. M. R.; Cesarin-Sobrinho, D.; Netto-Ferreira, J. C.; Ferreira, A. B. B. *Molecular modeling as a tool to understand the interaction between bovine serum albumin and small molecules*. In: XV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2016, Rio de Janeiro. Anais da XV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2016.

*Pinto, D. C. A.; CHAVES, O. A.; Netto-Ferreira, J. C.; Sant'Anna, C. M. R.; Castro, R. N.; Lima, M. E. F. *Binding of mangiferin to human serum albumin (HSA): spectroscopic and computational studies*. In: XV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2016, Rio de Janeiro. Anais do XV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2016.

*CHAVES, O. A.; Ferreira, R. C.; Pereira, A.; Amorim, A. P. O.; Oliveira, M. C. C.; Cesarin-Sobrinho, D.; Netto-Ferreira, J. C.; Ferreira, A. B. B. *Fitoquímica e Fotoquímica. Uma Relação Didática*. In: XII Encontro Latino Americano de Fotoquímica, 2015, Maresias-SP. Livro de Resumos do XII Encontro Latino Americano de Fotoquímica, 2015.

*Vitorio, L.; Pereira, T. M.; CHAVES, O. A.; Ferreira, A. B. B.; Graebin, C. S.; Kummerle, A. E. *Síntese e caracterização fotofísica de novas cumarinas fluorescentes de Biginelli*. In: 37º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal - RN. Livro de Resumos da 37º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014.

*CHAVES, O. A.; Amorim, A. P. O.; Teixeira, F. S. M.; Barros, L.S.; Ferreira, R. C.; Oliveira, M. C. C.; Cesarin-Sobrinho, D.; Ferreira, A. B. B. *Estudo Espectroscópico da Interação entre Albumina Sérica Humana e uma Nova Porfirina da Planta *Talinum triangulare**. In: 37º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal - RN. Livro de Resumos da 37º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014.

*Ferreira, R. C.; Barros, L.S.; Teixeira, F. S. M.; Tardem, V. S.; CHAVES, O. A.; Ferreira, A. B. B.; Cesarin-Sobrinho, D.; Ferreira, V. F.; Ferreira, S. B.; Silva, F. A.; Netto-Ferreira, J. C. *Estudo por espectroscopia de fluorescência da interação entre derivados análogos à alfa-lapachona com albumina sérica humana*. In: 37º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal - RN. Livro de Resumos da 37º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014.

Artigos em Fase Final de Correção:

*CHAVES, O. A.; da Silva, E. B.; Sant'Anna, C. M. R.; Quintella, C. M.; Okano, L. T.; Cesarin-Sobrinho, D.; Ferreira, A. B. B.; Netto-Ferreira, J.C. “*Combined spectroscopic analysis and molecular modeling on the interaction between β -lapachone and its 3-sulfonic acid derivative with bovine serum albumin*”. Chemical Physics Letters. I.F. = 1.860, Qualis = B2.

*Ferreira, R. C.; CHAVES, O. A.; de Oliveira, C. H. C. S.; de Barros, L. S.; Sant'Anna, C. M. R.; Cesarin-Sobrinho, D.; Netto-Ferreira, J. C. “*Comparative study of the interaction between 1,4-naphthoquinone derivatives and human serum albumin*”. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. I.F. = 2.653, Qualis = B2.

*de Oliveira, C. H. C. S.; Ferreira, R. C.; CHAVES, O. A.; Cesarin-Sobrinho, D.; Sant'Anna, C. M. R.; Netto-Ferreira, J. C. “*Spectroscopic and computational studies of the interaction between human serum albumin (HSA) and 1,2-naphthoquinone derivatives*”. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. I.F. = 2.477, Qualis = B1.

*CHAVES, O. A.; da Silva, L. S.; de Souza, B; C. E.; Netto-Ferreira, J. C.; Cesarin-Sobrinho, D.; Sant'Anna, C. M. R.; Ferreira, A. B. B. “*The interaction and binding of human plasmatic albumin with antiparasitic drugs: benznidazole, metronidazole and megalol*”. Med.Chem.Comm. I.F. = 2.319, Qualis = Não há.

Artigo em Fase Inicial de Escrita:

*CHAVES, O. A.; Netto-Ferreira, J. C.; Ferreira, A. B. B.; Sant'Anna, C. M. R. “*Molecular docking and semi-empirical calculations as a tool to understand the interaction between bovine serum albumin and small molecules*”. Journal of Molecular Structure. I.F. = 1.780, Qualis = B2.

Capítulo de Livro:

*CHAVES, O. A.; Silva, F.A.; MOURA, M. V. L. P. *(Foto) Física, Penas e Carnaval*. In: Maria Aparecida Ribeiro e Ana Paula Arnaut. (Org.). *Viagens do Carnaval: No Espaço, no Tempo, na Imaginação*. 1ed.Salvador: EDUFBA, 2014, v. 1, p. 293-298.



Artigo Publicado:

*CHAVES, O. A.; Amorim, A. P. O.; Castro, L. H. E.; Sant'Anna, C. M. R.; de Oliveira, M. C. C.; Cesarin-Sobrinho, D.; Netto-Ferreira, J. C.; Ferreira, A. B. B. "Fluorescence and docking studies of the interaction between human serum albumin and pheophytin". *Molecules* 2015, 20, 19526-19539. I.F. = 2.416, Qualis = B2.

Molecules 2015, 20, 19526-19539; doi:10.3390/molecules201019526

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Fluorescence and Docking Studies of the Interaction between Human Serum Albumin and Pheophytin

Otávio Augusto Chaves ^{1,†}, Ana Paula de O. Amorim ^{1,†}, Larissa H. E. Castro ^{1,†}, Carlos Mauricio R. Sant'Anna ^{1,†}, Márcia C. C. de Oliveira ^{1,†}, Dari Cesarin-Sobrinho ^{1,†}, José Carlos Netto-Ferreira ^{1,2,†} and Aurélio B. B. Ferreira ^{1,*}

¹ Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 47, 23890-000 Seropédica-RJ, Brazil; E-Mails: otavio_ufrj@hotmail.com (O.A.C.); anamorim16@gmail.com (A.P.O.A.); larissa_hec@hotmail.com (L.H.E.C.); santanna@ufrj.br (C.M.R.S.A.); mccdeo@gmail.com (M.C.C.O.); dari@ufrj.br (D.C.-S.); jcnetto.ufrj@gmail.com (J.C.N.-F.)

² Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia-INMETRO, Divisão de Metrologia Química, 25250-020 Duque de Caxias-RJ, Brazil

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: aureliobf@uol.com.br; Tel.: +55-21-26-822-807 (ext. 6); Fax: +55-21-26-822-807 (ext. 7).

Academic Editor: Gregor Drummen

Received: 28 September 2015 / Accepted: 20 October 2015 / Published: 27 October 2015

Artigo Publicado:

*CHAVES, O. A.; Schaeffer, E.; Sant'Anna, C. M. R.; Netto-Ferreira, J. C.; Cesarin-Sobrinho, D.; Ferreira, A. B. B. "Insight into the interaction between α -lapachone and bovine serum albumin employing a spectroscopic and computational approach". Mediterranean Journal of Chemistry 2016, 5, 331-339. I.F. = 1.348, Qualis = C.



Available free online at www.medjchem.com

Mediterranean Journal of Chemistry 2016, 5(1), 331-339

Insight into the interaction between α -lapachone and bovine serum albumin employing a spectroscopic and computational approach

Otávio Augusto Chaves¹, Edgar Schaeffer¹, Carlos Mauricio R. Sant'Anna¹, José Carlos Netto-Ferreira^{1,2,*}, Dari Cesarin-Sobrinho¹ and Aurelio Baird Buarque Ferreira^{1,2}

¹ Departamento de Química, I.C.E. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR-465, Km 7, Seropédica/RJ, Brazil.

² Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Divisão de Metrologia Química, Duque de Caxias/RJ, Brazil.

Abstract: Serum albumin is the most abundant protein in blood plasma; among its functions is the transport of a high variety of drugs in the body. Quinones show several biological and pharmacological activities, such as anti-malarial, antitumor, anti-microbial, anti-inflammatory and anti-parasitic. We report fluorescence and circular dichroism (CD) spectroscopic studies to try to understand the interaction process between α -lapachone (α -LAP) and bovine serum albumin (BSA). Studies using computational methods, such as molecular docking, were performed to identify the main cavity in which this interaction occurs as well as the type of intermolecular interactions between the amino acid residues from albumin and the ligand. The BSA fluorescence quenching by added α -LAP is a static process, indicating an initial association BSA: α -LAP. The K_a and K_b values for the interaction BSA: α -LAP are in the range 10^3 - 10^4 L·mol⁻¹, indicating a strong binding between these two species. CD data show that there is no significant perturbation on the secondary structure of the protein with binding. The negative ΔG° values are consistent with spontaneous binding occurring endothermically ($\Delta H^\circ = 127$ kJ·mol⁻¹), and possibly driven by hydrophobic factors ($\Delta S^\circ = 0.526$ kJ·mol⁻¹·s⁻¹). The number of binding sites (n) indicates the existence of just one main binding site in BSA for α -LAP, with molecular docking results showing that it binds preferentially to the albumin in the domain IIA, where the Trp-212 residue is located. The ligand interacts via hydrogen bond with Arg-259 and Tyr-149 residues and via T-stacking with the fluorophore Trp-212 residue.

Keywords: Bovine Serum Albumin, α -Lapachone, spectroscopy, molecular docking.

Artigo Publicado:

CHAVES, O. A.; Jesus, C. S. H.; Cruz, P. F.; Sant'Anna, C. M. R.; Brito, R. M. M.; Serpa, C. "Evaluation by fluorescence, STD-NMR, docking and semi-empirical calculations of the *o*-NBA photo-acid interaction with BSA". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2016, 169, 175-181. I.F. = 2.653, Qualis = B2.

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 169 (2016) 175–181



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa



Evaluation by fluorescence, STD-NMR, docking and semi-empirical calculations of the *o*-NBA photo-acid interaction with BSA



Otávio A. Chaves^{a,b}, Catarina S.H. Jesus^{b,c}, Pedro F. Cruz^b, Carlos M.R. Sant'Anna^a, Rui M.M. Brito^{a,b}, Carlos Serpa^{b,*}

^a Department of Chemistry, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Am 47, 23890-000 Seropédica, RJ, Brazil

^b IQIC, Chemistry Department, University of Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal

^c Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 March 2016
Received in revised form 3 June 2016
Accepted 17 June 2016
Available online 18 June 2016

Keywords:
o-NBA
Bovine serum albumin
pH-jump
Fluorescence
STD-NMR
Molecular docking

ABSTRACT

Serum albumins present reversible pH dependent conformational transitions. A sudden laser induced pH-jump is a methodology that can provide new insights on localized protein (un)folded processes that occur within the nanosecond to microsecond time scale. To generate the fast pH jump needed to fast-trigger a protein conformational event, a photo-triggered acid generator as *o*-nitrobenzaldehyde (*o*-NBA) can be conveniently used. In order to detect potential specific or nonspecific interactions between *o*-NBA and BSA, we have performed ligand-binding studies using fluorescence spectroscopy, saturation transfer difference (STD) NMR, molecular docking and semi-empirical calculations. Fluorescence quenching indicates the formation of a non-fluorescent complex in the ground-state between the fluorophore and the quencher, but *o*-NBA does not bind much effectively to the protein ($K_a = 4.34 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) and thus can be considered a relatively weak binder. The corresponding thermodynamic parameters: ΔG° , ΔS° and ΔH° showed that the binding process is spontaneous and entropy driven. Results of ^1H -STD-NMR confirm that the photo-acid and BSA interact, and the relative intensities of the signals in the STD spectra show that all *o*-NBA protons are equally involved in the binding process, which should correspond to a nonspecific interaction. Molecular docking and semi-empirical calculations suggest that the *o*-NBA binds preferentially to the Trp-212-containing site of BSA (FA7), interacting via hydrogen bonds with Arg-217 and Tyr-149 residues.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Artigo Aceito para Publicação:

*CHAVES, O. A.; Soares, B. A.; Maciel, M. A. M.; Sant'Anna, C. M. R.; Netto-Ferreira, J. C.; Cesarin-Sobrinho, D.; Ferreira, A. B. B. "A study of the interaction between *trans*-dehydrocrotonin, a bioactive natural 19-*nor* clerodane, and serum albumin". Journal of the Brazilian Chemical Society. I.F. = 1.129, Qualis = A2.

Article

doi number
J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-1, 2016,
Printed in Brazil - ©2016 Sociedade Brasileira de Química
0103 - 5053 \$6.00+0.00



A Study of the Interaction Between *trans*-Dehydrocrotonin, a Bioactive Natural 19-*nor*-Clerodane, and Serum Albumin

Otávio Augusto Chaves,^a Breno A. Soares,^b Maria Aparecida M. Maciel,^b
Carlos Maurício R. Sant'Anna,^a José Carlos Netto-Ferreira,^{a,c} Dari Cesarin-Sobrinho^a
and Aurélio B. B. Ferreira^{*a}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
23970-000 Seropédica-RJ, Brazil

^bInstituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Lagoa Nova,
59072-970 Natal-RN, Brazil

^cInstituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Divisão de Metrologia
Química, 25250-020 Duque de Caxias-RJ, Brazil

The interaction between 19-*nor*-clerodane *trans*-dehydrocrotonin (from *Croton cajucara* Benth.) and bovine serum albumin was studied, applying spectroscopic techniques (fluorescence and circular dichroism), combined with molecular modeling. Fluorescence quenching of albumin by the *nor*-clerodane (k_q ca. 10^{11} mol L⁻¹ s⁻¹ and Stern-Volmer, K_{sv} , increase with temperature) indicates a combination of static and dynamic quenching mechanism. The binding constant (K_b , ca. 10^3 mol L⁻¹) and circular dichroism data suggest that this association is weak and causes only a moderate change in the α -helix content of the protein. Thermodynamic parameters indicate a spontaneous (Gibbs free energy, ΔG° , ca. -21.28 kJ mol⁻¹ at 310 K) and probably entropy-driven ($\Delta S^\circ = 0.072$ kJ mol⁻¹ K⁻¹) association, typical of hydrophobic interactions. The number of binding sites (n ca. 1) indicates one main binding site and molecular modeling suggests subdomain IIIA (Sudlow's site II) as the main binding site to the *nor*-clerodane, which is able to make hydrophobic interactions with leucine (Leu)-24, phenylalanine (Phe)-36, valine (Val)-40 and tryptophan (Trp)-134 residues.

Keywords: *Croton cajucara* Benth., bovine serum albumin, fluorescence, circular dichroism, molecular modeling

Artigo em Fase de Resposta aos Revisores:

*(Submetido em 13/06/2016) de Barros, L. S.; CHAVES, O. A.; Schaeffer, E.; Sant'Anna, C. M. R.; Ferreira, A. B. B.; Cesarin-Sobrinho, D.; da Silva, F. A.; Netto-Ferreira, J. C. "Evaluating the interaction between di-fluorinated chalcones and plasmatic albumin". Journal of Fluorine Chemistry. I.F. = 2.213, Qualis = B2.

Date: Jul 05, 2016
To: "OTAVIO AUGUSTO CHAVES" otavio_ufrrj@hotmail.com
cc: thrash5@clemsen.edu;fluorine@att.net
From: Joseph Thrasher thrash5@clemsen.edu
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: FLUOR-D-16-00180
Title: Evaluating the interaction between di-fluorinated chalcones and plasmatic albumin
Journal of Fluorine Chemistry

Dear Mr. OTAVIO AUGUSTO CHAVES,

Reviewers have now commented on your paper. You will see that they are advising that you revise your manuscript. If you are prepared to undertake the work required, I would be pleased to reconsider my decision.

For your guidance, reviewers' comments are appended below.

If you decide to revise the work, please submit a list of changes or a rebuttal against each point which is being raised when you submit the revised manuscript. The due date for your revised manuscript is Sep 03, 2016.



Journal of Fluorine Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fluor



Evaluating the interaction between di-fluorinated chalcones and plasmatic albumin

Leonardo Santos de Barros,¹ Otávio Augusto Chaves,¹ Edgar Schaeffer,¹ Carlos Mauricio R. Sant'Anna,¹ Aurélio B. B. Ferreira,¹ Dari Cesarin-Sobrinho,¹ Francisco Assis da Silva,¹ José Carlos Netto-Ferreira,^{*1,2}

¹Departamento de Química, ICE, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR-465, Km 7, Seropédica/RJ, 23.890-000, Brazil.

²Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia-INMETRO, Divisão de Metrologia Química, Duque de Caxias/RJ, 25250-020, Brazil.

Artigo Submetido:

*(Submetido em 29/02/2016) CHAVES, O. A.; Cesarin-Sobrinho, D.; Sant'Anna, C. M. R.; Suzart, L. R.; Catunda-Júnior, F. E. A.; Netto-Ferreira, J. C.; Ferreira, A. B. B. "Probing the interaction between 7-O- β -D-glucopyranosyl-6-(3-methylbut-2-enyl)-5,4'-dihydroxyflavonol with bovine serum albumin (BSA)". Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. I.F. = 2.477, Qualis = B1.

Manuscript details

Manuscript number	JPHOTOCHEM_2016_145
Title	Probing the interaction between pŷ 7 - O - β - D - g l u c o p y r a n o s y l - 6 - (3 - m e t h y l b u t - 2 - e n y l) - 5 , 4 ' - with bovine serum albumin (BSA)
Article type	Full length article
Abstract	Serum albumin is the most abundant protein in the circulatory system. It plays an important role in the transport and deposition of many pŷ molecules in the body. The (PF) is a glycosylated flavonoid isolated from Ouratea hexasperma (Ochnaceae) branches. It shows important biological activities, such as cytotoxic, antimicrobial and antitumor. The aim of this study was to examine the interaction of bovine serum albumin (BSA) with PF in a PBS buffer solution (pH = 7.4) at 296K, 303K and 310K, by spectroscopic techniques (UV-Vis, fluorescence, circular dichroism) and molecular docking. The experimental results showed that the intrinsic fluorescence quenching of BSA induced by PF resulted in an association



Journal of Photochemistry and Photobiology A:
Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotochem



Probing the interaction between 7-O- β -D-glucopyranosyl-6-(3-methylbut-2-enyl)-5,4'-dihydroxyflavonol with bovine serum albumin (BSA)

Otávio Augusto Chaves^a, Dani Cesarin-Sobrinho^a, Carlos Mauricio R. Sant'Anna^a, Luciano Ramos Suzart^a, Francisco Eduardo Aragão Catunda-Júnior^a, José Carlos Netto-Ferreira^{a,b} and Aurélio B. B. Ferreira^{a,*}

^a Departamento de Química, ICE, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR-465, Km 7, Seropédica/RJ, Brazil

^b Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Divisão de Metrologia Química, Duque de Caxias/RJ, Brazil.

Artigo Submetido:

*(Submetido em 30/04/2016) Pinto, D. C. A.; CHAVES, O. A.; Sant'Anna, C. M. R.; Castro, R. N.; Almeida, W. P.; Trevisan, M. T. S.; de Lima, M. E. F.; Netto-Ferreira, J. C. "Binding of mangiferin and its acetyl derivative to human serum albumin (HSA): spectroscopic and computational studies". Journal of Molecular Structure. I.F. = 1.780, Qualis = B2.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of
Molecular Structure
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Binding of mangiferin and its acetyl derivative to human serum albumin (HSA): spectroscopic and computational studies

Article Type: Research Paper

Keywords: Mangiferin, Acetyl mangiferin, Human serum albumin, Fluorescence quenching, Circular dichroism, Molecular docking

Corresponding Author: Mr. OTAVIO AUGUSTO CHAVES,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

First Author: Douglas Chaves de Alcantara Pinto, Master Student

Order of Authors: Douglas Chaves de Alcantara Pinto, Master Student; OTAVIO AUGUSTO CHAVES; Carlos M. R. Sant'Anna, Professor; Rosane Nora Castro, Professor; Wanda Pereira Almeida, Professor; Maria Teresa Salles Trevisan, Professor; Marco Edilson Freire de Lima, Professor; José Carlos Netto-Ferreira, Professor



Journal of Molecular Structure

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molstruc



Binding of mangiferin and its acetyl derivative to human serum albumin (HSA): spectroscopic and computational studies

Douglas Chaves de Alcantara Pinto^a, Otávio A. Chaves^a, Carlos M. R. Sant'Anna^a, Rosane Nora Castro^a, Wanda Pereira Almeida^b, Maria Teresa Salles Trevisan^c, Marco Edilson Freire de Lima^{a,*}, José Carlos Netto-Ferreira^{a,d,*}

^a Departamento de Química, ICE, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ, Rodovia BR-465, Km 7, Seropédica/RJ, 23.890-000, Brazil.

^b Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas, 13803-859, Barão Geraldo, Campinas/SP, Brazil

^c Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 60451-970, Fortaleza, CE, Brazil

^d Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia-INMETRO, Divisão de Metrologia Química, Duque de Caxias/RJ, 25250-020, Brazil.

Artigo Submetido:

*(Submetido em 07/06/2016) CHAVES, O. A.; da Silva, V. A.; Sant'Anna, C. M. R.; Ferreira, A. B. B.; Ribeiro, T. A. N.; de Carvalho, M. G.; Cesarin-Sobrinho, D.; Netto-Ferreira, J. C. "Binding studies of lophirone B with bovine serum albumin (BSA): Combination of spectroscopic and molecular docking techniques". Journal of Molecular Structure. I.F. = 1.780, Qualis = B2.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of
Molecular Structure
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Binding studies of lophirone B with bovine serum albumin (BSA):
Combination of spectroscopic and molecular docking techniques

Article Type: Research Paper

Keywords: Bovine serum albumin, lophirone B, fluorescence quenching,
circular dichroism, molecular docking

Corresponding Author: Mr. OTAVIO AUGUSTO CHAVES,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro

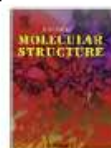
First Author: OTAVIO AUGUSTO CHAVES

Order of Authors: OTAVIO AUGUSTO CHAVES; Veridiana A. da Silva; Carlos
Maurício R. Sant'Anna, PhD; Aurélio B. B. Ferreira, PhD; Tereza
Auxiliadora N. Ribeiro, PhD; Mário G. de Carvalho, PhD; Dari Cesarin-
Sobrinho, PhD; José Carlos Netto-Ferreira, PhD



Journal of Molecular Structure

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molstruc



Binding studies of lophirone B with bovine serum albumin (BSA): Combination of
spectroscopic and molecular docking techniques

Otávio Augusto Chaves^a, Veridiana A. da Silva^a, Carlos Mauricio R. Sant'Anna^a, Aurélio B. B. Ferreira^a,
Tereza Auxiliadora N. Ribeiro^{a,b}, Mário G. de Carvalho^a, Dari Cesarin-Sobrinho^a, José Carlos Netto-
Ferreira^{a,c,*}

^a Departamento de Química, ICE, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR-465, Km 7, Seropédica/RJ, Brazil.

^b Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso, Boa Esperança, Cuiabá/MT, Brazil.

^c Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Divisão de Metrologia Química, Duque de Caxias/RJ, Brazil.

Artigo Submetido:

*(Submetido em 17/06/2016) CHAVES, O. A.; Jesus, C. S. H.; Henriques, E. S.; Brito, R. M. M.; Serpa, C. “*In-situ ultra-fast heat deposition does not perturb serum albumin structure*”. Photochemical & Photobiological Sciences. I.F. = 2.267, Qualis = B1.



Photochemical &
Photobiological
Sciences

In-situ ultra-fast heat deposition does not perturb serum albumin structure

Journal:	Photochemical & Photobiological Sciences
Manuscript ID	PP-ART-06-2016-000209
Article Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	17-Jun-2016
Complete List of Authors:	Chaves, Otávio; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ICE, Chemistry Department Jesus, Catarina; Universidade de Coimbra, CQC, Chemistry Department Henriques, Elsa; Universidade de Coimbra, Center for Neuroscience and Cell Biology Brito, Rui; University of Coimbra, Chemistry; Serpa, Carlos; University of Coimbra, Department of Chemistry

SCHOLARONE™
Manuscripts



Photochemical & Photobiological Sciences

PAPER

In-situ ultra-fast heat deposition does not perturb serum albumin structure

Received 00th June 2016,
Accepted 00th XXX 2016

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Otávio A. Chaves,^{a,b} Catarina S. H. Jesus^{a,c}, Elsa S. Henriques,^c Rui M. M. Brito,^a and Carlos Serpa^{a*}

MnTPPS is a metallic water soluble porphyrin with high potential to be a contrast agent in Photoacoustic Tomography. In order to fully understand the interaction between MnTPPS and serum albumin and to appreciate the effect of the light prompt fast *in situ* heat deposition by MnTPPS inside the protein, we performed several experimental studies such as fluorescence, circular dichroism spectroscopies and photoacoustic calorimetry. To evaluate the possible binding site(s) of the metalloporphyrin and to compare spectroscopic and theoretical results, a molecular docking exercise was also carried out. The MnTPPS shows a pre association with the albumin in the ground state and the quencher binds effectively to the protein. As $\Delta S^{\circ} > 0$ and $\Delta H^{\circ} < 0$ indicate, hydrogen bonding and electrostatic interaction as the main binding forces. $\Delta G^{\circ} < 0$ is consistent with the spontaneity of the binding, being enthalpically and entropically driven. The number of binding sites ($n \approx 1$) indicates just one main binding site for BSA:MnTPPS. The molecular docking and structure-relaxation suggest an external site at subdomain IB, where Trp-134 residue can be found, as the main binding site for MnTPPS. The CD data indicate no significant conformational changes on the BSA secondary structure upon binding with MnTPPS and upon several minutes of laser excitation of MnTPPS bound to BSA. TR-PAC results indicate that the *in situ* heat deposition from MnTPPS does not make any transient conformational change to BSA structure. It is shown that MnTPPS, in addition to the physico and chemical properties to be a contrast agent in Photoacoustic Tomography, can be effectively carried by albumin and that *in situ* heat release following light absorption does not cause damage to the protein structure.

Artigo Submetido:

*(Submetido em 13/07/2016) CHAVES, O. A.; Teixeira, F. S. M.; Netto-Ferreira, J. C.; Sant'Anna, C. M. R.; Guimarães, H. A.; Braz-Filho, R.; Cesarin-Sobrinho, D.; Ferreira, A. B. B. "Studies of the interaction between bovine serum albumin and a plumeran indole alkaloid isolated from *Aspidosperma cylindrocarpon* (Apocynaceae)". Journal of the Brazilian Chemical Society. I.F. = 1.129, Qualis = A2.

Journal of
the Brazilian
Chemical
Society

Studies of the interaction between BSA and a plumeran indole alkaloid isolated from the stem bark of *Aspidosperma cylindrocarpon* (Apocynaceae)

Journal:	<i>Journal of the Brazilian Chemical Society</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	CHAVES, OTÁVIO; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Química Teixeira, Flávia da Silva M; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Guimarães, Heloisa Alves ; Instituto Federal Fluminense Campos-Guarus Braz-Filho, Raimundo; UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO, LCQUI-laboratório de Ciências Químicas; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Química - DEQUIM de Sant'Anna, Carlos Maurício Rabello; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química Netto-Ferreira, José Carlos; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Ciências Exatas, Chemistry Cesarin-Sobrinho, Dari; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, QUÍMICA Ferreira, Aurélio; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Química

Studies of the interaction between BSA and a plumeran indole alkaloid isolated from the stem bark of *Aspidosperma cylindrocarpon* (Apocynaceae)

Otávio Augusto Chaves,^a Flávia da Silva M. Teixeira,^a Heloisa Alves Guimarães,^b Raimundo Braz-Filho,^{a,b} Carlos Mauricio R. Sant'Anna,^a José Carlos Netto-Ferreira,^{a,c} Dari Cesarin-Sobrinho^a and Aurélio B. B. Ferreira^{*,a}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 Km 7, 23970-000 Seropédica-RJ, Brazil. ^bLaboratório de Ciências Químicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, Brazil. ^cInstituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia-INMETRO, Divisão de Metrologia Química, 25250-020 Duque de Caxias-RJ, Brazil.