



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

**ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA INTERAÇÃO DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS COM ALBUMINA SÉRICA HUMANA (ASH)**

**Cosme Henrique Coêlho dos Santos de Oliveira**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Dr. José Carlos Netto Ferreira**

*Co-orientação do Professor*  
**Dr. Darí Cesarin Sobrinho**

Tese submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Química**, no  
Programa de Pós-Graduação em  
Química, Área de Concentração  
em Química

Seropédica, RJ  
Agosto de 2023

Ficha catalográfica elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48e      Oliveira, Cosme Henrique Coêlho dos Santos de,  
21/06/1986-  
ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA INTERAÇÃO DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS COM ALBUMINA SÉRICA HUMANA (ASH) / Cosme  
Henrique Coêlho dos Santos de Oliveira. - Rio de  
Janeiro, 2023.  
253 f.: il.

Orientador: José Carlos Netto Ferreira.  
Coorientador: Dari Cesarin Sobrinho.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química,  
2023.

1. Fluorescência. 2. Albumina Sérica Humana (ASH).  
3. Compostos Bioativos. 4. Espectroscopia. 5.  
Modelagem Molecular. I. Netto Ferreira, José Carlos,  
1948-, orient. II. Cesarin Sobrinho, Dari, 1967-,  
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Cosme Henrique Coêlho dos Santos de Oliveira

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química,  
no Programa de Pós-graduação em Química, Área de concentração em Química.

TESE APROVADA EM 28/08/2023

José Carlos Netto Ferreira Dr. UFRRJ

Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna Dr. UFRRJ

Marco Edilson Freire de Lima Dr. UFRRJ

Josué Sebastian Bello Forero Dr. UFRJ

Rodrigo José Correa Dr. UFRJ



**TERMO N° 1279/2023 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)**

**(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 27/11/2023 10:48 )*  
**CARLOS MAURICIO RABELLO DE SANT ANNA**  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DQF (11.39.00.25)  
Matrícula: ###204#4

*(Assinado digitalmente em 26/03/2024 12:05 )*  
**GLAUCO FAVILLA BAUERFELDT**  
COORDENADOR CURS/POS-GRADUACAO  
PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)  
Matrícula: ###163#1

*(Assinado digitalmente em 28/11/2023 08:24 )*  
**MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA**  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DQO (11.39.00.23)  
Matrícula: ###587#8

*(Assinado digitalmente em 08/02/2024 11:34 )*  
**JOSUÉ SEBASTIAN BELLO FORERO**  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.787-##

*(Assinado digitalmente em 28/11/2023 08:51 )*  
**RODRIGO JOSE CORREIA**  
ASSINANTE EXTERNO  
Matrícula: ###.###.997-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número: **1279**, ano: **2023**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **27/11/2023** e o código de verificação: **c94d7026f8**



## **DEDICATÓRIA**

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

Aos meus pais, Cosme de Oliveira e Lúcia Helena (*in memoriam*), por toda a dedicação e carinho.

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

## AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador José Carlos Netto Ferreira e ao professor e co-orientador Darí Cesarin Sobrinho pela orientação, ensinamentos, estímulos e amizade.

Aos meus pais, Cosme de Oliveira e Lúcia Helena Coêlho dos Santos de Oliveira (*in memoriam*), pelo apoio, incentivo, dedicação e compreensão em todos os momentos de minha vida.

À minha irmã, Elaine Cristiane Coêlho dos Santos de Oliveira, pela paciência e amizade.

Às minhas primas, Silene e Andréia, pelo incentivo e amizade.

Às minhas tias, Heloisa Helena e Ilma Coelho dos Santos, pelo apoio, acolhendo-me em sua casa em alguns momentos desta tese, e por acreditar no meu potencial.

Ao professor e amigo Aurélio Baird Buarque Ferreira e aos técnicos Maurício e Carlão (*in memoriam*).

Aos demais professores, técnicos e funcionários do Instituto de Química/UFRRJ pela contribuição direta ou indireta, apoio e ajuda para a realização desta tese.

A todos os colegas dos cursos de mestrado e de doutorado do PPGQ/ IQ/ UFRRJ, que me ajudaram direta ou indiretamente, e pela amizade.

Aos meus amigos Romulo, João Victor, Naza, Rodolfo, Jeniffer, Cíntia, André, Vanessa, Jonas, Kamilla, Débora, Carlos, entre outros que, de uma forma ou de outra, sempre torceram por mim.

À UFRRJ, pelos conhecimentos adquiridos, pelas amizades conquistadas, enfim, pela sua existência e contribuição para a minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

## RESUMO

Foram realizados estudos espectroscópicos para a interação de compostos bioativos das classes das tiossemicarbazonas (UTS, DFTS e TFTS), das metforminas (MFCl, MFBr e MF3CF<sub>3</sub>), da chalcona (IC9) e das xantonas (1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT) com albumina sérica humana (ASH). Através dos estudos por espectroscopia de fluorescência, verificou-se que todos os compostos bioativos estudados interagem com a ASH no estado fundamental através de um mecanismo de supressão de fluorescência estático, o que é indicado pela diminuição dos valores de  $K_{SV}$  com o aumento da temperatura, assim como os valores de  $k_q$  da ordem de  $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Os valores da constante de associação ( $K_a$ ) para todos os casos estudados foram da ordem de  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , mostrando uma interação moderada desses compostos com ASH e os resultados de dicróismo circular (DC) indicaram uma fraca perturbação na estrutura secundária da albumina após a interação com o ligante. Os parâmetros termodinâmicos para as tiossemicarbazonas sugeriram que o processo de interação é conduzido entropicamente ( $\Delta S^\circ$  entre 0,022 e 0,072 J/mol.K) e entálpicamente ( $\Delta H^\circ$  entre -32,3 e -4,9 kJ/mol), com valores de variação de energia livre de Gibbs favoráveis ( $\Delta G^\circ$  entre -39 e -24 kJ/mol). A interação entre cada metformina halogenada e ASH é espontânea ( $\Delta G^\circ$  entre -28 e -26 kJ/mol) e conduzida entropicamente ( $\Delta S^\circ$  entre 0,120 e 0,147 J/mol.K) com uma interação entálpicamente desfavorável ( $\Delta H^\circ$  entre 9,48 e 18,5 kJ/mol). Para a interação entre a chalcona IC9 e ASH, os parâmetros termodinâmicos indicam uma interação espontânea com a energia livre de Gibbs favorável ( $\Delta G^\circ = -27,9 \text{ kJ/mol}$ ) que é conduzida tanto entálpicamente ( $\Delta H^\circ = -20,8 \text{ kJ/mol}$ ) como entropicamente ( $\Delta S^\circ = 0,023 \text{ J/mol.K}$ ). Para a interação entre as xantonas e ASH, os parâmetros termodinâmicos sugeriram que o processo de interação é conduzido entropicamente ( $\Delta S^\circ$  entre 0,008 e 0,068 J/mol.K) e entálpicamente ( $\Delta H^\circ$  entre -25,5 e -7,2 kJ/mol), com valores de variação de energia livre de Gibbs favoráveis ( $\Delta G^\circ$  entre -28,2 e -27,3 kJ/mol). Os experimentos de interação competitiva na presença dos marcadores de sítio varfarina, ibuprofeno e digitoxina sugerem que as tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS competem pelo mesmo sítio de interação da varfarina, indicando o sítio I de Sudlow como o principal sítio de interação. Os estudos de interação competitiva para MFCl, MFBr e MF3CF<sub>3</sub> na presença de varfarina, ibuprofeno ou digitoxina também indicaram o sítio I de Sudlow como o principal sítio de interação. Existe apenas um sítio principal de interação para IC9, que está localizado sítio I de Sudlow. Para 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT, os experimentos de interação competitiva na presença dos marcadores de sítio varfarina, ibuprofeno e digitoxina sugerem que os compostos monometoxilados preferem complexar no sítio I de Sudlow, enquanto os compostos dimetoxilados têm uma maior tendência em complexação com o sítio II de Sudlow.

## ABSTRACT

Spectroscopic studies were carried out for the interaction of bioactive compounds from the classes of thiosemicarbazones (UTS, DFTS and TFTS), metformins (MFCl, MFBr and MFClF3), chalcone (IC9) and xanthenes (1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT and 34MXT) with human serum albumin (ASH). Through fluorescence spectroscopy studies, it was found that all thought bioactive compounds interact with ASH in the ground state through a static fluorescence discharge mechanism, which is indicated by the decrease in  $K_{SV}$  values with increasing temperature, as well as  $kq$  values of the order of  $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . The values of the association constant ( $K_a$ ) for all observed cases were of the order of  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , showing a moderate interaction of those compounds with ASH and the results of circular dichroism (DC) indicated a weak disturbance in the secondary structure of albumin after the interaction with the ligand. Thermodynamic parameters for thiosemicarbazones suggest that the binding process is controlled entropically ( $\Delta S^\circ$  between 0.022 and 0.072 J/mol.K) and enthalpically ( $\Delta H^\circ$  between -32.3 and -4.9 kJ/mol), with values compatible Gibbs free energy change ( $\Delta G^\circ$  between -39 and -24 kJ/mol). The interaction between each halogenated metformin and ASH is spontaneous ( $\Delta G^\circ$  between -28 and -26 kJ/mol) and entropically conducted ( $\Delta S^\circ$  between 0.120 and 0.147 J/mol.K) with an enthalpically unfavorable interaction ( $\Delta H^\circ$  between 9.48 and 18.5 kJ/mol). For the interaction between chalcone IC9 and ASH, the thermodynamic parameters indicate a spontaneous interaction with compatible Gibbs free energy ( $\Delta G^\circ = -27.9 \text{ kJ/mol}$ ) that is both enthalpically driven ( $\Delta H^\circ = -20.8 \text{ kJ/mol}$ ) and entropically ( $\Delta S^\circ = 0.023 \text{ J/mol.K}$ ). For the interaction between xanthenes and ASH, the thermodynamic parameters suggest that the binding process is attended entropically ( $\Delta S^\circ$  between 0.008 and 0.068 J/mol.K) and enthalpically ( $\Delta H^\circ$  between -25.5 and -7.2 kJ/mol), with compatible Gibbs free energy change values ( $\Delta G^\circ$  between -28.2 and -27.3 kJ/mol). Competitive binding experiments in the presence of warfarin, ibuprofen and digitoxin site markers suggest that thiosemicarbazones UTS, DFTS and TFTS compete for the same warfarin binding site, indicating Sudlow's I site as the main binding site. Competitive binding studies for MFCl, MFBr and MFClF3 in the presence of warfarin, ibuprofen or digitoxin also indicated the Sudlow I site as the main binding site. There is only one major binding site for IC9, which is located at Sudlow site I. For 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT, and 34MXT, competitive binding experiments in the presence of site markers warfarin, ibuprofen, and digitoxin suggest that monomethoxylated compounds prefer to complex at the Sudlow I site, while dimethoxylated compounds have a greater tendency toward complexation with Sudlow

II.

site

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

UTS	( <i>E</i> )-2-benzilideno-hidrazina-carbotioamida
DFTS	( <i>E</i> )-2-(3,4-difluoro-benzilideno)-hidrazina-carbotioamida
TFTS	( <i>E</i> )-2-(2,3,4-trifluoro-benzilideno)-hidrazina-carbotioamida
MFCI	N'-[( <i>E</i> )-(4-clorofenil)metileno]-N,N-dimetiltriimido-dicarbônico diamida
MFBBr	N'-[( <i>E</i> )-(4-bromofenil)metileno]-N,N-dimetiltriimidodicarbônico diamida
MFCF3	N'-[( <i>E</i> )-(4-(trifluorometilfenil)metileno)-N,N-dimetiltriimidodicarbônico diamida
IC9	(2 <i>E</i> )-3-(4-bromofenil)-1-(1H-indol-3-il) prop-2-en-1-ona
1MXT	1-metoxi-9H-xanten-9-ona
2MXT	2-metoxi-9H-xanten-9-ona
4MXT	4-metoxi-9H-xanten-9-ona
23MXT	2,3-dimetoxi-9H-xanten-9-ona
34MXT	3,4-dimetoxi-9H-xanten-9-ona
ASH	Albumina sérica humana
Ala	Alanina (A)
Arg	Arginina (R)
Asp	Aspartato (D)
Asn	Asparagina (N)
Glu	Glutamato (E)
Gln	Glutamina (Q)
Cys	Cisteína (C)
Phe	Fenilalanina (F)
Gly	Glicina (G)
His	Histidina (H)
Ile	Isoleucina (I)
Leu	Leucina (L)
Lys	Lisina (K)
Met	Metionina (M)
Pro	Prolina (P)
Ser	Serina (S)
Tyr	Tirosina (Y)
Thr	Treonina (T)
Trp	Triptofano (W)
Val	Valina (V)

$pK$	Constante de dissociação
$pI$	Potencial isoeletrônico
pH	Potencial hidrogeniônico
$pKa$	Potencial de dissociação
PDB	Banco de Dados de Proteínas
ID	Identidade
AFM	$\alpha$ -famina
AFP	$\alpha$ -fetoproteína
DBP	Proteína de Interação à Vitamina D
FA	Ácido Graxo
IFN	Interferon
IL-2	Interleucina-2
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
AINE	Antiinflamatório Não-esteroidal
DCI	Dicroísmo Circular Induzido
IMN	Subsítio de Indometacina
SAL	Subsítio Salicílico
AZT	Subsítio 3'-azido-3'-desoxitimidina
HNE	4-hidroxi- <i>trans</i> -2-nonenal
GA	Módulo de interação à albumina semelhante à proteína G
AGE	Produto Final de Glicação Avançada
MAO-B	Monoamina Oxidase B
$\lambda_{abs}$	Comprimento de onda de absorção (nm)
$\lambda_{em}$	Comprimento de onda de emissão (nm)
$\epsilon$	Coefficiente de absortividade molar ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )
$\phi_f$	Rendimento quântico de fluorescência
A	Absorbância
DCI	Dicroísmo Circular Induzido
MRE	Elipticidade Molar Residual
$S_0$	Estado fundamental singlete



$S_1$	Estado excitado singlete de mais baixa energia
$S_n$	Estado excitado singlete de enésima
$T_1$	Estado excitado triplete
$T_2$	Estado excitado triplete de maior energia
$I_0$	Intensidade da luz incidente;
$I$	Intensidade após a luz percorrer uma distância $l$ no meio
$c$	Concentração da espécie que absorve a luz (em mol/L);
$l$	Distância que a luz percorre no meio (em cm)
$k_F$	Constante de velocidade de decaimento radiativo do fluoróforo
$k_{nr}$	Constante de velocidade do decaimento não radiativo para $S_0$
FRET	Transferência de energia por ressonância de Förster
$K_{SV}$	Constante de Stern-Volmer
$k_q$	Constante de velocidade de supressão bimolecular
$\tau_0$	Tempo de vida da espécie não suprimida (natural)
[Q]	Concentração do supressor
AD	Água milli-Q
ASH	Albumina sérica humana
DC	Dicroísmo circular
ASH	Albumina sérica humana
MeOH	Metanol
MRE	Elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual
PBS	Solução tampão de fosfato
UV-Vis	Espectrometria no ultravioleta/visível
N	Número de sítios de interação
R	Coeficiente de correlação
SD	Desvio padrão
P	Probabilidade

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valor para constante de dissociação (pK) e ponto isoeletrônico (pI) dos aminoácidos normalmente encontrados em proteínas. **3**
- Tabela 2.** Principais resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos pertencentes aos diferentes sítios de ácido graxo (FAs) que estão interagindo com os ligantes mostrados na Figura 16. **24**
- Tabela 3.** Coeficientes de absortividade molar e rendimento quântico de fluorescência para Phe, Tyr e Trp em solução aquosa neutra a 23°C. **42**
- Tabela 4.** Estudo da interação de compostos bioativos com ASH realizados pelo grupo de fotoquímica da UFRRJ liderado pelo prof. Dr José Carlos Netto Ferreira. **53**
- Tabela 5.** Concentração final dos compostos bioativos, após a adição de alíquotas de uma solução estoque de 4-bromo-indolilchalcona (IC9) ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), a 3 mL da solução de ASH ( $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L). **85**
- Tabela 6.** Concentração final dos compostos bioativos, após a adição de alíquotas de uma solução estoque das tiossemicarbazonas (UTS, DFTS e T FTS), metforminas (MFCl, MFBr e MFClF3) e dimetoxixantonas (23MXT e 34MXT) ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), a 3 mL da solução de ASH ( $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L). **85**
- Tabela 7.** Concentração final dos compostos bioativos, após a adição de alíquotas de uma solução estoque das monometoxixantonas (1MXT, 2MXT e 4MXT) ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), a 3 mL da solução de ASH ( $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L). **86**
- Tabela 8.** Concentração final dos compostos bioativos, após a adição de alíquotas de uma solução estoque de 4-bromo-indolilchalcona (IC9), tiossemicarbazonas (UTS, DFTS e T FTS), metforminas (MFCl, MFBr e MFClF3) e metoxixantonas (1MXT, 2MXT, 3MXT, 23MXT e 34MXT) ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), a 3 mL da solução de ASH ( $1,00 \times 10^{-6}$  mol/L). **86**
- Tabela 9.** Modelos matemáticos usados para diferentes ajustes nos estudos de supressão de fluorescência para o processo de complexação hóspede/hospedeiro. **112**
- Tabela 10.** Valores de  $K_{SV}$  e  $k_q$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas tiossemicarbazonas UTS, DFTS e T FTS nas temperaturas de 296, 303 e 310K. **122**
- Tabela 11.** Valores para  $K_a$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas tiossemicarbazonas UTS, DFTS e T FTS nas temperaturas de 296, 303 e 310 K. **123**
- Tabela 12.** Valores estatísticos obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados pela supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas tiossemicarbazonas UTS, DFTS e T FTS. **124**

**Tabela 13.** Valores dos parâmetros termodinâmicos  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  e  $\Delta G^\circ$  obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) pelas tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS. **125**

**Tabela 14.** Valores de número e ordem de interação ( $n$  e  $K_b$ ) obtidos a partir dos gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) pelas tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS nas temperaturas de 296, 303 e 310K. **127**

**Tabela 15.** Porcentagem de hélice- $\alpha$  calculada a 208 e 222 nm para ASH livre (pH = 7,4) e na presença das tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS na temperatura de 310 K. Nas proporções 1:0, e 1:26 de ASH:tiossemicarbazona,  $[\text{ASH}] = 1,00 \times 10^{-6}$  M e  $[\text{UTS}] = [\text{DFTS}] = [\text{TFTS}] = 0$  e  $26,0 \times 10^{-6}$  M. **129**

**Tabela 16.** Valores de tempo de vida  $\tau_1$  e  $\tau_2$  (em ns) para  $[\text{ASH}] = 1,00 \times 10^{-5}$  M, com a adição de alíquotas das tiossemicarbazonas  $[\text{UTS}] = [\text{DFTS}] = [\text{TFTS}] = 2,6 \times 10^{-5}$  M. **130**

**Tabela 17.** Valores para a constante de interação a partir do Stern-Volmer modificado ( $K_a$ ) para a interação das tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS com ASH na presença de três marcadores de sítio diferentes na temperatura de 310 K. **132**

**Tabela 18.** Valores para  $K_{SV}$  e  $k_q$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) pelos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFCF3 em diferentes temperaturas (305 K, 310 K e 315 K). **138**

**Tabela 19.** Valores para  $K_a$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) pelos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFCF3 nas temperaturas de 305, 310 e 315 K. **139**

**Tabela 20.** Valores estatísticos obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados da supressão de fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) pelos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFCF3 **139**

**Tabela 21.** Valores para os parâmetros termodinâmicos  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  e  $\Delta G^\circ$  obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) pelos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFCF3. **140**

**Tabela 22.** Valores de número constante de interação ( $n$  e  $K_b$ ) obtidos a partir dos gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) pelos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFCF3. **142**

**Tabela 23.** Porcentagem de hélice- $\alpha$  calculada a 208 nm e 222 nm para ASH em solução tampão de PBS (pH = 7,4) na presença dos derivados de metformina MFCl, MFBr e MFCF3 na temperatura de 310 K. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:MFCl, ASH:MFBr e ASH:MFCF3.  $[\text{ASH}] = 1,00 \times 10^{-6}$  M e  $[\text{MFCl}] = [\text{MFBr}] = [\text{MFCF}_3] = 0$ ; 3,98; 7,94; 15,75 e  $31,01 \times 10^{-6}$  M. **144**

**Tabela 24.** Valores de tempo de vida  $\tau_1$  e  $\tau_2$  (em ns) para ASH ( $[ASH] = 1,00 \times 10^{-5}$  M), com a adição de alíquotas dos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFClF3 ( $[MFCl] = [MFBr] = [MFClF3] = 2,6 \times 10^{-5}$  M), na temperatura de 310 K. **146**

**Tabela 25.** Valores para a constante de interação a partir do Stern-Volmer modificado ( $K_a$ ) para a interação de MFCl, MFBr e MFClF3 com ASH na presença de três marcadores de sítio diferentes: varfarina, digitoxina e ibuprofeno, na temperatura de 310 K. **147**

**Tabela 26.** Resíduos de aminoácidos que participam da interação ASH/derivados de metformina MFCl, MFBr e MFClF3 no sítio I. **150**

**Tabela 27.** Valores para  $K_{SV}$  e  $k_q$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela 4-bromoindolilchalcona (IC9) nas temperaturas de 296 K, 303 K, 310 K e 317 K. **155**

**Tabela 28.** Valores para  $K_a$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela 4-bromoindolilchalcona IC9 nas temperaturas de 296 K, 303 K, 310 K e 317 K. **156**

**Tabela 29.** Valores estatísticos obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados da supressão de fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para o derivado análogo a chalcona IC9. **156**

**Tabela 30.** Valores para os parâmetros termodinâmicos  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  e  $\Delta G^\circ$  obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela 4-bromoindolilchalcona IC9. **157**

**Tabela 31.** Valores de número e ordem de interação ( $n$  e  $K_b$ ) obtidos a partir dos gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela 4-bromoindolilchalcona (IC9). **159**

**Tabela 32.** Resultados de fluorescência resolvidos no tempo para a interação ASH:IC9, em pH = 7,4 a temperatura ambiente. **160**

**Tabela 33.** Porcentagem de hélice- $\alpha$  calculado a 208 nm e 222 nm para ASH (pH = 7,4) e para IC9/ASH nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32,  $[ASH] = 1,00 \times 10^{-6}$  M e  $[IC9] = 0$ ; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01  $\times 10^{-6}$  M, na temperatura de 310 K. **161**

**Tabela 34.** Valores para a constante de interação de Stern-Volmer modificado  $K_a$  para a interação da ASH/IC9 na presença dos três marcadores de sítio diferentes varfarina, digitoxina e ibuprofeno na temperatura de 310 K. **163**

**Tabela 35.** Valores para  $K_{SV}$  e  $k_q$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados da xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT nas temperaturas de 305 K, 310 K e 315 K. **173**

**Tabela 36.** Valores para  $K_a$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados da xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT em diferentes temperaturas (305 K, 310 K e 315 K). **175**

**Tabela 37.** Valores estatísticos obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados pela supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para os derivados de xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT. **175**

**Tabela 38.** Valores para os parâmetros termodinâmicos  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  e  $\Delta G^\circ$  obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados de xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT nas temperaturas de 305 K, 310 K e 315 K. **177**

**Tabela 39.** Valores de número e ordem de interação ( $n$  e  $K_b$ ) obtidos a partir dos gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados da xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT nas temperaturas de 305 K, 310 K e 315 K. **180**

**Tabela 40.** Porcentagem de hélice- $\alpha$  calculada a 208 nm e 222 nm para ASH (pH = 7,4) na ausência e na presença de derivados de xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT na temperatura de 310 K. **182**

**Tabela 41.** Valores para a constante de interação do Stern-Volmer modificado ( $K_a$ ) para a interação de 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT com ASH na presença de três marcadores de sítio diferentes a 310 K. **185**

**Tabela 42.** Resíduos de aminoácidos que participam da interação ASH/1MXT, ASH/2MXT e ASH/14MXT com o Sítio I da ASH e as respectivas distâncias de interação. **189**

**Tabela 43.** Resíduos de aminoácidos que participam da interação ASH/23MXT e ASH/34MXT com o Sítio II da ASH e as respectivas distâncias de interação. **190**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas dos aminoácidos com cadeias laterais não polares e alifáticas.	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Estrutura dos aminoácidos com cadeias laterais aromáticas.	<b>6</b>
<b>Figura 3.</b> Estruturas dos aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas.	<b>6</b>
<b>Figura 4.</b> Estruturas dos aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente em pH fisiológico (ácidos).	<b>7</b>
<b>Figura 5.</b> Estruturas dos aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente em pH fisiológico (básicos).	<b>7</b>
<b>Figura 6.</b> Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína.	<b>9</b>
<b>Figura 7.</b> Estrutura primária de uma proteína caracterizada pela formação de uma interação peptídica- $\beta$ .	<b>9</b>
<b>Figura 8.</b> Estrutura secundária para uma proteína tipo: a) hélice- $\alpha$ e b) folha- $\beta$ .	<b>9</b>
<b>Figura 9. a)</b> Estrutura terciária da ASH, ilustrando a localização dos resíduos de aminoácidos Cys34 e Trp214 e dos subdomínios, codificados por cores: IA-azul escuro; IB– azul claro; IIA, verde escuro; IIB-verde claro; IIIA-amarelo; IIIB-vermelho, [PDB ID,1AO6] <b>b)</b> Representação da estrutura quaternária da ASH [PDB ID, 3JQZ] com os resíduos de cisteína em destaque (construída a partir das coordenadas 1BM0, disponíveis no PDB - Protein Data Bank).	<b>10</b>
<b>Figura 10.</b> Visão geral das principais proteínas plasmáticas humanas que podem ser identificadas por técnicas eletroforéticas simples.	<b>12</b>
<b>Figura 11.</b> Sequência completa de aminoácidos da albumina sérica humana. O resíduo de cisteína 34 contém o único grupo SH livre da albumina.	<b>17</b>
<b>Figura 12.</b> Homologia interna na sequência de resíduos de aminoácidos na albumina sérica humana.	<b>18</b>
<b>Figura 13.</b> Representação em forma de fita da estrutura tridimensional da ASH em duas perspectivas diferentes (a e b) com rotação relativa de 180°. [PDB ID, 1AO6]. Foram usadas como referência relativa as hélices- $\alpha$ IIa-h2 e IIIa-h6. A figura foi preparada usando o programa JSmol.	<b>19</b>
<b>Figura 14.</b> Representação dos subdomínios da ASH bem como as suas respectivas hélices- $\alpha$ e pontes de dissulfetos.-	<b>20</b>

**Figura 15.** a) Estrutura tridimensional para ASH com destaque para a cisteína Cys34 e o triptofano Trp214, b) representação da estrutura da ASH mostrando as diferentes classes de resíduos de aminoácidos: azul escuro (Arg e Lys), azul claro (Gln e Asn), vermelho (Glu e Asp), amarelo (Cys), Alaranjado (Ser e Thr), verde, (Leu, Ile e Val), bege (Pro) e em azul marinho (Phe e Tyr). [PDB ID, 1AO6]. As figuras foram preparadas usando o programa JSmol. 21

**Figura 16.** Representação para a estrutura cristalina dos sítios de interação de ácidos graxos (FAs) mostrando os principais resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos que estão interagindo com os ligantes. As estruturas mostradas são para C18:0 (azul), C18:1 (violeta) e C20:4 (marrom) ligadas a (a) sítio FA1, (b) sítio FA2, (c) sítios FA3 e 4, (d) sítio FA5, (e) sítio FA6 e (f) sítio FA7. 23

**Figura 17.** Estrutura cristalina para ASH complexada com três diferentes ácidos graxos. Os ácidos graxos são mostrados na cor amarela. a) ácido mirístico complexado com tiroxina: (cor azul) [PDB ID, 1HK4] b) ácido esteárico [PDB ID, 1E7I] e c) ácido palmítico. [PDB ID, 1E7H]. Todas as figuras foram preparadas usando o programa JSmol. 24

**Figura 18.** Representação para a cocrystalização do ácido cáprico nos sítios de interação de ácidos graxos FA1-FA7 (primários) e FA8 e FA9 (secundários) [PDB-ID 1E7E]. A figura foi preparada usando o programa JSmol. 25

**Figura 19.** Comparação entre as estruturas cristalinas de: a) ASH nativa [PDB-ID, 1AO6] e b) ASH complexada com ácido cáprico. [PDB ID, 1E7E]. De modo a realizar uma comparação sistemática entre diferentes estruturas cristalinas de ASH, foram tomadas como referência relativa as hélices- $\alpha$  pertencentes aos subdomínios IIa-h2 e IIIa-h6. As estruturas foram construídas usando o programa JSmol. 26

**Figura 20.** Representação estrutural do modo de interação de múltiplos ácidos graxos (AGs) para ASH para os diferentes sítios de interação (FA1 – FA7). A representação da superfície molecular da ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°). 27

**Figura 21.** Estrutura cristalina de ASH indicando as regiões de interação primária de fármacos endógenos exógenos: sítio SI, sítio SII e sítio SIII. [PDB-ID, 1AO6]. A estrutura foi preparada usando o programa JSmol. 28

**Figura 22.** Representação da complexação nos sítios primários de interação de fármacos endógenos exógenos com ASH. a) sítio I de Sudlow ou sítio da varfarina, b) sítio II de Sudlow ou sítio do ibuprofeno e c) sítio III ou sítio do ácido salicílico. 29

**Figura 23.** Representação da estrutura cristalina do ambiente próximo a Lys199 para a estrutura nativa da ASH [PDB-ID 1AO6]. 31

**Figura 24.** Representação estrutural para complexação no sítio SIII de ASH com: a) ácido fusídico e b) AZT. 33

- Figura 25.** Representação da estrutura cristalina do ambiente ~~que~~ próximo a Cys34 para a estrutura nativa da ASH [PDB ID, 1AO6] **34**
- Figura 26.** Representação mecanística para a atividade tipo esterase da Lys199 no subdomínio IIA de ASH mostrando a hidrólise da aspirina a ácido salicílico. **35**
- Figura 27.** Representação da estrutura cristalina da ASH complexada com: **a)** modulo GA [PDB-ID, 1FT0] e **b)** *s*-naproxeno e o módulo GA [PDB-ID, 2VDB]. As estruturas foram preparadas usando o programa JSmol. **37**
- Figura 28.** Representação esquemática dos processos mecanísticos empregando ASH como carreador de compostos bioativos. **40**
- Figura 29.** Espectro de absorção e emissão de fluorescência para os aminoácidos **a)** fenilalanina, **b)** tirosina e **c)** triptofano. **43**
- Figura 30.** Espectro de excitação para a fluorescência (I) e de anisotropia do triptofano (*r*), em propilenoglicol a -50°C. Também são mostrados os espectros de anisotropia-resolvida das transições  $^1L_a$  (pontilhada) e  $^1L_b$  (tracejada). **45**
- Figura 31.** Espectro de emissão de fluorescência do resíduo indólico do triptofano em diferentes ambientes químicos. **45**
- Figura 32.** Distribuição da origem para 1940 xantonas naturais. **75**
- Figura 33.** Esquema da luz elipticamente polarizada gerada por dicroísmo circular, onde (R) e (L) representam a magnitude dos vetores elétricos da luz circularmente polarizada para a direita e esquerda respectivamente, sendo  $\theta$  o valor medido para a elipticidade como resultado do efeito Cotton observado. **91**
- Figura 34.** Representação esquemática de um aparelho de dicroísmo circular DC, onde são mostrados os componentes básicos para a sua operação. **92**
- Figura 35.** Espectros de dicroísmo circular representativos de estruturas secundárias de proteínas. **93**
- Figura 36.** Diversos compostos fluorescentes em diferentes regiões do visível do espectro eletromagnético. **95**
- Figura 37.** Espectro de fluorescência da albumina sérica humana. **95**
- Figura 38.** Diagrama de Jablonski. **96**
- Figura 39.** Regra da imagem especular e fatores de Franck-Condon. Os espectros de absorção e emissão para antraceno. **97**



<b>Figura 40.</b> Diagrama de Jablonski simplificado para ilustrar o significado de rendimentos quânticos e tempos de vida.	<b>98</b>
<b>Figura 41.</b> Princípios de fluorimetria resolvida no tempo.	<b>100</b>
<b>Figura 42.</b> Curva de decaimento de fluorescência.	<b>101</b>
<b>Figura 43.</b> Mecanismos de supressão de fluorescência: a) mecanismo estático e b) mecanismo dinâmico.	<b>103</b>
<b>Figura 44.</b> Diagrama de Jablonski (energia) para o processo de desativação do estado excitado de uma molécula por diferentes mecanismos.	<b>103</b>
<b>Figura 45.</b> Gráfico de Stern-Volmer para o processo de supressão dinâmico.	<b>105</b>
<b>Figura 46.</b> Gráfico de Stern-Volmer para o processo de supressão estático.	<b>107</b>
<b>Figura 47.</b> Gráfico de Stern-Volmer para o processo de supressão estático/dinâmico para a mesma população de fluoróforo.	<b>107</b>
<b>Figura 48.</b> Gráfico de a) Stern-Volmer e b) Stern-Volmer modificado para a supressão de um sistema contendo mais de um fluoróforo, sendo um deles inacessível ao supressor.	<b>108</b>
<b>Figura 49.</b> Gráfico para a supressão de um sistema contendo mais de um fluoróforo, com a mesma capacidade de formação de uma interação com a molécula do supressor.	<b>110</b>
<b>Figura 50.</b> A) Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH e B) Espectro de emissão de fluorescência para solução de ASH; tamponada com PBS (pH = 7,4) na concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ M.	<b>118</b>
<b>Figura 51.</b> Espectros de dicroísmo circular de ASH (pH = 7,4), [ASH] = $1,00 \times 10^{-6}$ M, a T = 305 K, 310 K e 315 K.	<b>118</b>
<b>Figura 52.</b> a) Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ( $\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) ([ASH] = $1,00 \times 10^{-5}$ M. O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento), b) Distribuição dos Resíduos.	<b>119</b>
<b>Figura 53.</b> Estrutura para as tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS usadas nos estudos de interação com ASH.	<b>120</b>
<b>Figura 54.</b> Espectros mostrando a supressão da emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$ nm) para uma solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações das tiossemicarbazonas, [ASH] = $1,00 \times 10^{-5}$ M e [UTS] = [DFTS] = [TFTS] = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e $2,60 \times 10^{-5}$ M, a T = 310 K.	<b>120</b>

**Figura 55.** Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) pelas tiossemicarbazonas **a)** UTS, **b)** DFTS e **c)** TFTS. **122**

**Figura 56.** Gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) pelas tiossemicarbazonas **a)** UTS, **b)** DFTS e **c)** TFTS. **123**

**Figura 57.** Gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) pelas tiossemicarbazonas **a)** UTS, **b)** DFTS e **c)** TFTS. **124**

**Figura 58.** Gráficos de Stern Volmer modificado de duplo log ( $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$ ) para a supressão d fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) pelas tiossemicarbazonas **a)** UTS, **b)** DFTS e **c)** TFTS. **127**

**Figura 59.** Espectros de dicroísmo circular para ASH livre e complexada com: **a)** ASH:UTS, **b)** ASH:DFTS e **c)** ASH:TFTS em (pH = 7,4) a 310 K.  $[ASH] = 1,00 \times 10^{-6}$  M e  $[UTS] = [DFTS] = [TFTS] = 2,60 \times 10^{-5}$  M. **128**

**Figura 60.** Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm), para uma solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na ausência e na presença das tiossemicarbazonas: **a)** UTS, **b)** DFTS e **c)** TFTS,  $[ASH] = 1,00 \times 10^{-5}$  M e  $[UTS] = [DFTS] = [TFTS] = 0$  e  $2,6 \times 10^{-5}$  M, a T = 310 K. O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento). **130**

**Figura 61.** Gráficos de Stern–Volmer modificado para as interações: **a)** ASH:UTS, **b)** ASH:DFTS e **c)** ASH:TFTS na presença de marcadores de sítio varfarina, digitoxina e ibuprofeno a 310 K em (pH = 7,4).  $[ASH] = 1,00 \times 10^{-5}$  M,  $[UTS] = [DFTS] = [TFTS] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$  e  $2,60 \times 10^{-5}$  M. **131**

**Figura 62.** Espectros de fluorescência síncrona para ASH na ausência e na presença de **a)** UTS, **b)** DFTS e **c)** TFTS com **(I)**  $\Delta\lambda = 15$  nm para Tyr (A) e **(II)**  $\Delta\lambda = 60$  nm para Trp (A').  $[ASH] = 1,00 \times 10^{-5}$  M,  $[UTS] = [DFTS] = [TFTS] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$  e  $2,60 \times 10^{-5}$  M em solução PBS (pH= 7,4) a temperatura ambiente. **133**

**Figura 63.** Superposição da melhor pose de docagem para **a)** ASH/UTS, **b)** ASH/DFTS e **c)** ASH/TFTS no sítio I de Sudlow, obtido pelo programa GOLD 5.2 (função ChemPLP). A estrutura dos ligantes está representada em rosa, a cor verde é a estrutura ASH (PDB: 1N5U), os resíduos de aminoácidos selecionados estão em amarelo. Hidrogênio: branco; oxigênio: vermelho; nitrogênio: azul e enxofre: amarelo mostarda. **134**

**Figura 64.** Estrutura para os compostos derivados da metformina, MFCl, MFBr e MF3CF, usados nos estudos de interação com ASH. **135**

**Figura 65.** Espectros de absorção no UV-Vis para uma solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de derivados da metformina: **a)** MFCl, **b)** MFBr e **c)** MF3CF.  $[ASH] = 1,00 \times 10^{-5}$  M e  $[MFCl] = [MFBr] = [MF3CF] = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$  e  $2,60 \times 10^{-5}$  M. **135**

**Figura 66.** Espectros de supressão da emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) para uma solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações das metforminas **a)** MFCl, **b)** MFBr e **c)** MFCF3. [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$  e [MFCl] = [MFBBr] = [MFCF3] = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e  $2,60 \times 10^{-5} \text{ M}$ , a T = 310 K **136**

**Figura 67.** Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) pelos derivados da metformina: **a)** MFCl, **b)** MFBr e **c)** MFCF3. **137**

**Figura 68.** Gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) pelos derivados da metformina: **a)** MFCl, **b)** MFBr e **c)** MFCF3. **138**

**Figura 69.** Gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) pelos derivados da metformina: **a)** MFCl, **b)** MFBr e **c)** MFCF3. **140**

**Figura 70.** Gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) pelos derivados da metformina: **a)** MFCl, **b)** MFBr e **c)** MFCF3. **141**

**Figura 71.** Espectros de dicroísmo circular para ASH em solução tampão de PBS (pH = 7,4) e ASH/derivados de metformina: **a)** MFCl, **b)** MFBr e **c)** MFCF3, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:MFCl, ASH:MFBBr e ASH:MFCF3. [ASH] =  $1,00 \times 10^{-6} \text{ M}$  e [MFCl] = [MFBBr] = [MFCF3] = 0; 3,98; 7,94; 15,75 e  $31,01 \times 10^{-6} \text{ M}$ , a T = 310 K. **143**

**Figura 72.** Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações dos derivados da metformina: MFCl, MFBr e MFCF3 ([ASH] =  $1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$  e [MFCl] = [MFBBr] = [MFCF3] =  $2,6 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) a T = 310 K. O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento). **145**

**Figura 73.** Gráficos de Stern-Volmer modificado para as interações: **a)** ASH:MFCl, **b)** ASH:MFBBr e **c)** ASH:MFCF3 na presença de marcadores de sítio varfarina, digitoxina e ibuprofeno a 310 K e solução tampão de PBS (pH = 7,4). [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ , [MFCl] = [MFBBr] = [MFCF3] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e  $2,60 \times 10^{-5} \text{ M}$ . **146**

**Figura 74.** Espectros de fluorescência síncrona para ASH na ausência e na presença de **a)** MFCl, **b)** MFBr e **c)** MFCF3 com **(I)**  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  para Tyr e **(II)**  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  para Trp. [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ , [MFCl] = [MFBBr] = [MFCF3] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e  $2,60 \times 10^{-5} \text{ M}$  e pH = 7,4 a temperatura ambiente. **148**

**Figura 75.** a) Superposição da melhor pose de docagem para cada amostra dentro do sítio I. (b, c e d) Melhor pose de docagem para ASH:MFCl, ASH:MFBBr e ASH:MFCF3 (função ChemPLP), respectivamente. Resíduos de aminoácidos selecionados (Lys198, Phe 210, Trp214, Val342, Glu442, Arg450, Ser453 e Leu480); MFCl, MFBr e MFCF3 são representados como bastões em ciano, rosa, laranja e marrom, respectivamente. Cor dos elementos: hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, flúor, cloro e bromo em branco, azul escuro, vermelho, azul claro, verde e roxo, respectivamente. **149**

**Figura 76.** Mapeamento do potencial eletrostático molecular para os derivados da metformina a) MFCl, b) MFBr e c) MFCF3. **151**

**Figura 77.** Estrutura para o derivado de chalcona 4-bromoindolilchalcona (IC9) usado no estudo da interação com ASH. **152**

**Figura 78.** Espectros de absorção no UV-Vis para uma solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações da 4-bromoindolilchalcona (IC9). [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M e [IC9] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e  $1,32 \times 10^{-5}$  M. **152**

**Figura 79.** Espectros de supressão da emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para uma solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diferentes concentrações de 4-bromoindolilchalcona (IC9). [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M e [IC9] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e  $1,32 \times 10^{-5}$  M, a T = 310 K. **153**

**Figura 80.** Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) por 4-bromoindolilchalcona (IC9). **154**

**Figura 81.** Gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) por 4-bromoindolilchalcona (IC9). **155**

**Figura 82.** Gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) por 4-bromoindolilchalcona (IC9). **157**

**Figura 83.** Gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelo derivado da chalcona IC9. **158**

**Figura 84.** a) Decaimento para a fluorescência resolvida no tempo para uma solução de ASH contendo IC9. [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M, [IC9] =  $1,32 \times 10^{-5}$  M, a temperatura ambiente. O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento), b) Distribuição dos Resíduo **160**

**Figura 85.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) e para o complexo ASH/IC9, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de IC9/ASH, [ASH] =  $1,00 \times 10^{-6}$  M e [IC9] = 0; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01 ( $\times 10^{-6}$ ) M, a T = 310 K. **161**

**Figura 86.** Gráficos de Stern-Volmer modificados para a associação ASH/IC9 na presença de varfarina, ibuprofeno e digitoxina, em pH=7,4 e 310K. [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M e [IC9] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e  $1,32 \times 10^{-5}$  M. **163**

**Figura 87.** Espectros de fluorescência síncrona para ASH na ausência e na presença de IC9, com: a)  $\Delta\lambda = 15$  nm para Tyr e b)  $\Delta\lambda = 60$  nm para Trp. [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M, [MFCl] = [MFBr] = [MFCF<sub>3</sub>] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e  $1,32 \times 10^{-5}$  M e pH= 7,4; a temperatura ambiente. **164**

**Figura 88.** Projeções espectrais de fluorescência 3D (A e B) e seus correspondentes mapas de contorno (A' e B') para ASH (A e A') e ASH:IC9 (B e B'), a temperatura ambiente e em solução de PBS. [ASH]= $1,00 \times 10^{-6}$  M e [IC9]= $1,32 \times 10^{-5}$  M. **165**

**Figura 89.** Superposição da melhor pose de docagem para ASH:IC9 no sítio I de Sudlow, obtido pelo programa GOLD 5.2 (função ChemPLP). A estrutura dos ligantes está representada em rosa, a cor verde é a estrutura ASH (PDB: 1N5U), os resíduos de aminoácidos selecionados estão em amarelo; hidrogênio: branco; oxigênio: vermelho; nitrogênio: azul e enxofre: amarelo mostarda. **166**

**Figura 90.** Superfície do potencial eletrostático molecular para o composto IC9. **168**

**Figura 91.** Estrutura para os derivados metoxilados da xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT usados nos estudos de interação com ASH. **169**

**Figura 92.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações dos derivados de xantona **a)** 1MXT, **b)** 2MXT, **c)** 4MXT, **d)** 23MXT e **e)** 34MXT; [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M e [1MXT] = [2MXT] = [4MXT] = 0,49; 0,99; 1,47; 1,96; 2,46; 2,91; 3,38 e  $3,84 \times 10^{-5}$  M e [23MXT] = [34MXT] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e  $2,60 \times 10^{-5}$  M a temperatura de (310 K). **170**

**Figura 93.** Espectros de supressão da emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações dos derivados de xantonas **a)** 1MXT, **b)** 2MXT, **c)** 4MXT, **d)** 23MXT e **e)** 34MXT). [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M, [1MXT] = [2MXT] = [4MXT] = [23MXT] = [34MXT] = 0,49; 0,99; 1,47; 1,96; 2,46; 2,91; 3,38 e  $3,84 \times 10^{-5}$  M e [23MXT] = [34MXT] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e  $2,60 \times 10^{-5}$  M na temperatura de (310 K). **171**

**Figura 94.** Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados de xantona **a)** 1MXT, **b)** 2MXT, **c)** 4MXT, **d)** 23MXT e **e)** 34MXT. **173**

**Figura 95.** Gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados de xantona: **a)** 1MXT, **b)** 2MXT, **c)** 4MXT, **d)** 23MXT e **e)** 34MXT. **174**

**Figura 96.** Gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados de xantona **a)** 1MXT, **b)** 2MXT, **c)** 4MXT, **d)** 23MXT e **e)** 34MXT. **176**

**Figura 97.** Gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados de xantona **a)** 1MXT, **b)** 2MXT, **c)** 4MXT, **d)** 2,3MXT e **e)** 3,4MXT. **179**

**Figura 98.** Espectros de dicroísmo circular para a interação entre ASH (pH = 7,4) e derivados de xantona (1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:1MXT, ASH:2MXT, ASH:4MXT, ASH:23MXT e ASH:34MXT [ASH] =  $1,00 \times 10^{-6}$  M e [1MXT] = [2MXT] = [4MXT] = [23MXT] = [34MXT] = 0; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01 ( $\times 10^{-6}$ ) M, a T = 310 K. **181**

**Figura 99.** Gráficos de Stern–Volmer modificado para as interações ASH:1-MXT, ASH:2-MXT e ASH:4-MXT, respectivamente, na presença de marcadores de sítio varfarina, digitoxina e ibuprofeno a 310 K e pH = 7,4. [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M, [1MXT] = [2MXT] = [4MXT] = 0,49; 0,99; 1,47; 1,96; 2,46; 2,91; 3,38 e  $3,84 \times 10^{-5}$  M e [23MXT] = [34MXT] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e  $2,60 \times 10^{-5}$  M. **184**

**Figura 100.** Melhor pose de pontuação de docagem para a) ASH:1MXT no sítio I de Sudlow, b) ASH:2MXT no sítio I de Sudlow, c) ASH:4MXT no sítio I de Sudlow, d) ASH:23MXT no sítio II de Sudlow e, e) ASH:34MXT no sítio II de Sudlow, obtido pelo programa GOLD 2022.3.0 (função ChemPLP). A estrutura do ligante está representada em laranja, os resíduos de aminoácidos selecionados (estão em azul claro; oxigênio: vermelho; e nitrogênio: azul escuro). As interações hidrofóbicas estão representadas por linhas pontilhadas em cinza, as interações de ligação de hidrogênio estão representadas em linhas contínuas em azul e as interações de empilhamento  $\pi$  estão representadas em linhas tracejadas em verde. **188**

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Proteínas</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Aminoácidos com cadeias laterais não polares e alifáticas</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Aminoácidos com cadeias laterais aromáticas</b>	<b>5</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas</b>	<b>6</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente em pH fisiológico (ácidos)</b>	<b>7</b>
<b>2.1.5</b>	<b>Aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente em pH fisiológico (básicos)</b>	<b>7</b>
<b>2.2</b>	<b>Albumina Sérica Humana (ASH)</b>	<b>11</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Estrutura química da ASH</b>	<b>17</b>
<b>2.2.2</b>	<b>sítios de interação de ácidos graxos</b>	<b>22</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Os sítios de interação primários para compostos endógenos e exógenos</b>	<b>27</b>
<b>2.2.3.1</b>	<b>O sítio de interação I de Sudlow (subdomínio IIA)</b>	<b>29</b>
<b>2.2.3.2</b>	<b>O sítio de interação II de Sudlow (subdomínio IIIA)</b>	<b>32</b>
<b>2.2.3.3</b>	<b>O sítio de interação III (subdomínio IB)</b>	<b>32</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Resíduo de Cys34 livre</b>	<b>33</b>
<b>2.2.5</b>	<b>A atividade pseudoenzimática da ASH</b>	<b>34</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Módulo de interação com ASH semelhante à proteína G</b>	<b>36</b>
<b>2.2.7</b>	<b>Efeito alostérico para ASH</b>	<b>38</b>
<b>2.2.8</b>	<b>Albumina como carreador de fármacos ou compostos biologicamente /farmacologicamente ativos</b>	<b>38</b>
<b>2.3</b>	<b>Propriedades de proteínas fluorescentes</b>	<b>41</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Propriedades espectrais dos aminoácidos aromáticos</b>	<b>42</b>
<b>2.4</b>	<b>Estudos da interação de compostos bioativos com ASH realizados no Laboratório de Fotoquímica do Instituto de Química da UFRRJ</b>	<b>46</b>
<b>2.5</b>	<b>Moléculas Bioativas</b>	<b>55</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Tiossemicarbazonas</b>	<b>55</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Metforminas</b>	<b>62</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Chalconas</b>	<b>68</b>
<b>2.5.4</b>	<b>Xantonas</b>	<b>74</b>

<b>3 OBJETIVO</b>	<b>78</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>79</b>
4.1 Materiais	79
4.1.1 Aparelhos	79
4.1.2 Vidraria	79
4.1.3 Reagentes	80
4.2 Métodos de análise	81
4.2.1 Soluções	81
4.2.2 Estudos espectroscópicos na região do ultravioleta/visível	81
4.2.3 Estudos espectroscópicos de emissão de fluorescência	82
4.2.4 Correção do efeito filtro interno	82
4.2.5 Estudos espectroscópicos de fluorescência resolvida no tempo	82
4.2.6 Estudos espectroscópicos de dicroísmo circular	83
4.2.7 Estudos espectroscópicos de fluorescência sincronizada	83
4.2.8 Estudos espectroscópicos de emissão de fluorescência tridimensional	83
4.2.9 Estudos espectroscópicos de competição	84
4.2.10. Estudos teóricos de docagem molecular	87
4.2.11 Estudos teóricos de cálculo químico quântico	88
4.3 A espectroscopia de absorção, emissão de fluorescência e suas aplicações em experimentos de supressão	89
4.3.1 Absorção de luz no ultravioleta-visível (UV-Vis)	89
4.3.2 Absorção de luz circularmente polarizada (Dicroísmo Circular)	90
4.3.2.1 Cálculos da porcentagem de estrutura hélice- $\alpha$	93
4.3.3 A espectroscopia de emissão de fluorescência	94
4.3.3.1 Tempo de vida e rendimento quântico de fluorescência	97
4.3.3.2 Fluorescência resolvida no tempo	100
4.3.4 Os mecanismos de supressão de fluorescência	102
4.3.4.1 O processo de supressão – A Equação de Stern Volmer	104
4.3.4.2 Análise de caso para os experimentos de supressão de fluorescência	111
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>117</b>
5.1 Albumina sérica humana (ASH)	118
5.2 As Tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS	120
5.2.1 Estudo de supressão de fluorescência da ASH pelas tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS	120
5.2.2 Dicroísmo circular (DC) para as tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS	127



5.2.3 Estudos da supressão de fluorescência resolvida no tempo para ASH em presença das tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS	<b>129</b>
5.2.4 Estudos de interação competitiva para as tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS	<b>130</b>
5.2.5 Estudo de supressão de fluorescência síncrona para ASH em presença das tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS	<b>132</b>
5.2.6 Estudos de docagem molecular para as tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS	<b>133</b>
5.3 Os derivados de Metformina MFC, MFBr e MFCF3	<b>135</b>
5.3.1 Estudos de espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis) para ASH em presença dos derivados da metformina	<b>135</b>
5.3.2 Estudo de supressão de fluorescência para ASH em presença dos derivados da metformina	<b>136</b>
5.3.3 Estudos de espectroscopia de dicroísmo circular (DC) para ASH em presença dos derivados da metformina	<b>142</b>
5.3.4 Estudos da supressão de fluorescência resolvida no tempo para ASH em presença dos derivados da metformina	<b>145</b>
5.3.5 Estudos de interação competitiva para ASH em presença dos derivados da metformina	<b>146</b>
5.3.6 Estudo de supressão de fluorescência síncrona para ASH em presença dos derivados da metformina	<b>147</b>
5.3.7 Estudos teórico de docagem molecular para ASH em presença dos derivados da metformina	<b>148</b>
5.3.8 Estudo teórico de cálculo químico quântico	<b>150</b>
5.4 O derivado de Chalcona 4-Bromoindolilchalcona (IC9)	<b>152</b>
5.4.1 Estudos de espectroscopia na região do ultravioleta/visível (UV-Vis) para ASH em presença da 4-Bromoindolilchalcona (IC9)	<b>152</b>
5.4.2 Estudo de supressão de fluorescência para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)	<b>153</b>
5.4.33 Estudos da supressão de fluorescência resolvida no tempo para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)	<b>159</b>
5.4.4 Estudo espectroscópico de dicroísmo circular (DC) para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)	<b>160</b>
5.4.5 Estudos de interação competitiva para ASH em presença de 4-Bromoindolilchalcona (IC9)	<b>162</b>
5.4.6 Estudo de supressão de fluorescência síncrona para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)	<b>163</b>
5.4.7 Estudo de supressão de fluorescência tridimensional para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)	<b>164</b>
5.4.8 Estudos teóricos de docagem molecular para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)	<b>165</b>

<b>5.4.9</b> Estudo teórico de cálculo químico quântico para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)	<b>166</b>
<b>5.5</b> Xantonas	<b>169</b>
<b>5.5.1</b> Estudos de espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis) para ASH em presença dos derivados da xantona	<b>170</b>
<b>5.5.2</b> Estudo de supressão de fluorescência para ASH em presença dos derivados da xantona	<b>171</b>
<b>5.5.3</b> Estudo espectroscópico de dicroísmo circular (DC) para ASH em presença dos derivados da xantona	<b>180</b>
<b>5.5.4</b> Estudos de interação competitiva para ASH em presença dos derivados da xantona	<b>183</b>
<b>5.5.5</b> Estudo de docagem molecular para ASH em presença de derivados de xantona	<b>185</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>191</b>
<b>6.1</b> Conclusão para os derivados da tiossemicarbazona	<b>191</b>
<b>6.2</b> Conclusão para os derivados da metformina	<b>192</b>
<b>6.3</b> Conclusão para análogo da chalcona	<b>193</b>
<b>6.4</b> Conclusão para os derivados da xantona	<b>194</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>196</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A liberação controlada de agentes terapêuticos no local de áreas de doença e na dosagem desejada é de importância clínica para garantir a consequência terapêutica e diagnóstica, minimizando a resistência ao fármaco e outros efeitos colaterais no processo de tratamento. [Sui, 2011; Kievit, 2011; Peer, 2007; Liu, 2015]

A distribuição de fármacos nos tecidos e órgãos depende de suas propriedades físico-químicas e de vários fatores fisiológicos, incluindo permeabilidade vascular, fluxo sanguíneo, débito cardíaco e perfusão do (s) tecido (s) alvo e/ou órgão (s). [Goodman, 2011] Os fármacos circulam no fluxo sanguíneo não ligados ou ligados às proteínas plasmáticas, sendo a albumina sérica humana (ASH) o principal transportador de fármacos com característica ácida, enquanto a  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida liga-se principalmente fármacos com característica básica.

As proteínas plasmáticas afetam as propriedades farmacocinéticas dos fármacos influenciando a sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção. [Lindup, 1981; Schmidt, 2010; Ascenzi, 2014] Em particular, as proteínas plasmáticas: (i) facilitam a absorção do fármaco, contribuindo para manter o gradiente de concentração do fármaco livre entre o sítio de absorção e a corrente sanguínea; (ii) aumentam a solubilidade aparente dos fármacos lipofílicos, permitindo que eles atinjam seu local de ação; (iii) afetam o metabolismo e a excreção do fármaco, facilitando o seu transporte para os órgãos metabolizadores e excretadores; e (iv) influenciam as propriedades farmacodinâmicas dos fármacos. [Goodman, 2011; D'Arcy, 1982]

A quantidade de fármaco que se liga às proteínas plasmáticas depende da sua concentração, da sua afinidade com a proteína e do número de sítios de interação disponíveis. Normalmente, um fármaco é considerado altamente ligado às proteínas plasmáticas quando a fração ligada excede 90% da sua concentração total. [Ascenzi, 2014; Leboffe, 2020]

Além do seu papel de transporte, a albumina sérica humana (ASH) também tem sido relatada recentemente como tendo muitos papéis importantes no desenvolvimento farmacoterapêutico. Devido à sua promissora capacidade de interação intrínseca com fármacos, a ASH oferece características favoráveis e pode ser usada diretamente como sua fórmula monomérica ou pode ser fabricada em plataformas de nanopartículas baseadas em proteínas para realizar a entrega eficaz de moléculas terapêuticas em áreas de doenças específicas. Além disso, o ASH também pode servir como um estabilizador de proteínas ou frações responsivas ao ambiente para hibridizar com os materiais funcionais, incluindo

polímeros ou nanopartículas inorgânicas por meio de reações covalentes ou interações eletrostáticas e, assim, alterar grandemente a distribuição biológica relevante e o comportamento farmacocinético para melhorar a sua eficácia terapêutica. [Liu, 2015]

A eficácia no transporte da ASH é classificada de acordo com a sua energia de interação, podendo ser fraca ~ - 5 a - 6,7 kcal/mol, moderada ~ - 6,9 a - 9,5 kcal/mol e forte variando de - 9,7 a -12,1 kcal/mol. [Gurung, 2022] A interação do fármaco ao ASH é uma consideração importante no desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas e também auxilia na compreensão dos mecanismos subjacentes que governam seus efeitos farmacológicos, tornando assim fundamental a investigação do processo de interação de ASH com moléculas candidatas para as mais variadas doenças, identificando os seus supostos locais de interação, energias de interação e resíduos de interação. [Gurung, 2022]

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Proteínas

As proteínas são biomoléculas compostas por uma ou mais cadeias polipeptídicas dobradas em uma forma globular ou fibrosa. Uma unidade polipeptídica é uma única cadeia polimérica linear de aminoácidos unidos por ligações peptídicas entre os grupos carboxila e amino de resíduos de aminoácidos adjacentes. Um aminoácido é uma molécula que contém na sua estrutura os grupos funcionais amina e ácido carboxílico. Em bioquímica, este termo geral refere-se aos aminoácidos alfa, ou seja, aqueles em que as funções amônio ( $\text{NH}_3^+$ ) e carboxilato ( $\text{COO}^-$ ) estão ligadas ao mesmo carbono. [Lehninger, 1993]

As diferentes estruturas das proteínas são o resultado de diferentes combinações dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente (Tabela 1). Os aminoácidos especiais, secundários ou raros são aqueles que ocorrem apenas em certos tipos de proteínas, sendo normalmente derivados dos aminoácidos padrões, como por exemplo, 4-hidroxiprolina e 5-hidroxilisina (colágeno), N-metil-lisina (miosina),  $\gamma$ -carboxiglutamato (protrombina) e desmosina (elastina). [Lehninger, 1993]

**Tabela 1.** Valor para constante de dissociação (pK) e ponto isoeletrônico (pI) dos aminoácidos normalmente encontrados em proteínas. [Lehninger, 1993]

Abreviações			pK			
Aminoácido	Comum	Letra	$\alpha$ -COOH	$\alpha$ -NH <sub>3</sub>	Outro (R)	pI
Alanina	Ala	A	2,34	9,69	-	6,01
Arginina	Arg	R	2,17	9,04	12,48 (guanidino)	10,76
Aspartato	Asp	D	1,88	9,60	3,65 (carboxil)	2,77
Asparagina	Asn	N	2,02	8,80	-	5,41
Glutamato	Glu	E	2,19	9,67	4,25 (carboxil)	3,22
Glutamina	Gln	Q	2,17	9,13	-	5,65
Cisteína	Cys	C	1,96	10,28	8,18 (sulfidril)	5,07
Fenilalanina	Phe	F	1,83	9,13	-	5,48
Glicina	Gly	G	2,34	9,60	-	5,97
Histidina	His	H	1,82	9,17	6,0 (imidazol)	7,59
Isoleucina	Ile	I	2,36	9,68	-	6,02
Leucina	Leu	L	2,36	9,60	-	5,98
Lisina	Lys	K	2,18	8,95	10,53 ( $\epsilon$ -amino)	9,74
Metionina	Met	M	2,28	9,21	-	5,74
Prolina	Pro	P	1,99	10,96	-	6,48
Serina	Ser	S	2,21	9,15	-	5,68
Tirosina	Tyr	Y	2,20	9,11	10,07 (fenol)	5,66
Treonina	Thr	T	2,11	9,62	-	5,87
Triptofano	Trp	W	2,38	9,39	-	5,89
Valina	Val	V	2,32	9,62	-	5,97

Os aminoácidos apresentam as seguintes propriedades gerais:

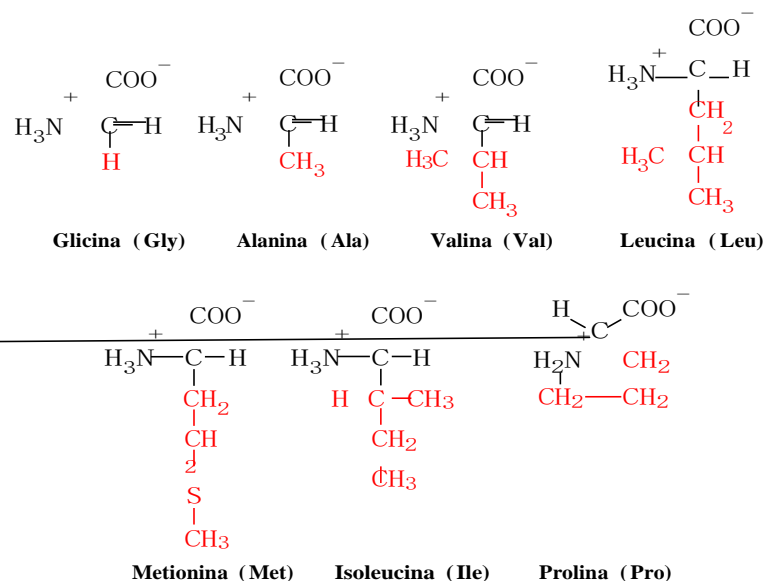
- a) Com exceção da glicina, todos os aminoácidos são opticamente ativos, ou seja, desviam o plano da luz polarizada.
- b) As configurações absolutas de açúcares simples e aminoácidos são especificadas pelo sistema D/L. Os  $\alpha$ -aminoácidos que constituem as proteínas têm a configuração estereoquímica L. Os D-aminoácidos são encontrados em alguns antibióticos: valinomicina e actinomicina D, e em paredes de algumas bactérias, como o peptidoglicano.
- c) A cadeia lateral (R) determina as propriedades de cada aminoácido.

Os  $\alpha$ -aminoácidos são divididos em classes, com base na natureza das cadeias laterais (grupo R). Os 20 tipos de cadeias laterais dos aminoácidos proteicos variam em tamanho, forma, carga, capacidade de formação de interações de hidrogênio, características hidrofóbicas e reatividade química. [Lehninger, 1993]

### **2.1.1 Aminoácidos com cadeias laterais não polares e alifáticas**

*(glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina)*

Os grupos R nessa classe de aminoácidos são hidrofóbicos e não polares (Figura 1). As cadeias laterais volumosas da alanina, valina, leucina e isoleucina, com suas formas estruturais específicas, desempenham papel fundamental na estabilização da estrutura secundária das proteínas pela promoção de interações hidrofóbicas em seu interior. A glicina é o aminoácido de estrutura mais simples, apresentando dois hidrogênios ligados ao carbono  $\alpha$ , não contribuindo efetivamente para a existência de interações hidrofóbicas. Além dessas interações hidrofóbicas, podemos destacar ainda a metionina, que apresenta um grupamento tioéter na cadeia lateral, e a prolina que possui uma estrutura cíclica (grupo imino) que leva à redução da flexibilidade local na região polipeptídica que a contém. [Lehninger, 1993]



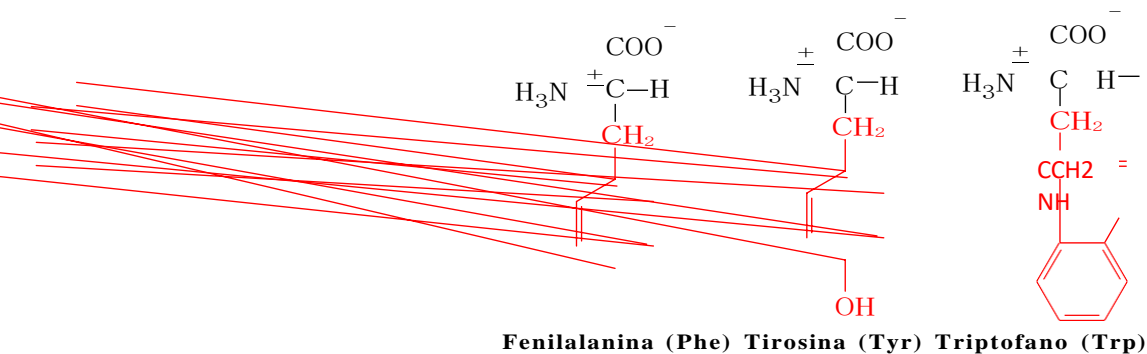
**Figura 1.** Estruturas dos aminoácidos com cadeias laterais não polares e alifáticas.

### 2.1.2 Aminoácidos com cadeias laterais aromáticas

(fenilalanina, tirosina, triptofano)

Os  $\alpha$ -aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (Figura 2) possuem em sua cadeia lateral grupos substituintes aromáticos e podem ser classificados como relativamente apolares (hidrofóbicos), podendo ainda desenvolver, quando possível, interações do tipo *empilhamento*  $\pi$  e tipo-T. Em alguns casos, como o da tirosina, que possui uma hidroxila fenólica, pode-se observar a formação de interações de hidrogênio e de reações de desprotonação, resultando em fenolatos, sendo, por isso, um grupo funcional importante na atividade de algumas enzimas. Já o  $\alpha$ -aminoácido triptofano, que possui um anel indólico, apresenta um ligeiro momento dipolar como consequência da sua estrutura química, sendo também capaz de fazer interações de hidrogênio relativamente fracas. [Lehninger, 1993]

Devido ao fato do triptofano, tirosina e fenilalanina apresentarem sistemas cromofóricos, esses podem absorver luz na região ultravioleta baixo do espectro (250 a 300 nm). A presença destes aminoácidos é responsável pela absorção da luz por proteínas no comprimento de onda próximo a 280 nm. [Lehninger, 1993]



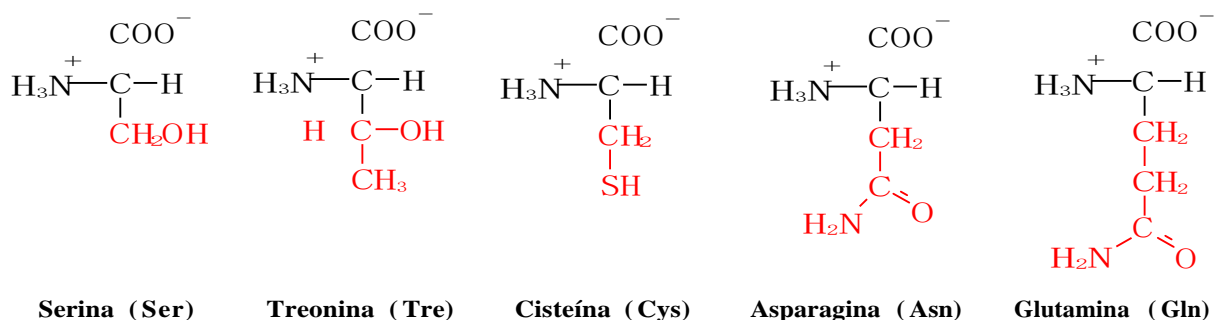
**Figura 2.** Estrutura dos aminoácidos com cadeias laterais aromáticas.

### 2.1.3 Aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas

(serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina)

A cadeia lateral R dos  $\alpha$ -aminoácidos serina, treonina, cisteína, asparagina e glutamina (Figura 3) apresenta grupo funcional “hidrogênio prótico” capaz de estabelecer interações por ligação de hidrogênio com a água e, conseqüentemente, tornando esses compostos mais solúveis em ambiente hidrofílico. A polaridade da serina e da treonina é devida a seus respectivos grupos hidroxila; a da cisteína, a seu grupo sulfidríla; e a da asparagina e da glutamina, a seus grupos amida. [Lehninger, 1993]

A cisteína é facilmente oxidada a cistina, um aminoácido dimérico, no qual duas moléculas de cisteína estão unidas covalentemente por uma interação dissulfeto. Os resíduos unidos por interação dissulfeto são fortemente hidrofóbicos (apolares), que têm um papel importante na estabilização de estruturas de muitas proteínas, em virtude de formação de ligações covalentes entre diferentes partes de uma molécula proteica ou entre duas cadeias proteicas distintas. [Lehninger, 1993]

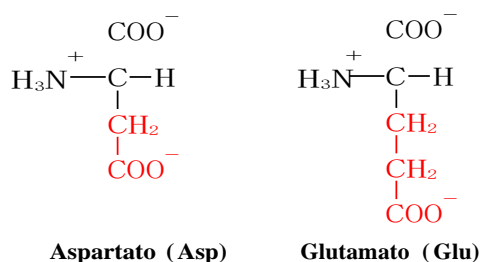


**Figura 3.** Estruturas dos aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas.



### 2.1.4 Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente em pH fisiológico (ácidos) (*aspartato*, *glutamato*)

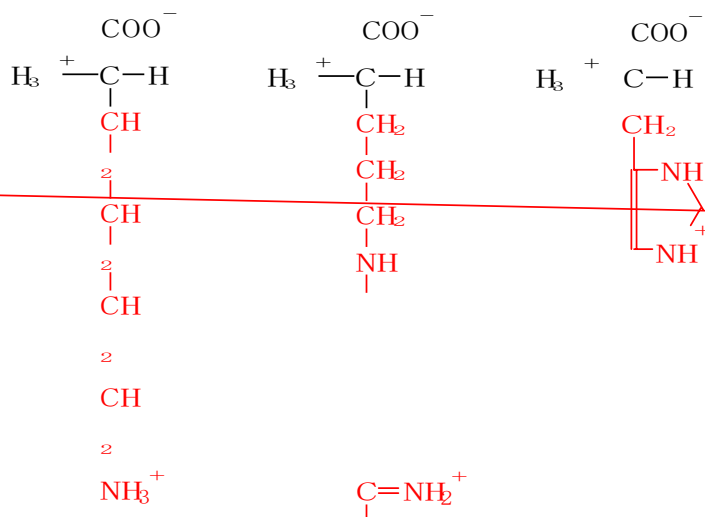
Em pH fisiológico (pH=7) os  $\alpha$ -aminoácidos aspartato e glutamato têm uma carga líquida negativa, sendo caracterizados pela presença em sua estrutura de um segundo grupo carboxila que está desprotonado (Figura 4). [Lehninger, 1993]



**Figura 4.** Estruturas dos aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente em pH fisiológico.

### 2.1.5 Aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente em pH fisiológico (básicos) (*arginina*, *lisina*, *histidina*)

As cadeias laterais R com características mais hidrofílicas (Figura 5) são aquelas carregadas positiva ou negativamente. Os aminoácidos que sustentam em sua estrutura uma carga positiva líquida em pH fisiológico (pH = 7,0) e, conseqüentemente, encontram-se protonados, são a lisina e a arginina que apresentam um grupo butilamônio e um grupo guanidino, respectivamente. O  $\alpha$ -aminoácido histidina, que contém um grupo imidazol, tem como característica possuir uma cadeia lateral com  $pK_a$  próximo da neutralidade, facilitando reações catalisadas por enzimas ao servir como doador ou aceptor de prótons. [Lehninger, 1993]



$\text{NH}_2$   
**Lisina (Lys)      Arginina (Arg)      Histidina (His)**

**Figura 5.** Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente em pH fisiológico.

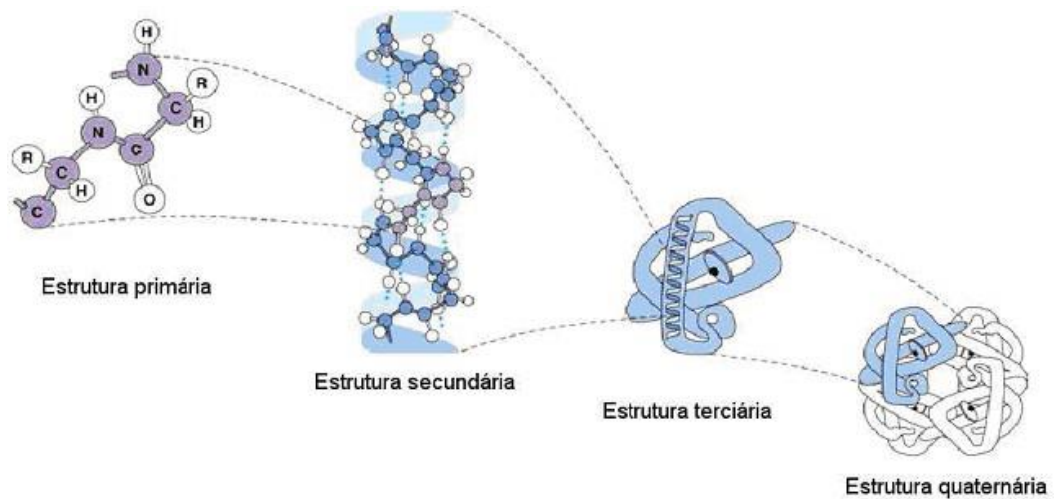
Os diferentes números e sequências de aminoácidos nas proteínas permitem que elas adotem diferentes estruturas 3D e possuam funções biológicas únicas. [Berg, 2002] Entre as mais importantes dessas funções biológicas estão a catálise de reações bioquímicas, a geração de sinais celulares e o transporte de ligantes. [Abou-Zied, 2015]

- *Proteínas globulares*: são proteínas em que as cadeias de aminoácidos se voltam sobre elas mesmas, formando um conjunto compacto que tem forma esferóide ou elipsóide, em que os três eixos da molécula tendem a ser de tamanhos similares. Em geral, são proteínas de grande atividade funcional, como por exemplo, as enzimas, os anticorpos, os hormônios, a hemoglobina; são solúveis em meio aquoso. [Lehninger, 1993; Stryer, 1995; Dose, 1982]
- *Proteínas fibrosas*: são proteínas em que as cadeias de aminoácidos se ordenam de maneira paralela, formando fibras ou lâminas estendidas, nas quais o eixo longitudinal predomina sobre os transversais. Em geral, são pouco solúveis em água e participam na formação de estruturas de sustentação, como as fibras do tecido conjuntivo e outras formações de tecidos de grande resistência mecânica. [Lehninger, 1993; Stryer, 1995; Dose, 1982]

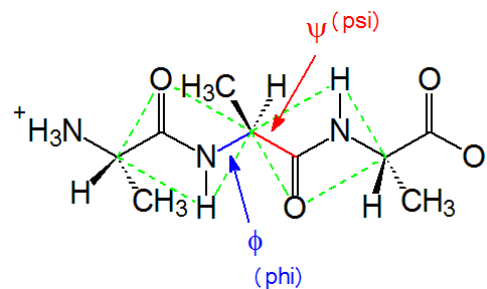
A estrutura molecular das proteínas é muito complexa, por essa razão é conveniente dividi-la em níveis distintos de organização: estruturas primária, secundária, terciária e quaternária (Figura 6). [Lehninger, 1993; Stryer, 1995; Dose, 1982]

- a) estrutura primária – está correlacionada com a sequência de aminoácidos sendo que as cadeias não apresentam ramificações (Figura 6);
- b) estrutura secundária – estabelece a sua conformação em relação aos ângulos diedro  $\psi$ -(C $\alpha$ -N) e  $\phi$ -(C-C $\alpha$ ) (Figura 7), a qual é geralmente mantida por interações de hidrogênio gerando a hélice- $\alpha$ , folha- $\beta$ , alças- $\beta$  e  $\gamma$  e regiões de estruturas desordenadas (Figura 8);
- c) estrutura terciária – caracterizada pela sua disposição tridimensional completa que se forma a partir das forças de atração ou repulsão eletrostática, das interações de hidrogênio, das forças de van der Waals e das pontes de dissulfeto existentes entre os resíduos de aminoácidos que formam as cadeias (Figura 9a); e
- d) estrutura quaternária – é formada por oligômeros tridimensionais, que podem ser compostos por várias moléculas separadas, mas entrelaçadas em estrutura terciária que estabelecem entre elas - ligações hidrogênio, atrações eletrostáticas, interações hidrofóbicas

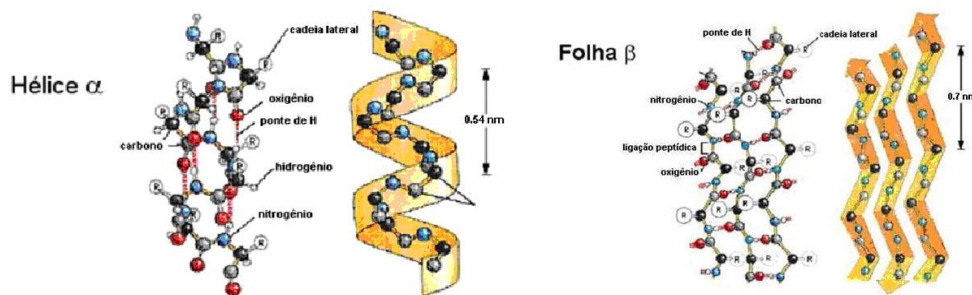
e/ou pontes de dissulfeto entre cisteínas de cadeias diferentes. Um exemplo deste tipo de estrutura é a albumina humana, que apresenta estrutura quaternária composta por duas estruturas terciárias gerando uma proteína globular (Figura 9b).



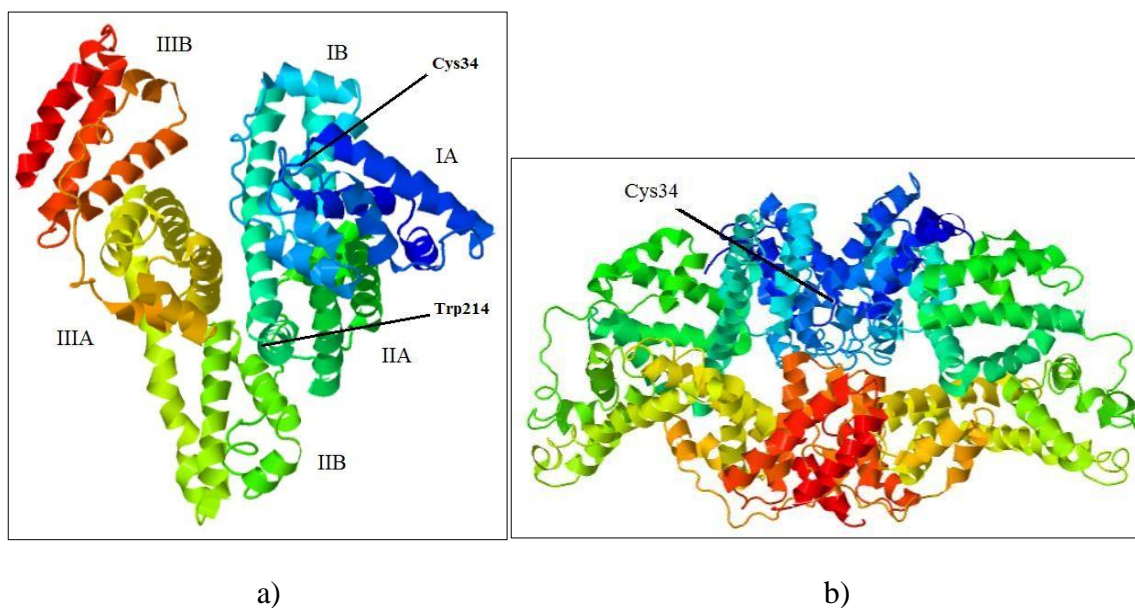
**Figura 6.** Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína. [Lehninger, 1993]



**Figura 7.** Estrutura primária de uma proteína caracterizada pela formação de uma interação peptídica-β. [Lehninger, 1993]



**Figura 8.** Estrutura secundária para uma proteína tipo: a) hélice-α e b) folha-β. [Lehninger, 1993]



**Figura 9. a)** Estrutura terciária da ASH, ilustrando a localização dos resíduos de aminoácidos Cys34 e Trp214 e dos subdomínios, codificados por cores: IA-azul escuro; IB– azul claro; IIA, verde escuro; IIB-verde claro; IIIA-amarelo; IIIB-vermelho, [PDB ID,1AO6] **b)** Representação da estrutura quaternária da ASH [PDB ID, 3JQZ] com os resíduos de cisteína em destaque (construída a partir das coordenadas 1BM0, disponíveis no PDB –Protein Data Bank).

## 2.2 Albumina Sérica Humana (ASH)

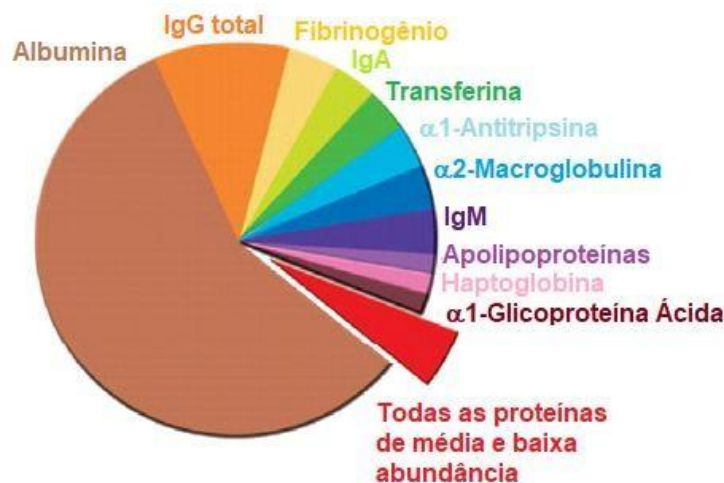
A albumina sérica humana (ASH) se enquadra em uma classe de proteínas monoméricas não glicosiladas que são capazes de transportar pelo corpo humano compostos endógenos e exógenos incluindo inúmeros compostos bioativos. [Alberts, 2002; Carter, 1994; Abou-Zied, 2015] Como a albumina sérica humana (ASH), é uma macromolécula multidomínio, [Peters, 1995; Evans, 2002; Mendez, 2005a; Fanali, 2012] ela possui outras propriedades importantes, como atividade de enolase [Drmanovic 1999; Matsushita 2004], atividade de aril acilamidase [Manoharan, 2006; Masson, 2007; Smith, 1992], atividade de esterase [Sakurai, 2004; Ge, 2013; Ascenzi, 2012; Komatsu, 2012a], atividade antioxidante [Gum, 2004; Faure, 2008; Bar-Or, 2001; Roche, 2008], reações de condensação [Benedetti, 2011; Sharma, 2013], e estereoespecificidade [Tsuda, 2001; Georges, 2000; Dubois-Presle, 1995]. A sua atividade semelhante à esterase é a mais importante das suas propriedades. [Wang, 2015; Gou, 2016]

O nome albumina deriva do termo alemão antigo albumina, geralmente indicando proteínas. O albúmen, por outro lado, deriva da palavra latina albus (branco) que indica a parte branca do ovo cozido que envolve a gema. O componente proteico da clara de ovo faz parte de um grupo heterogêneo de proteínas, amplamente indicadas como albuminas, incluindo albumina sérica (AS), albumina do leite, proteínas urinárias e a secreção do caramujo. [Fanali, 2012] Mais especificamente, AS é um membro de uma família de proteínas homólogas descritas por características estruturais distintas e propriedades peculiares de interação com o ligante. [Fanali, 2012]

A ASH pertence a uma família multigênica de proteínas que inclui  $\alpha$ -famina (AFM), também denominada  $\alpha$ -albumina e  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), a proteína de interação à vitamina D (DBP). [Carter, 1994; Hervé, 1994] As albuminas no soro foram inicialmente definidas como proteínas solúveis em água na ausência de sais, em contraste com as globulinas que são insolúveis nessas condições. [Peters, 1995; Fasano, 2007; Fanali, 2012; Becker, 2004; Abou-Zied, 2015]

A ASH é uma das menores proteínas plasmáticas, no entanto é a mais abundante (~0,6 mM) compreendendo cerca de 50-60% da proteína plasmática total em humanos (Figura 10). [Berde, 1979; Abou-Zied, 2015; Sugio, 1999; Liu, 2015; Kratz, 2008] A concentração normal de ASH varia entre 35 e 50 g/l. [Peters, 1995; Choi, 2004; Rabbani 2019] A concentração normal de ASH na saliva é inferior a 0,5 mg/ml, com uma concentração maior de albumina glicada na saliva geralmente indicando diabetes mellitus tipo 2. [Vaziri, 2009; Rabbani, 2019]

A albumina é uma proteína ácida, muito solúvel e extremamente robusta: é estável na faixa de pH de 4 a 9, solúvel em 40% de etanol e pode ser aquecida a 60 °C por até 10 horas sem efeitos sobre o processo de desnaturação. [Fasano, 2005; Bertucci, 2002; Kratz, 2008; Liu, 2015]



**Figura 10.** Visão geral das principais proteínas plasmáticas humanas que podem ser identificadas por técnicas eletroforéticas simples. [Fanali, 2012]

A ASH também é responsável em grande parte pela manutenção do pH sanguíneo. [Figge, 1991] Isso se deve aos 16 resíduos de histidina na albumina que possuem valores de  $pK_a$  com uma faixa de (4,85-7,49). O grupo imidazol da histidina reage com  $H^+$ . [Watson, 1999; Abou-Zied, 2015] A ASH atua como um tampão de plasma eficaz devido à presença de muitos resíduos carregados. A albumina em solução de água deionizada possui um ponto isoeletrônico a aproximadamente pH 5,2. Nesse pH, praticamente todos os grupos ácidos carboxílicos são desprotonados e os grupos amino, guanidino e imidazol são protonados. Com isso, esse pH também corresponde ao ponto de carga máxima calculada, com cerca de um total de 100 cargas positivas e negativas. No entanto, a carga total exata é desconhecida, pois alguns grupos carboxila podem estar não ionizados (protonados) ou se ligando por interações de hidrogênio a grupos amino, guanidino e imidazol.

O ponto isoeletrônico é o pH na qual a carga líquida de uma molécula, incluindo todos os íons ligados, é zero. Neste pH uma proteína não se desloca quando exposta a um campo elétrico. Já em pH fisiológico, a albumina tem uma carga líquida resultante do processo de desprotonação devido ao aumento do pH do meio em relação ao seu ponto isoeletrônico, deslocada para um excesso de 15 cargas negativas. [Peters, 1995; Rabbani, 2019] Ela é responsável por cerca de metade do intervalo aniônico normal. Uma redução na concentração

de proteína plasmática causa alcalose metabólica. [Doweiko, 1991; Varshney, 2010] A ASH também tem a capacidade de regulação do potencial redox. [Doweiko, 1991; Rabbani, 2019]

Além disso, a ASH contribui consideravelmente para a pressão sanguínea coloidosmótica (respondendo por 75%), [Rabbani, 2019] sendo o principal modulador da distribuição de fluidos entre os compartimentos do corpo. [Peters, 1995; Evans, 2002; Mendez, 2005a; Fanali, 2012] Podemos destacar também o seu papel como um fator muito importante na regulação da troca de água entre o plasma e o compartimento intersticial (espaço entre as células). Devido à pressão hidrostática, a água é forçada através das paredes dos capilares para os espaços teciduais. Esse fluxo de água continua até que a atração osmótica das moléculas de albumina o faça parar. [Abou-Zied, 2015] Uma queda na quantidade de albumina no plasma leva a um aumento no fluxo de água dos capilares para o compartimento intersticial. Isso resulta em um aumento no fluido tecidual que, se grave, torna-se aparente como edema. [Margarson, 1998; Abou-Zied, 2015]

Sabe-se que ASH existe como formas isoméricas neutras 'N' (pH=7) e básicas 'B' sob condições de equilíbrio. Esta transição N-B tem significado fisiológico e é sugerida pelo fato de que, sob concentrações aumentadas de íons  $\text{Ca}^{++}$  no plasma sanguíneo, o isômero B predomina. [Lejon, 2004] Além disso, acredita-se que a função de transporte da albumina seja controlada por meio dessa transição ou semelhante a ela. [Ahmad, 2006] A isomerização N-B é interpretada como “uma flutuação estrutural, um afrouxamento da molécula com maior adaptabilidade conformacional”. [Fanali, 2007; Varshney, 2010] A ASH tem uma forma elíptica com baixa viscosidade intrínseca. [Galliano, 1999; Ozaki, 1991; Abou-Zied, 2015]

Como a maioria das proteínas plasmáticas, a síntese da ASH acontece no fígado na forma de uma proteína precursora chamada proalbumina que é formada no lúmen do retículo endoplasmático dos hepatócitos na forma de pré-proalbumina. Uma vez sintetizada, a proteína é secretada imediatamente e não armazenada no fígado. Para a síntese da proalbumina um único gene é responsável por traduzi-la em pré-proalbumina no cromossomo [Komatsu, 2012; Liu 2015; Abou-Zied, 2015] e posteriormente ocorre a clivagem no retículo endoplasmático, [Rabbani, 2019] sendo sintetizado como uma cadeia simples não glicosilada a uma taxa de aproximadamente 0,7 mg/h para cada grama de fígado (ou seja, 10 a 15 g diariamente). [Fasano, 2005; Bertucci, 2002; Kratz, 2008]

Basicamente, a ASH nativa apresenta excelente estabilidade em condições fisiológicas com meia-vida média de 15 a 25 dias, [Liu, 2015; Fasano, 2005, Bertucci, 2002; Kratz, 2008]



sendo depurada por via renal (~6%), gastrointestinal (~10%) e catabolizada (~84%). [Levitt, 2016; Wouw, 2022]

Existem várias proteínas de transporte no plasma sanguíneo, mas apenas a albumina é capaz de se ligar reversivelmente a uma ampla diversidade de ligantes com alta afinidade. [Varshney, 2010] Como a adaptabilidade conformacional da ASH se estende muito além da vizinhança imediata do (s) sítio (s) de interação, a cooperatividade e a modulação alostérica surgem entre os sítios de interação; isso torna a ASH semelhante a uma proteína multimérica, a qual é descrita pela presença de 18 diferentes resíduos de aminoácidos. [Varshney, 2010]

As propriedades de transporte e depósito circulante da ASH dependem da sua capacidade de adsorção competitiva de metabólitos no estágio de carregamento, da capacidade do sítio de interação, da força de interação do ligante e da taxa de dissociação do complexo albumina/ligante no local alvo. [Peters, 1995; Abou-Zied, 2015] A ASH tem uma capacidade fenomenal de ligar o ácido graxo de cadeia média e longa (AG) com alta afinidade com uma constante de dissociação na faixa de  $10^{-7}$  M [Peters, 1995; Wang, 2015], portanto, é essencial para o metabolismo de lipídios fornecendo um suprimento de nutrição de ácidos graxos para os tecidos periféricos. [Yamasaki, 2013; Liang, 2014; Ghuman, 2005; Yang, 2012; Gou, 2016]

A ASH atua como uma proteína desintoxicante ligando-se à bilirrubina, produto da degradação do grupo Heme, e íons de metais pesados como chumbo (II), platina (II) e ouro (III); liga-se ao cobre (II) e ao níquel (II) de maneira específica e ao cálcio (II) e zinco (II) de maneira relativamente não específica e atua como veículo de transporte desses íons metálicos no sangue. [Leboffe, 2020]

A ASH se liga a um grande número de espécies terapêuticas, sendo o principal transportador de fármacos ácidos, tais como antibióticos, anticoagulantes, antiinflamatórios, anestésicos e benzodiazepínicos, entre outros [Kratz, 2014; Zhivkova, 2015; Rabbani, 2019] Estas propriedades a tornam um determinante crucial da farmacocinética e farmacodinâmica de compostos terapêuticos (ou seja, absorção, distribuição, metabolismo e excreção) porque a maioria dos fármacos ligados ao ASH viaja no plasma e atinge os seus tecidos-alvo. [Abou-Zied, 2015; Liang, 2014; Ghuman, 2005; Yang, 2012; Gou, 2016] Mesmo tendo uma forte carga negativa, a ASH se liga fraca e reversivelmente a cátions e ânions. [Varshney, 2010]

Com longa persistência de circulação e pouca função imunológica, a ASH também tem sido utilizada com sucesso como agente estabilizador para melhorar o potencial de proteínas terapêuticas, como interferon (IFN) [Tian, 2013; Zhao, 2009], interleucina-2 (IL-2) [Melder, 2005], moléculas de anticorpos [Muller, 2007; Berger 2013] e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). [Zhu, 2012; Rabbani, 2019] Do ponto de vista da clínica médica, uma concentração generosa de albumina na corrente sanguínea é uma medida da “Qualidade de Vida”. [Varshney, 2010]

Vale lembrar que a albumina sérica humana, como a proteína mais abundante no organismo, é distribuída entre a circulação sanguínea, o sistema linfático e os compartimentos extracelular e intracelular já representa um fármaco de grande sucesso, sendo usada para vários propósitos, principalmente como substituto do sangue. [Elsadek, 2012]

A estrutura e a dinâmica da ASH são conhecidas por serem influenciadas por diferentes condições ambientais, que por outro lado dependem de vários fatores como temperatura, [Bolin, 2006] pH, [Ahmad, 2006] força iônica, [Petersen, 2000] tensoativos [Gull, 2009; Bordbar, 2008] e desnaturantes químicos. [Ahmad, 2006; Varshney, 2010]

A organização estrutural do domínio globular da ASH monomérica está na raiz de suas propriedades alostéricas que lembram as das proteínas multiméricas. [Varshney, 2010] Interações alostéricas foram observadas entre vários compostos à medida que interagem a ASH. [Varshney, 2010] Os efeitos alostéricos ocorrem quando uma substância atua como agente ligante em uma região específica de uma proteína e, como consequência, altera a forma pela qual um segundo composto interage em uma região diferente da mesma. Tais efeitos podem ocorrer durante a interação alvo-receptor e fármaco-proteína. [Visy, 2002; Christopoulos, 2002; Varshney, 2010]

Estas propriedades, bem como a sua absorção preferencial no tecido tumoral e inflamado, a sua disponibilidade imediata, a sua biodegradabilidade e a sua ausência de toxicidade e imunogenicidade tornam a ASH um candidato ideal para entrega de fármacos. [Fasano, 2005; Bertucci, 2002; Kratz, 2008]

A ASH é um biomarcador valioso de muitas doenças, incluindo câncer, artrite reumatóide, isquemia, obesidade pós-menopausa e doenças que precisam de monitoramento do controle glicêmico. [Gupta, 2010; Koga, 2010; Sbarouni, 2011] Além disso, a ASH é

amplamente utilizada clinicamente para tratar várias doenças, incluindo hipovolemia, choque, queimaduras, perda cirúrgica de sangue, trauma, hemorragia, circulação extracorpórea, síndrome do desconforto respiratório agudo, hemodiálise, insuficiência hepática aguda, doença hepática crônica, suporte nutricional, ressuscitação e hipoalbuminemia. [Tullis, 1977a, 1977b; Alexander, 1982; Erstad, 1991; Hastings, 1992; Haynes, 2003; Alderson, 2004; Liberati, 2006; Fanali, 2012]

Também são relatadas aplicações biotecnológicas de ASH, incluindo biomateriais implantáveis, adesivos e selantes cirúrgicos, biocromatografia, captura de ligantes e proteínas de fusão. [Bertucci, 2010; Furukawa, 2011; Komatsu, 2011a] Algumas propriedades fisiopatológicas da ASH foram reconhecidas em 400 a.C. por Hipócrates de Cos, que relatou em Aforismos que uma urina espumosa, provavelmente causada pela presença de ASH, indica doença renal. [Coar, 1822; Fanali, 2012]

### **Um breve histórico da ASH.** [Fanali, 2012]

A ASH foi nomeada há um século e meio [Denis, 1859] e profundamente investigada ao longo do último século [Peters, 1995]. Em 1932, a ASH foi separada das proteínas plasmáticas [Race, 1932]; em 1934, a ASH foi cristalizada [Hewitt, 1936]; em 1939, foi detectada a transição conformacional de neutro para ácido (isto é, N para F) [Luetscher, 1947]; em 1940, a ASH foi purificada para uso intravenoso como substituto do sangue [Cohn, 1941]; em 1954, foram relatados os dois primeiros casos de analbuminemia [Bennhold, 1954]; em 1960, foi proposta a estrutura de “domínio” ASH [Foster, 1960]; em 1975, foi deduzida a estrutura primária da ASH [Meloun, 1975], e iniciada a caracterização de sítios específicos de interação de fármacos [Sudlow, 1975]; em 1979, o gene ASH foi isolado [Sargent, 1979]; em 1981, a sequência nucleotídica do cDNA de ASH foi relatada [Lawn, 1981]; em 1986, a sequência completa do gene de ASH foi determinada [Minghetti, 1986], e a expressão, a clivagem e a secreção de ASH de levedura cultivada *Saccharomyces cerevisiae* foi relatada [Hinchcliffe e Kenney, 1986]; a partir de 1989, muitas mutações ASH foram localizadas [Peters, 1995; Minchiotti, 2008; Otagiri e Chuang, 2009]; em 1992, a estrutura tridimensional “em forma de coração” da ASH foi determinada [He e Carter, 1992]; em 1995, o tetrafenilporfirinatoiron ferroso (FeP(II)) foi incorporado à ASH para obter um substituto de hemácias [Komatsu, 1995]; em 1999, o papel da ASH na eliminação de heme-Fe foi destacado [Miller e Shaklai, 1999], e a heme-albumina do soro humano (ASH-heme) foi projetada para se tornar um transportador de O<sub>2</sub> [Carter, 1999; Komatsu, 2004]; e a partir de

2001, foi sublinhado o papel desintoxicante de ASH-heme-Fe para espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de oxigênio (ROS) [Monzani, 2001; Ascenzi e Fasano, 2007; Ascenzi, 2009] [Fanali 2012]

### 2.2.1 Estrutura química da ASH

Em 1975, a sequência primária de ASH foi identificada pela primeira vez (Figura 11) e a ASH inteira exibiu um peptídeo de sinal (resíduos 1-18), propeptídeo (resíduos 19-22) e proteína madura (resíduos 23-609). O peso molecular da proteína é de 66,5 kDa que contém a seguinte quantidade de resíduos de aminoácidos: Ala(62), Arg(24), Asp(53), Cys(35), Gly(12), Glu(82), His(16), Ile(61), Leu(61), Lys(59), Met(6), Phe(31), Pro(24), Ser(924), Thr(28), Trp(1), Tyr(18), e Val(41) possuindo várias porções homólogas em sua estrutura (Figura 12). [Meloun, 1975; Sugio, 1999; Liu, 2015]

	5	10	15
1	Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly-		
16	Glu-Glu-Asn-Phe-Lys-Ala-Leu-Val-Leu-Ile-Ala-Phe-Ala-Gln-Tyr-		
31	Leu-Gln-Gln-Cys-Pro-Phe-Glu-Asp-His-Val-Lys-Leu-Val-Asn-Glu-		
46	Val-Thr-Glu-Phe-Ala-Lys-Thr-Cys-Val-Ala-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-		
61	Asn-Cys-Asp-Lys-Ser-Leu-His-Thr-Leu-Phe-Gly-Asp-Lys-Leu-Cys-		
76	Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Arg-Glu-Thr-Tyr-Gly-Glu-Met-Ala-Asp-Cys-		
91	Cys-Ala-Lys-Glu-Gln-Pro-Glu-Arg-Asn-Glu-Cys-Phe-Leu-Gln-His-		
106	Lys-Asp-Asp-Asn-Pro-Asn-Leu-Pro-Arg-Leu-Val-Arg-Pro-Glu-Val-		
121	Asp-Val-Met-Cys-Thr-Ala-Phe-His-Asp-Asn-Gln-Glu-Thr-Phe-Leu-		
136	Lys-Lys-Tyr-Leu-Tyr-Glu-Ile-Ala-Arg-Arg-His-Pro-Tyr-Phe-Tyr-		
151	Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Phe-Phe-Ala-Lys-Arg-Tyr-Lys-Ala-Ala-Phe-		
166	Thr-Glu-Cys-Cys-Glu-Ala-Ala-Asp-Lys-Ala-Ala-Cys-Leu-Leu-Pro-		
181	Lys-Leu-Asp-Glu-Leu-Arg-Asp-Glu-Gly-Lys-Ala-Ser-Ser-Ala-Lys-		
196	Gln-Arg-Leu-Lys-Cys-Ala-Ser-Leu-Gln-Lys-Phe-Gly-Glu-Arg-Ala-		
211	Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg-Leu-Ser-Gln-Arg-Phe-Pro-Lys-		
226	Ala-Glu-Phe-Ala-Glu-Val-Ser-Lys-Leu-Val-Thr-Asp-Leu-Thr-Lys-		
241	Val-His-Thr-Glu-Cys-Cys-His-Gly-Asp-Leu-Leu-Glu-Cys-Ala-Asp-		
256	Asp-Arg-Ala-Asp-Leu-Ala-Lys-Tyr-Ile-Cys-Glu-Asn-Gln-Asp-Ser-		
271	Ile-Ser-Ser-Lys-Leu-Lys-Glu-Cys-Cys-Glu-Lys-Pro-Leu-Leu-Glu-		
286	Lys-Ser-His-Cys-Ile-Ala-Glu-Val-Glu-Asn-Asp-Gln-Met-Pro-Ala-		
301	Asp-Leu-Pro-Ser-Leu-Ala-Ala-Asp-Phe-Val-Glu-Ser-Lys-Asp-Val-		
316	Cys-Lys-Asn-Tyr-Ala-Glu-Ala-Lys-Asp-Val-Phe-Leu-Gly-Met-Phe-		
331	Leu-Tyr-Glu-Tyr-Ala-Arg-Arg-His-Pro-Asp-Tyr-Ser-Val-Val-Leu-		
346	Leu-Leu-Arg-Leu-Ala-Lys-Thr-Tyr-Glu-Thr-Thr-Leu-Glu-Lys-Cys-		
361	Cys-Ala-Ala-His-Asp-Pro-Tyr-Glu-Cys-Ala-Ala-Lys-Val-Phe-Asp-		
376	Glu-Phe-Lys-Pro-Leu-Val-Glu-Glu-Pro-Gln-Asn-Leu-Ile-Lys-Gln-		
391	Asn-Cys-Glu-Leu-Phe-Glu-Gln-Leu-Gly-Glu-Tyr-Lys-Phe-Gln-Asn-		
406	Ala-Leu-Leu-Val-Arg-Tyr-Thr-Lys-Lys-Val-Pro-Gln-Val-Ser-Thr-		
421	Pro-Thr-Leu-Val-Glu-Val-Ser-Arg-Asn-Leu-Gly-Lys-Val-Gly-Ser-		
436	Lys-Cys-Cys-Lys-His-Pro-Glu-Ala-Lys-Arg-Met-Pro-Cys-Ala-Glu-		
451	Asp-Tyr-Leu-Ser-Val-Val-Leu-Asn-Gln-Leu-Cys-Val-Leu-Glu-His-		
466	Lys-Thr-Pro-Val-Ser-Asp-Arg-Val-Thr-Lys-Cys-Cys-Thr-Glu-Ser-		
481	Leu-Val-Asn-Arg-Arg-Pro-Cys-Phe-Ser-Ala-Leu-Glu-Val-Asp-Glu-		
496	Thr-Tyr-Val-Pro-Lys-Gln-Phe-Asn-Ala-Glu-Thr-Phe-Thr-Phe-His-		
511	Ala-Asp-Ile-Cys-Thr-Leu-Ser-Glu-Lys-Glu-Arg-Gln-Ile-Lys-Lys-		
526	Gln-Thr-Ala-Leu-Val-Glu-Leu-Val-Lys-His-Lys-Pro-Lys-Ala-Thr-		
541	Lys-Glu-Gln-Leu-Lys-Ala-Val-Met-Asp-Asp-Phe-Ala-Ala-Phe-Val-		
556	Glu-Lys-Cys-Cys-Lys-Ala-Asp-Asp-Lys-Glu-Thr-Cys-Phe-Ala-Glu-		
571	Glu-Gly-Lys-Lys-Leu-Val-Ala-Ala-Ser-Gln-Ala-Ala-Leu-Gly-Leu-		

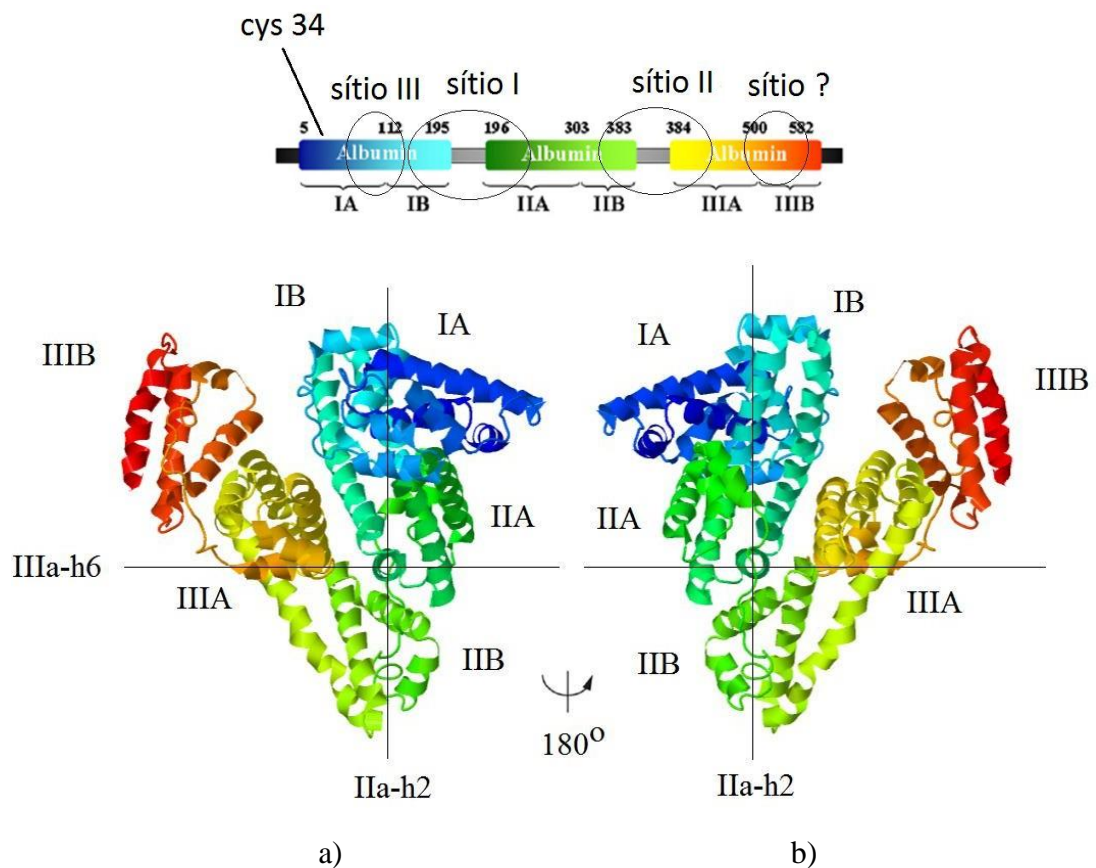
**Figura 11.** Sequência completa de aminoácidos da albumina sérica humana. O resíduo de cisteína 34 contém o único grupo SH livre da albumina. [Meloun, 1975]



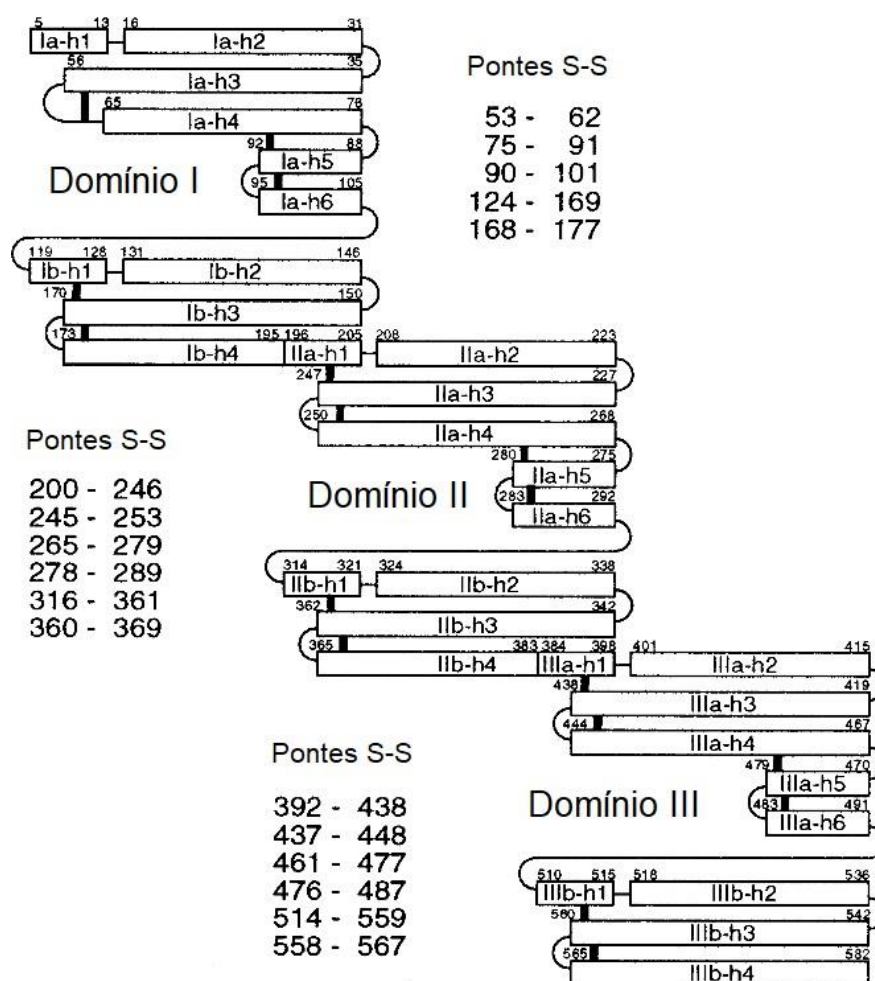
**Figura 12.** Homologia interna na sequência de resíduos de aminoácidos na albumina sérica humana. [Meloun, 1975]

A estrutura tridimensional da ASH foi resolvida inicialmente por Carter e colaboradores em 1989 com resolução de 6,0 Å [Carter, 1989], e melhorada para uma resolução relativamente alta de 2,8 Å em 1992. [He, 1992] Em 1999, o grupo Sugio forneceu uma estrutura de ASH com a melhor resolução de 2,5 Å [PDB-ID 1A06] (Figura 13). A partir desses estudos, a ASH foi considerada uma proteína puramente helicoidal contendo 67% de hélices em sua estrutura secundária, com algumas voltas e alças estendidas.

A ASH tem uma forma assimétrica de coração com dimensões de  $(80 \times 80 \times 30 \text{ Å})$  e volume de  $88.249 \text{ Å}^3$ . [Sugio, 1999] Toda a estrutura de ASH contém três domínios  $\alpha$ -helicoidais homólogos que são estruturalmente semelhantes (Figura 13); domínio I (resíduos 1-195), domínio II (196-383) e domínio III (384-585). [Fanali, 2012] Esses três domínios consistem em dez hélices antiparalelas e são divididos em dois subdomínios; um subdomínio A com seis hélices (a-h1 - a-h6) e subdomínio B com quatro hélices (b-h1 - b-h4) (Figura 14). O resíduo terminal da ASH é constituído pela sequência N terminal de ASH -N-Asp-Ala-His-Lys-, que apresenta grande afinidade por diferentes metais. [Varshney 2010]



**Figura 13.** Representação em forma de fita da estrutura tridimensional da ASH e duas perspectivas diferentes (a e b) com rotação relativa de 180°. [PDB ID, 1AO6] [Sugio, 1999] Foram usadas como referência relativa as hélices- $\alpha$  IIa-h2 e IIIa-h6. A figura foi reparada usando o programa JSmol.

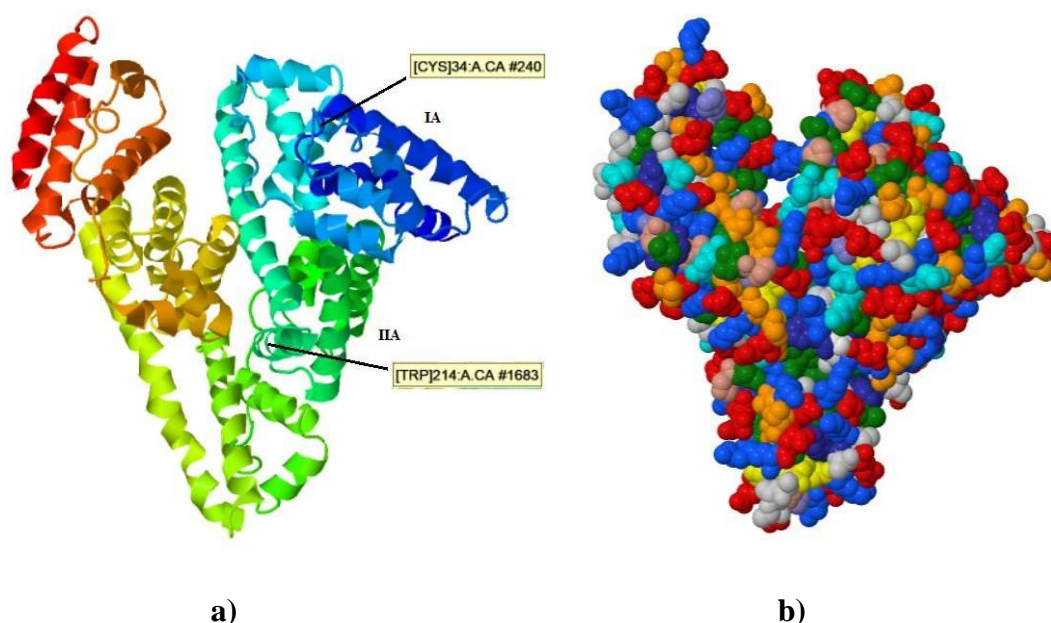


**Figura 14.** Representação dos subdomínios da ASH bem como as suas respectivas hélices- $\alpha$  e pontes de dissulfeto. A sequência de nomenclatura é derivada do trabalho de Minghetti e colaboradores. [Minghetti, 1986; Sugio, 1999]

Além disso, ASH compreende 34 resíduos de cisteína envolvidos na formação de 17 pontes dissulfeto que estabilizam a conformação desta molécula globular e uma cisteína livre Cys34 no subdomínio IA (Figura 15).

A ASH contém vários resíduos de aminoácidos aromáticos com propriedades fluorescentes, ou seja, 31 resíduos de fenilalanina, 18 de tirosina e apenas um resíduo de triptofano (Trp 214), que está posicionado nas proximidades da cavidade hidrofóbica do subdomínio IIA (Fig. 2.15a), [Birkett, 1977; Abou-Zied, 2015] enquanto os resíduos de aminoácidos iônicos como ácido glutâmico (Glu), arginina (Arg) e lisina (Lys) são abundantes (Figura 15b). [Birkett, 1977] Tais sequências de resíduos nativos conferem às albuminas uma alta propriedade de carga total (com a carga líquida de -15 em pH fisiológico), o que promove a sua solubilidade. [Peters, 1995; Liu, 2015]

O resíduo de triptofano está localizado na posição 214 no sítio I de Sudlow (Trp214), e a sua fluorescência é sensível à presença de ligantes próximos. Dentro da proteína, o resíduo de triptofano é espacialmente orientado para o sítio I de interação. Portanto, quaisquer alterações nas propriedades de fluorescência da proteína quando excitada a 295 nm são atribuídas a alterações no ambiente próximo ao Trp214, por isso é frequentemente usado como uma sonda intrínseca para investigar as propriedades de interação de compostos bioativos com ASH. [Abou-Zied, 2015]



**Figura 15.** a) Estrutura tridimensional para ASH com destaque para a cisteína Cys34 e o triptofano Trp214, b) representação da estrutura da ASH mostrando as diferentes classes de resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos: azul escuro (Arg e Lys), azul claro (Gln e Asn), vermelho (Glu e Asp), amarelo (Cys), Alaranjado (Ser e Thy), verde, (Leu, Ile e Val), bege (Pro) e em azul marinho (Phe e Tyr). [PDB ID, 1AO6] [Sugio, 1999] As figuras foram preparadas usando o programa JSmol.

A estrutura cristalina de ASH mostra moléculas de água que estão ligadas em locais específicos. [He, 1992; Borisover, 1996] A presença de água dentro e ao redor da proteína é importante para a estabilidade estrutural da macromolécula e na manutenção do núcleo hidrofóbico da proteína. [Borisover, 1996, Levy, 2006] O conflito entre as cadeias laterais hidrofóbicas e a natureza polar da água leva esses grupos a colapsarem e ficarem protegidos da água, formando um núcleo bem compactado que contém mais de 80% das cadeias laterais apolares de uma proteína típica. [Borisover, 1996; Levy, 2006] Este conflito é central para o dobramento de proteínas.



Os cristais de proteína, que normalmente contêm quantidades substanciais de água (até 70%), mostram uma ampla gama de ambientes específicos de interações de hidrogênio. Cerca de 55% da água da primeira camada de hidratação está ligada à espinha dorsal e o restante às cadeias laterais carregadas. Algumas dessas águas estão em posições fixas e são observadas toda vez que a estrutura é determinada, enquanto outras estão em posições variadas e refletem um conjunto de interações água-proteína que hidratam toda a superfície e às vezes o núcleo proteico. [Abou-Zied, 2015]

Numerosos estudos biofísicos também revelaram que a ASH possui várias regiões anfifílicas, consistindo nas regiões formadas por várias hélices- $\alpha$ . A contribuição da anfifilicidade e a flexibilidade das regiões formadas pelas hélices- $\alpha$  para a ASH representa o grande potencial de interação de vários ligantes com afinidade promissora ( $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  M), principalmente para aqueles com propriedades anfifílicas tais como ácidos graxos (AG).

Uma descrição mais detalhada das principais forças de interação da afinidade dos ligantes ao subdomínio IIA são derivadas da entalpia, indicando que as interações iônicas seriam fatores importantes para este subdomínio. Em contraste, as principais forças de interação para o subdomínio IIIA foram impulsionadas pela entropia, o que implica que as interações hidrofóbicas são os principais fatores que contribuem para a interação dos ligantes com o sítio II Sudlow. [He, 1992] Tais interações com a proteína ASH influenciarão a distribuição, metabolismo e excreção de pequenas moléculas nos seres vivos. [Elsadek, 2012; Lexa, 2014; Liu 2015]

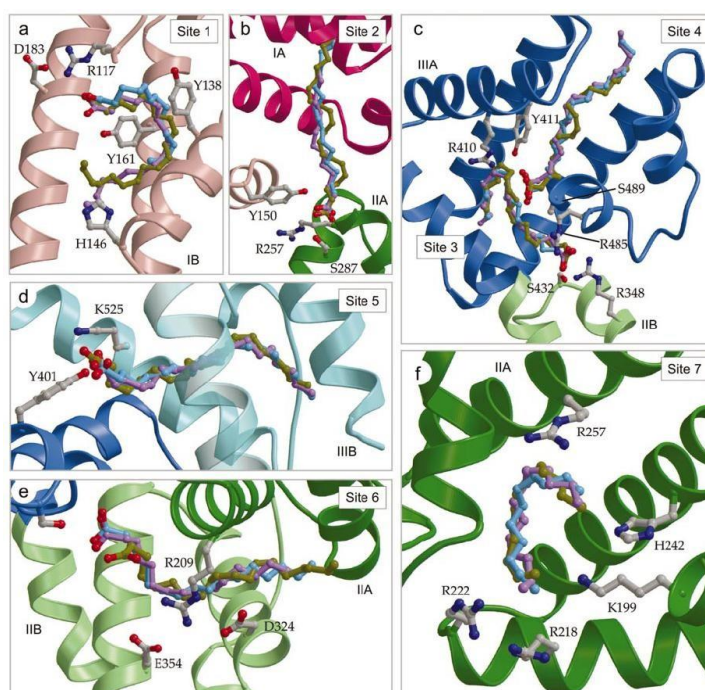
Estudos cristalográficos de uma variedade de fármacos e complexos de biomoléculas com ASH revelaram o número e a localização de seus sítios de interação na proteína. De forma geral os sítios ativos podem ser divididos em dois grupos. O primeiro grupo de sítios pode ser descrito como sítios de interação dos ácidos graxos e são distribuídos por toda a proteína e envolvem todos os seis subdomínios. [Varshney, 2010] Um segundo grupo de sítios liga-se especificamente a outros tipos de compostos endógenos e exógenos, chamados de sítio I e II de Sudlow e o sítio III descrito pelo subdomínio IB. [Zsila, 2013a]

### **2.2.2 sítios de interação de ácidos graxos**

Sob condições fisiológicas, a ASH é o principal transportador de ácidos graxos na forma não esterificada (99%), enquanto as lipoproteínas, como quilomícrons, lipoproteínas de

muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL), estão principalmente envolvidas no transporte de ácidos graxos na forma esterificada. [Hegele, 2009; Linciano, 2022]

Inicialmente, os estudos realizados em 1998 pelo grupo de Curry *et al.* com uma série de ácidos graxos com diferentes tamanhos de cadeia mostraram que ASH acomodava sete moléculas de ácido graxo médio mirístico, com os respectivos sítios de interação denominados FA1 a FA7 (Figura 16), tendo sido identificados os principais resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos que interagem com os respectivos ácidos graxos (Tabela 2). [Curry, 1998] [Bhattacharya, 2000, Wang 2015]

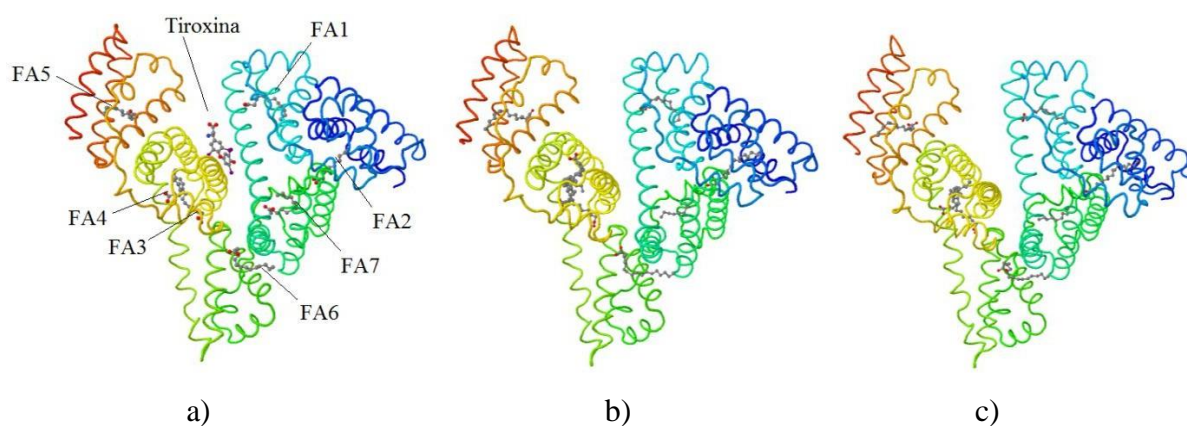


**Figura 16.** Representação para a estrutura cristalina dos sítios de interação de ácidos graxos (FAs) mostrando os principais resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos que estão interagindo com os ligantes. As estruturas mostradas são para C18:0 (azul), C18:1 (violeta) e C20:4 (marrom) ligadas a (a) sítio FA1, (b) sítio FA2, (c) sítios FA3 e 4, (d) sítio FA5, (e) sítio FA6 e (f) sítio FA7. [Petitpas, 2001]

**Tabela 2.** Principais resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos pertencentes aos diferentes sítios de ácido graxo (FAs) que estão interagindo com os ligantes mostrados na Figura 16. [Petitpas, 2001]

Sítio ác. graxo	Resíduo de $\alpha$ -aminoácido	
FA1	R117, Y138, D183, Y161 e H146	Arg117, Tyr138, Asp183, Tyr161 e His146
FA2	Y150, R257 e S287	Tyr150, Arg257 e Ser287
FA3/FA4	Y411, R410, S432, R485 e R348	Tyr411, Arg410, Ser432, Arg485 e Arg348
FA5	K325 e Y401	Lis325 e Tyr401
FA6	R209, D324 e E354	Arg209, Asp324 e Glu354
FA7	R257, R222, R218, K199 e H242	Arg257, Arg222, Arg218, Lis199 e His242

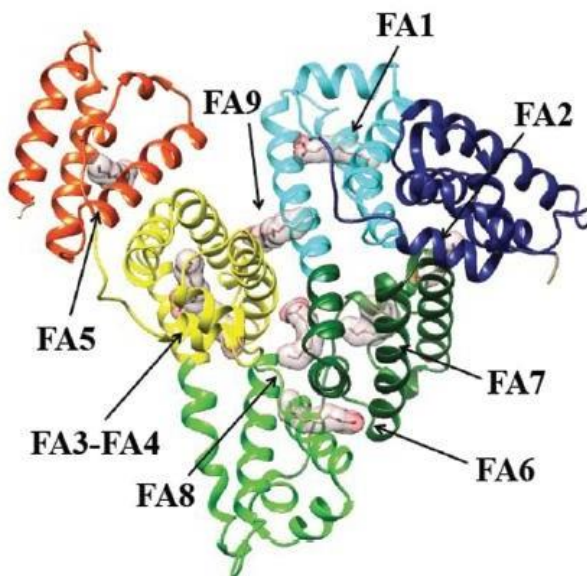
As posições de sítios de interação de ácidos graxos (FA) em ASH foram identificadas para os diferentes subdomínios. [Dirks, 1951; Wolfbeis, 1987; Salvi, 1997; Kurono, 1992] Posteriormente, verificou-se que os sete sítios comuns de interação de FAs acomodam tanto os FA de cadeia média e longa, bem como FAs monossaturados e polissaturados, como mostrado na Figura 17. A maior afinidade para FAs de interação foi encontrada nos sítios FA2, FA4 e FA5. [Wang, 2015]



**Figura 17.** Estrutura cristalina para ASH complexada com três diferentes ácidos graxos. Os ácidos graxos são mostrados na cor amarela. **a)** ácido mirístico complexado com tiroxina (cor azul) [PDB IB, 1HK4] **b)** ácido esteárico [PDB ID, 1E7I] e **c)** ácido palmítico. [PDB ID, 1E7H] Todas as figuras foram preparadas usando o programa JSmol.

Em publicações posteriores, os estudos para a interação com ácidos graxos indicaram que estes interagem com nove sítios (FA) presentes em ASH, sendo estes denominados FA1 a FA9, e divididos em sítios de ácidos graxos primários (FA1-FA7) e secundários (FA8 e FA9) (Figura 18). [Fanali, 2012; Ascenzi, 2010; Peters, 1995; Leboffe, 2020] Os sítios FA8 e FA9 estão posicionados na base e no topo da fenda delimitada pelos subdomínios IA-IB-IIA de um lado e pelos subdomínios IIB-IIIA-IIIB do outro, respectivamente. [Leboffe, 2020] Apesar da

estrutura de domínio de repetição da proteína, os sítios de interação de ácidos graxos exibem uma distribuição surpreendentemente assimétrica. [Varshney, 2010]



**Figura 18.** Representação para a cocrystalização do ácido cáprico nos sítios de interação de ácidos graxos FA1-FA7 (primários) e FA8 e FA9 (secundários) [PDB-ID 1E7E]. A figura foi preparada usando o programa JSmol.

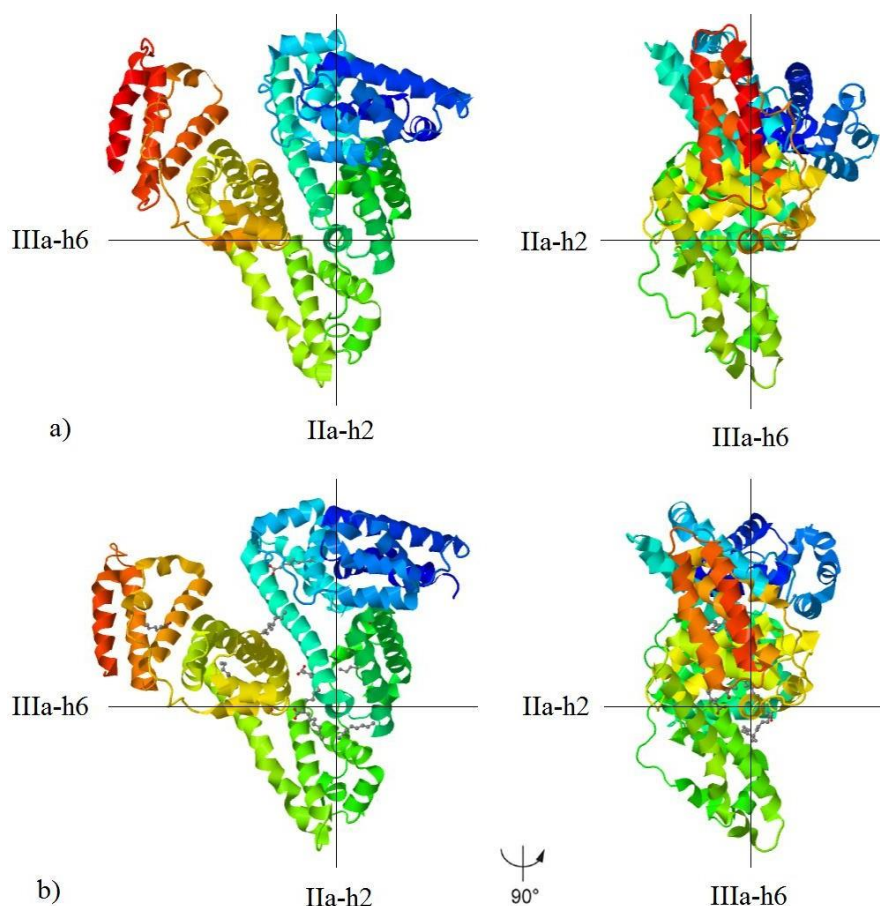
Os sítios de FAs primários estão localizados no subdomínio IB (FA1), na interface entre os subdomínios IA e IIA (FA2), no subdomínio IIIA, em correspondência com o sítio SII de Sudlow de interação de fármacos (FA3-FA4), no subdomínio IIIB (FA5), na interface entre os subdomínios IIA e IIB (FA6), no subdomínio IIA, em correspondência com o sítio de interação SI de Sudlow (FA7), e FA8 e FA9, que estão localizados na fenda entre os subdomínios IB e IIIA (Figura 18). [Curry, 1999; Petitpas, 2001; Bhattacharya, 2000; Linciano, 2022]

As estruturas cristalinas de ASH ligadas aos FAs exibem uma grande mudança conformacional na proteína quando comparadas com as estruturas da ASH nativa. Embora as estruturas gerais sejam semelhantes e a estrutura interna de cada domínio seja aproximadamente preservada, os domínios I e III são rotacionados em relação ao domínio central II devido à interação de ácidos graxos nos sítios FA2 e FA3 (Figura 19). [Curry, 2009; Wang, 2015; Abou-Zied, 2015]

Com base em diferentes dados bioquímicos e nas estruturas de raios-X, foi sugerido que os ácidos graxos de cadeia média e longa (variando em comprimento de cadeia de C10 a C18) devem exibir afinidades distintas para os diferentes sítios de interação. [Abou-Zied,

2015] Embora os sítios de interação pareçam bem-adaptados para acomodar o ácido graxo, a sua maioria é capaz de interagir com outros ligantes. [Varshney, 20010]

Os lipídios, que são outra classe importante de compostos endógenos, geralmente interagem com a ASH com menor força do que os ácidos graxos de cadeia longa. [Peters, 1995; Wang, 2015] Além disso, numerosos estudos subsequentes mostraram que a presença de ácidos graxos tem efeitos imprevisíveis na interação do fármaco, tendo sido observadas interações cooperativas e competitivas. [Varshney, 2010]

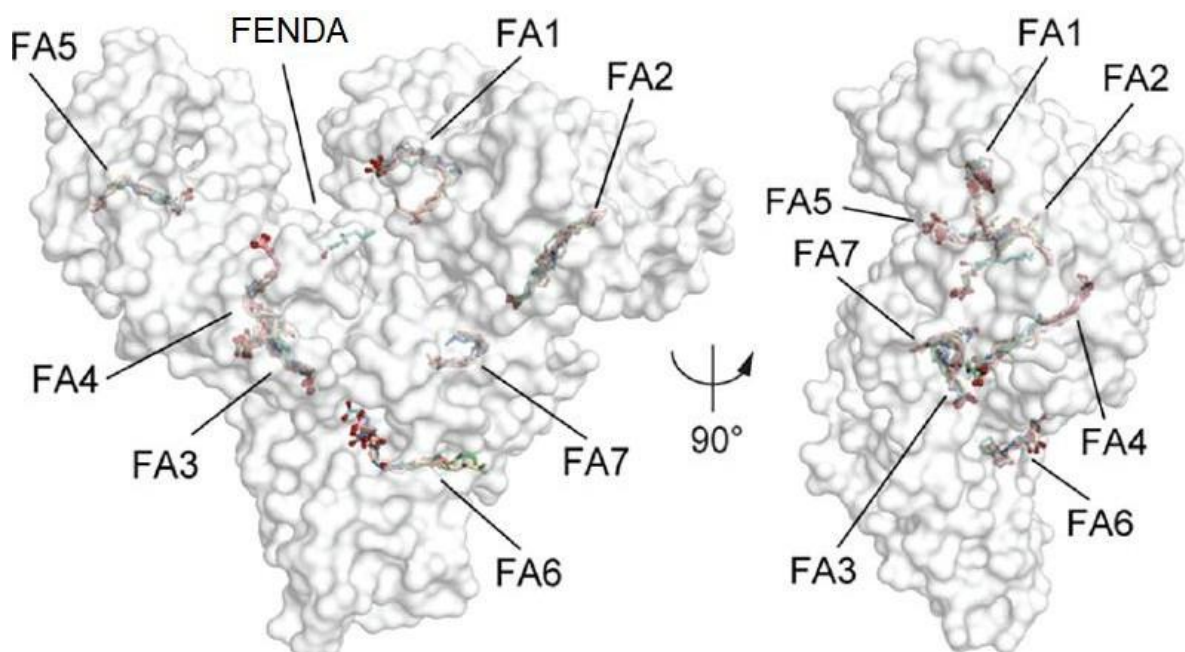


**Figura 19.** Comparação entre as estruturas cristalinas de: a) ASH nativa [PDB-ID, 1AO6] e b) ASH complexada com ácido cáprico. [PDB ID, 1E7E]. De modo a realizar uma comparação sistemática entre diferentes estruturas cristalinas de ASH, foram tomadas como referência relativa às hélices- $\alpha$  pertencentes aos subdomínios IIa-h2 e IIIa-h6. As estruturas foram construídas usando o programa JSmol

Uma descrição mais detalhada dos sítios de interação para ácidos graxos está mostrada a seguir, onde as moléculas de ácidos graxos (AGs) ligadas a ASH são representadas como bastões (Figura 20). Duas vistas são mostradas para cada sítio, sendo os modelos de estrutura tridimensional de ASH [PDB-ID, 1E7E, 1E7F, 7AAE, 1E7H, 1E7I, 1GNI, 1GNJ] usando o



programa Pymol. [The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC]  
[Linciano, 2022]



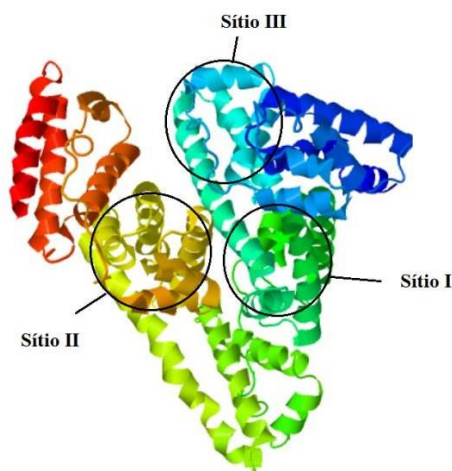
**Figura 20.** Representação estrutural do modo de interação de múltiplos ácidos graxos (AGs) para ASH para os diferentes sítios de interação (FA1 – FA7). A representação da superfície molecular da ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°). [Linciano, 2022]

### 2.2.3 Os sítios de interação primários para compostos endógenos e exógenos

Em contraste aos ácidos graxos, muitos fármacos interagem preferencialmente a um conjunto de sítios de interação formado por diferentes regiões na proteína, conhecidos inicialmente como sítios I e II de Sudlow (Figura 28) [Sudlow, 1975, 1976], como confirmado posteriormente por estudos estruturais. [Ryan, 2011] No entanto, um terceiro sítio de interação primária está presente no subdomínio IB, denominado de sítio SIII (Figura 21), o qual foi posteriormente identificado como o principal local de interação de um fotoisômero de bilirrubina, [Zunszain, 2008] da hemina, [Zunszain, 2003; Wardell, 2002], de um derivado de sulfonamida [Buttar 2010] e do antibiótico esteroide ácido fusídico. [Zunszain, 2008; Zsila, 2013]

Carter e colaboradores afirmaram que o subdomínio IB (Sítio III) é a terceira maior região de interação a fármacos da ASH, cuja importância não foi reconhecida anteriormente por Sudlow (Figura 21). [Carter, 2010; Carter, 2007; Burke, 2010; Carter, 2007b; Wang, 2006; Carter, 2008; Kragh-Hansen, 1981; Zsila, 2013] Além disso, o subdomínio IB (sítio III) é acoplado alostericamente com os sítios de Sudlow (sítios I e II) e, conseqüentemente, pode

levar a mudanças do modo de interação da ASH, impactando seriamente seu perfil farmacocinético. [Kratochwil, 2002; Curry, 2009; Carter, 1994; Zsila, 2013]

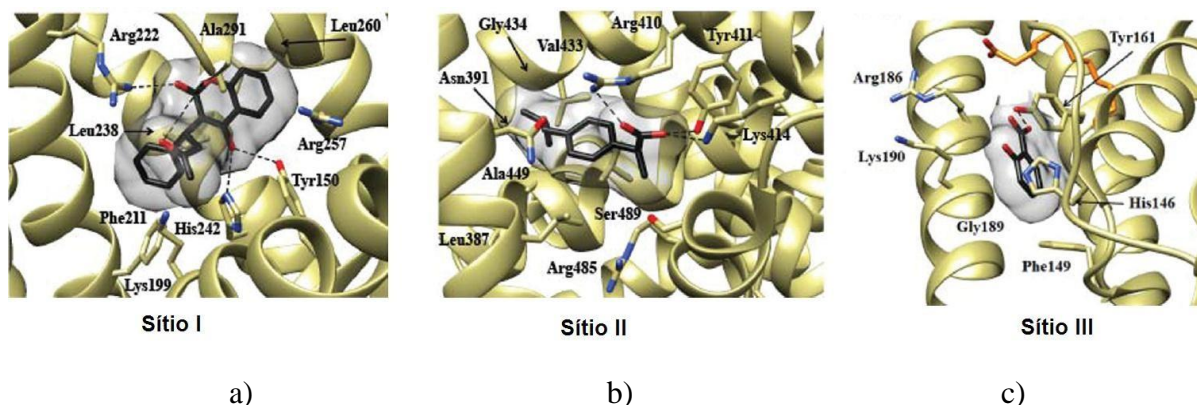


**Figura 21.** Estrutura cristalina de ASH indicando as regiões de interação primária de fármacos endógenos exógenos: sítio SI, sítio SII e sítio SIII. [PDB-ID, 1AO6] A estrutura foi preparada usando o programa JSmol.

Em particular, o sítio SI de Sudlow (subdomínio IIA) se sobrepõe ao sítio de ácido graxo FA7 e compartilha pelo menos duas cadeias laterais de aminoácidos com o sítio de ácido graxo FA2; por outro lado, o sítio SII de Sudlow (subdomínio IIIA) se sobrepõe aos sítios de ácidos graxos FA3-FA4 [Varshney, 2010], enquanto o Sítio SIII (subdomínio IB) se sobrepõe ao sítio de ácidos graxos FA1. [Leboffe, 2020]

Os sítios de interação SI e SII de Sudlow também são conhecidos como sítio da varfarina e do ibuprofeno, os quais foram descritos como compostos modelo que interagem com resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos (Tyr150, Lys195, Lys199, Arg222, Leu238, Arg257 e Ala291) e (Leu 37, Arg410, Tyr 411, Lys414, Val433, Leu453 e Ser489) (Figuras 22a e 22b respectivamente), enquanto que o sítio SIII é conhecido como sítio do ácido salicílico, o qual interage com os resíduos dos  $\alpha$ -aminoácidos Arg186, Lys190, Gly189, Phe149, His146 e Tyr161 (Figura 22c). [Rabbani, 2019; Leboffe, 2020]

Deve-se notar também que a existência de mais de dois sítios de interação de fármacos na ASH foi considerada por Kragh-Hansen na década de oitenta, sugerindo quatro sítios de interação primários separados para varfarina, digitoxina, diazepam e vermelho de fenol. [Kragh-Hansen, 1981; Kragh-Hansen, 1985; Zsila, 2013]



**Figura 22.** Representação da complexação nos sítios primários de interação de fármacos endógenos exógenos com ASH **a)** sítio I de Sudlow ou sítio da varfarina, **b)** sítio II de Sudlow ou sítio do ibuprofeno e **c)** sítio III ou sítio do ácido salicílico. [Leboffe, 2020]

Muitos trabalhos na literatura empregaram amplamente métodos de interação competitiva para investigar a seletividade dos sítios primária (SI, SII e SIII) com diferentes compostos bioativos no reconhecimento molecular e na interação com o ligante. A água dentro da cavidade da proteína é crucial para manter o equilíbrio entre a natureza hidrofóbica e hidrofílica do sítio de interação. Após o desdobramento e redobramento da ASH, mais moléculas de água ficam presas dentro dos sítios de interação, o que causa algum inchaço que impede a recuperação total do seu estado nativo. [Varshney, 2010; Abou-Zied, 2015]

Além dos estudos de interação competitivas, as alterações induzidas nos espectros de dicroísmo circular (DC) para o complexo biliverdina-ASH e hemina-ASH indicam interações alostéricas entre o sítio SIII (IB) e os sítios SI e SII de Sudlow. Esses achados complementam o antigo quadro focado principalmente na interação alostérica entre os subdomínios IIA e IIIA e chamam a atenção para a complexa rede alostérica interdomínios de ASH, na qual as regiões de interação de fármacos em cada domínio são mutuamente acopladas umas às outras. [Zsila, 2013] Estudos cristalográficos realizados com complexo ligante/ASH revelaram mais detalhes moleculares dos sítios de interação. [Ghuman, 2005; Buttar, 2010; Yang, 2007; Petitpas, 2001; Ryan, 2011; Zsila, 2013]

### 2.2.3.1 O sítio de interação I de Sudlow (subdomínio IIA)

O sítio SI de Sudlow é uma cavidade de interação relativamente grande, caracterizado como uma região conformacionalmente adaptável e que pode ser separada em três subsítios não sobrepostos. De modo geral, estes subsítios podem ser classificados como o subsítio de indometacina (IMN), [Ghuman, 2005] subsítio salicílico (SAL), localizado na parte interna do

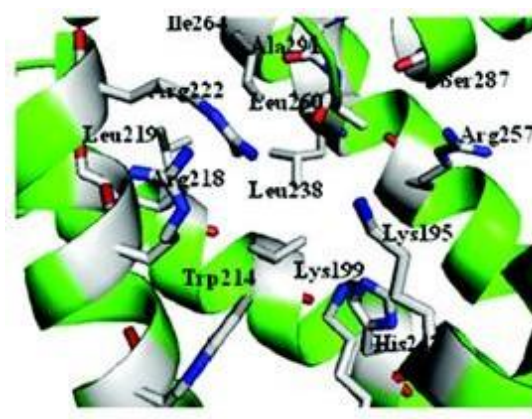


sítio SI, [Yang, 2007] e um subsítio 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), localizado próximo à abertura do sítio SI. [Zhu, 2008; Rabbani, 2019] Este sítio que interage com grande afinidade com compostos heterocíclicos relativamente volumosos com uma carga negativa deslocalizada, sendo o ligante protótipo para este sítio o fármaco anticoagulante varfarina (Figura 22a). [Leboffe, 2020] No tópico 2.5 estão relacionados compostos com atividade biológica que interagem com o sítio I de Sudlow estudados no Laboratório de Fotoquímica da UFRRJ, pelo grupo de pesquisa do Dr José Carlos Netto Ferreira.

Vários resíduos carregados de ASH, incluindo Lys195, Arg218, Arg222 e Glu292, estão localizados na abertura do sítio I de Sudlow. [Ghuman, 2005; Rabbani, 2019] Existem 59 resíduos de lisina em ASH sendo que a maioria desses resíduos se projeta da ASH para um ambiente hidrofílico, estando em contato direto com a água (Figura 15).

Já a Lys199 está localizada em uma cavidade hidrofóbica no subdomínio IIA que é predominantemente delimitado pelos resíduos: Lys195, Trp214, Arg218, Leu219, Arg222, Phe223, Leu238, His242, Arg257. Leu260, Ile264 e Ser287 (Figura 22a). A Lys199 forma um conjunto externo próximo à entrada do sítio SI de Sudlow, com a Lys195 e a His242 (Figura 23). A Lys199 projeta-se para o centro do sítio, e desempenha um papel fundamental na interação de fármacos no subdomínio IIA de ASH (sítio SI de Sudlow), e muitas vezes forma ligação de hidrogênio ou pontes salinas entre os fármacos e os resíduos de aminoácidos presente em cada sítio. [Bertucci, 1998; Ghuman, 2005; Díaz 2001; Li, 2014; Gou, 2014; Petitpas, 2003; Gou, 2016]

O sítio de interação mostra ter uma capacidade de ionização que é importante considerar quando se utiliza fármacos que interagem ao sítio SI de Sudlow. [Abou-Zied, 2015; Gou, 2016]



**Figura 23.** Representação da estrutura cristalina do ambiente próximo a Lys199 para a estrutura nativa da ASH. [Gou, 2016]

O interior da cavidade do sítio SI de Sudlow é predominantemente apolar e contém um aglomerado de resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos hidrofóbicos por natureza (Phe211, Leu198, Trp214, Leu219, Leu238) [Ghuman, 2005; Rabbani, 2019], enquanto em direção ao fundo do sítio são encontrados os resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos polares Tyr150, His242 e Arg257. [Artali, 2005; Abou-Zied, 2015]

Na presença de miristato, foi observada a cointeração de vários fármacos ao sítio SI de Sudlow (Tabela 3), sugerindo que a presença de ácido graxo induz mudanças conformacionais no sítio SI de Sudlow. [Zhu, 2008; Leboffe, 2020]

### 2.2.3.2 O sítio de interação II de Sudlow (subdomínio IIIA)

O sítio de interação SII de Sudlow tem um tamanho de cavidade de interação menor que sítio SI de Sudlow e também possui caráter hidrofóbico, podendo assim se associar a compostos hidrofóbicos. [Rabbani, 2019] O sítio de interação SII de Sudlow é considerado o principal para um grande número de fármacos que normalmente contém uma carga negativa localizada, tal como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), anestésicos e ansiolíticos, sendo o ibuprofeno o protótipo do ligante para o sítio II de Sudlow (Figura 22b). [Leboffe, 2020]

A interação neste local é geralmente forte e específica com estequiometria 1:1. [Sudlow, 1975; Sudlow, 1976; Abou-Zied, 2015] Os resíduos de aminoácidos Arg410 e Tyr411 são os principais constituintes polares que formam um lado da entrada deste sítio de interação e também fornecem interações de hidrogênio ou pontes salinas com moléculas de fármacos que, com os resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos Phe488 e Ser489, compõem a entrada do sítio SII de Sudlow. [Ghuman, 2005; Wang, 2015]

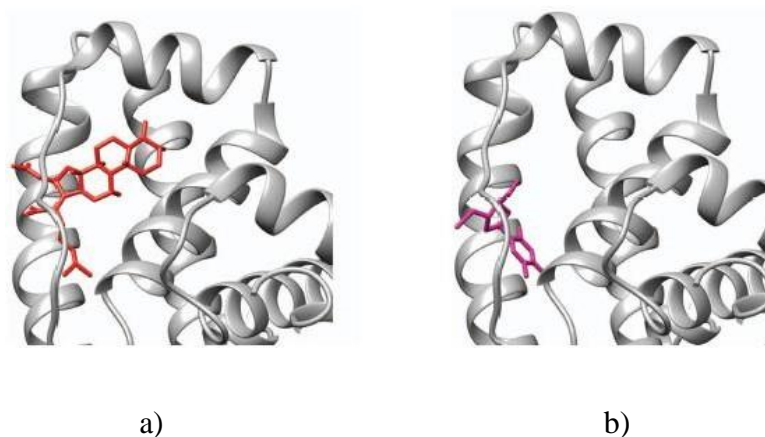
O interior do sítio de interação SII de Sudlow para a complexação com ibuprofeno é formado por um conjunto de  $\alpha$ -aminoácidos predominantemente hidrofóbicos: Leu387, Ile388, Leu430 e Val433. [Ghuman, 2005; Leboffe, 2020]

### 2.2.3.3 O sítio de interação III (subdomínio IB)

O sítio de interação SIII pode ser descrito como uma cavidade no subdomínio IB, com os compostos hemina, bilirrubina e miristato representando os ligantes prototípicos. [Zsila, 2013; Zsila, 2013b; Leboffe, 2020] A interação simultânea de uma molécula de ácido graxo (AG) e uma molécula de fármaco (como no caso de azapropazona, naproxeno ou ácido salicílico) com o sítio SIII, bem como o fato de que diferentes classes de fármacos (antibióticos, antineoplásicos, antirretrovirais e anti-inflamatórios não esteroides (AINE)) interagem de formas diferentes no Sítio III, é consistente com a presença de subsítios adicionais. [Ghuman, 2005; Petitpas, 2001; Ryan, 2011; Bhattacharya, 2000; Ryan, 2011b; Lejon, 2008; Zhu, 2008; Curry, 1998; Zsila 2013; Kaneko 2011; Leboffe, 2020]

Conforme mostrado na Figura 24, dois subsítios principais estão localizados na cavidade do sítio SIII. Em particular os compostos volumosos, como o ácido fusídico [PDB-ID 2VUF], interagem com o sítio SIII nas proximidades da Tyr161 e interagem com os

resíduos de  $\alpha$ -aminoácido Leu115, Val116, Tyr138, Phe157 e Phe165 envolvidos no reconhecimento do composto heme e de ácidos graxos (AGs), enquanto compostos menores, como o AZT, são encontrados perto do resíduo His146, interagindo com Arg114, Arg 186 e Lys190. [Leboffe, 2020] Acredita-se também que o reconhecimento do ligante para o sítio SIII conduz à mudança conformacional que se propaga do subdomínio IB para os subdomínios IA, IIA e IIB. [Fanali, 2011; Fasano, 2005; Ascenzi, 2010; Zsila, 2013; Kaneko, 2011; Ascenzi, 2013; Ascenzi, 2015; di Masi, 2015; Leboffe, 2020]



**Figura 24.** Representação estrutural para complexação no sítio SIII de ASH com: **a)** ácido fusídico e **b)** AZT. [Leboffe, 2020]

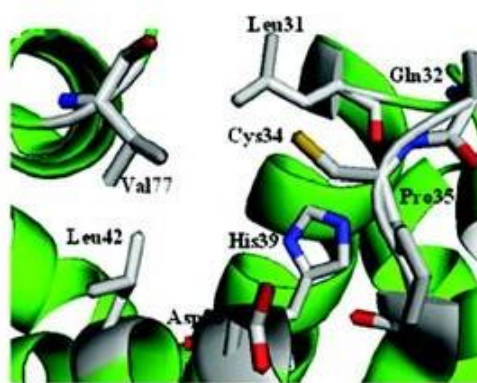
Inúmeros experimentos de competição e de dicroísmo circular (DC) revelaram o aprisionamento de uma variedade diversificada de moléculas ácidas, neutras e básicas dentro do sítio SIII (subdomínio IB), incluindo agentes anticancerígenos (camptotecina, doxorubicina, daunorrubicina, teniposido, suramina, inibidores de tirosina quinase, anticoagulantes (dicumarol), vários esteróides (ácidos biliares e carbenoxolona), antiinflamatórios não esteroidais (ANIEs), substâncias naturais (ácido aristolóquico, ácido glicirretínico) e corantes sintéticos (laranja de metila e azocarmim B). [Zsila, 2013]

#### 2.2.4 Resíduo de Cys34 livre

A presença de um resíduo de Cys34 livre na forma reduzida confere atividade antioxidante à ASH devido à presença de um grupo tiol livre que pode agrupar e capturar radicais livres [Lee, 2001; Fabisiak, 2002], o que é bastante raro entre as proteínas extracelulares. [Rabbani 2019] Além disso, Cys34 pode se ligar a alguns íons metálicos com alta afinidade, como íons Au (I), Zn (II), Pt (II), Hg (II) e Cd (II). [Otagiri, 2005; Zheng, 2014; Liu, 2010; Elsadek, 2012; Blindauer, 2009]

A Cys34 está localizada na parte inferior da fenda semiaberta no subdomínio IA e tem acessibilidade limitada ao solvente (Figura 25). Aproximadamente 70% da albumina circulante na corrente sanguínea é mercaptalbumina contendo uma Cys34 acessível, que não é bloqueada por compostos sulfidrílicos endógenos. [Gou, 2016]

O grupo HS livre da cisteína-34 é uma característica única de uma proteína extracelular e é responsável por aproximadamente 90% da concentração de tiol no plasma sanguíneo. [Kratz, 2014]



**Figura 25.** Representação da estrutura cristalina do ambiente próximo a Cys34 para a estrutura nativa da ASH. [Gou, 2016]

A forma de ânion tiolato de Cys34 está parcialmente internalizada no subdomínio IA e próximo a três grupos ionizáveis: o anel imidazol de His39, que pode formar ponte salina, o grupo carboxilato de Asp38 e o grupo hidroxila de Tyr84. [Stewart, 2005] Essa geometria mantém a Cys34 em estado reduzido a baixo pKa ~ 5 [Peters, 1995], e previne a formação de dimerização de ASH por interação dissulfeto intermolecular. [Ascenzi, 2000]

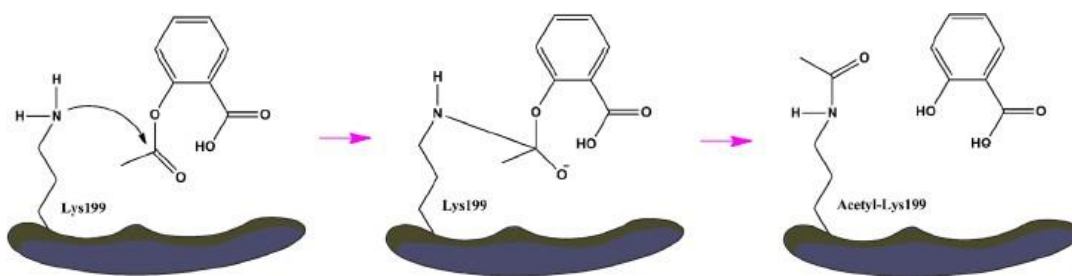
Em particular, 40-80% da atividade antioxidante total de ASH é devida à presença de resíduos de Cys34 e Met87, Met123, Met298, Met329, Met446 e Met548. [Bourdon, 2005; Nakashima, 2018; Rabbani, 2019]

### 2.2.5 A atividade pseudoenzimática da ASH

A atividade pseudoenzimática da ASH semelhante à esterase foi relatada pela primeira vez em 1951 e extensivamente investigada por décadas. [Rabbani, 2018; Goncharov, 2017] A atividade do tipo esterase da ASH está intimamente relacionada à interação do fármaco com os sítios SI e SII de Sudlow, e é principalmente mediada no sítio SI de Sudlow pelo resíduo Lys199 e no sítio II por Tyr411.

Os resíduos de aminoácido nas posições 199 e 411 e o ambiente circundante são críticos para esta atividade e, portanto, formam um sítio reativo primário (sítio R) para a atividade da esterase. [Salvi, 1997] Além disso, essa atividade semelhante à esterase é crucial do ponto de vista clínico, pois pode converter pró-fármacos em fármacos ativos no plasma. [Kurono, 1992; Rabbani, 2019]

Huang *et al.* resolveram a estrutura do complexo ASH/aspirina e forneceram evidências sólidas para o mecanismo estrutural da atividade da Lys199. [Yang, 2007; Wang, 2014] De acordo com os seus resultados, eles propuseram um mecanismo molecular para a reação de abertura do anel de monossacarídeos no subdomínio IIA de ASH. A presença da Lys199 no sítio de Sudlow SI de ASH parece ser o resíduo-chave para catalisar a reação de abertura do anel de glicose (Figura 26). [Gou, 2016]



**Figura 26.** Representação mecanística para a atividade tipo esterase da Lys199 no subdomínio IIA de ASH mostrando a hidrólise da aspirina a ácido salicílico. [Gou, 2016]

A Lys199 de ASH foi proposta como um resíduo relacionado à hidrólise. [Aldini, 2006] Este resíduo foi modificado na hidrólise de alguns substratos, incluindo aspirina [Liyasova, 2010; Walker, 1976] e HNE (4-hidroxi-trans-2-nonenal). [Aldini, 2006] O resíduo Lys199 também foi um dos principais sítios de interação na reação de acil glicuronídeos com ASH. [Ding, 1993] A Lys199 localizado no sítio SI de Sudlow da ASH está cercada por resíduos carregados positivamente, tais como Arg 186, Lys195, Arg218 e Arg222.

A alta reatividade de Lys199 pode estar relacionada à sua localização específica na estrutura ASH, levando a um  $pK_a$  anormalmente baixo de 7,47 quando comparado ao  $pK_a$  regular de lisina que é 10,76. [Wa, 2007; Diaz, 2001] Este resíduo, juntamente com resíduos de His242 e Arg257, foram sugeridos como os principais mediadores da atividade do tipo esterase. [Phuangsayai, 2014; Wang 2015] Em associação com a hidrólise de ésteres, alguns resíduos de ASH podem ser modificados covalentemente pelo produto da hidrólise (ácidos carboxílicos), formando derivados estáveis (Figura 26). Os derivados acetilados de ASH

geralmente perdem a função de hidrolisar novos ésteres. Diferentes tipos de resíduos de aminoácidos de ASH, incluindo lisinas, serinas, treoninas e tirosinas, também são relatados como modificados por esterificação, em um processo semelhante ao descrito para a Lys199 e a Tyr411. [Lockridge, 2008; Wang, 2015]

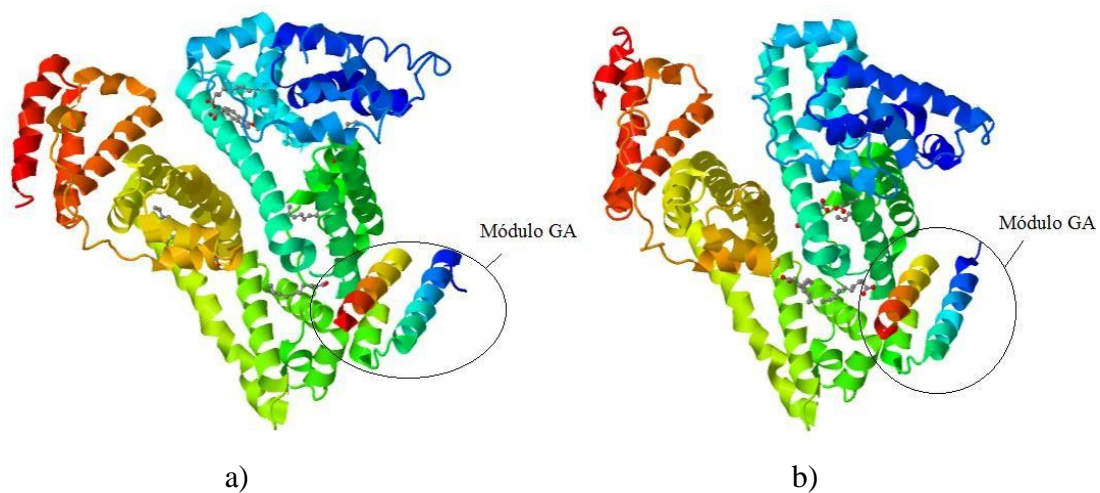
A Tyr411 é outro resíduo importante para a atividade do tipo esterase da ASH. [Lockridge, 2008; Yoshida, 1985] Na hidrólise do acetato de *p*-nitrofenila, o resíduo Tyr411 é acetilado. [Means, 1975, 1979] O Tyr411 está localizado no sítio SII Sudlow (subdomínio IIIA de ASH), e possui um baixo  $pK_a$ , o que permite um ataque nucleofílico ao grupo carboxila de ésteres. [Watanabe, 2000; Sakurai, 2004]

O resíduo Arg410 está próximo ao Tyr411 (4,5 Å) [He, 1992; Sugio, 1999] e parece facilitar a hidrólise do substrato formando interações de hidrogênio com o oxigênio carbonílico do éster, promovendo assim um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do éster pelo oxigênio fenólico de Tyr411. A desacetilação da acetil-albumina ocorre por catálise geral ácida ou básica e com a participação da molécula de água [Sakurai, 2004] e é promovida por argininas próximas. [Lockridge, 2008; [Watanabe, 2000; Wang, 2015]

#### **2.2.6 Módulo de interação com ASH semelhante à proteína G**

A ASH também apresenta sítios de interação que permitem a sua interação com outras proteínas e, como exemplo, podemos citar a interação ASH-Modulo GA. O módulo GA (módulo de interação com albumina semelhante à proteína G, que é descrita como uma classe de proteínas envolvidas na transdução de sinais celulares) é uma pequena proteína dimérica encontrada em uma família de proteínas de superfície presentes em diferentes espécies bacterianas.

O módulo GA interage próximo a uma fenda em um sítio entre os domínios IIA e domínio IIIB da molécula de albumina e envolve um único sítio que consiste em um segmento que abrange os resíduos 330-548 (Figura 27). [Cramer, 2007; Lejon, 2004; Varshney, 2010]



**Figura 27.** Representação da estrutura cristalina da ASH complexada com: **a)** módulo GA [PDB-ID, 1TF0] e **b)** *s*-naproxeno e o módulo GA [PDB-ID, 2VDB]. As estruturas foram preparadas usando o programa JSmol.



### **2.2.7 Efeito alostérico para ASH**

O paradigma do efeito alostérico é que o ligante induz uma mudança na conformação da proteína alvo que, por sua vez, produz uma determinada resposta que pode se estender por todo o sistema proteico, tornando a análise muito complicada.

A interação simultânea de vários ligantes à molécula de ASH é uma situação complexa na qual a proteína reconhece ligantes individuais por interações específicas e não específicas. Esse reconhecimento, por sua vez, é fortemente dependente do microambiente da proteína, pois ela altera sua conformação *in vivo*.

Em condições fisiológicas, a proteína experimenta vários ambientes como pH, força iônica variável etc., o que induz mudanças consideráveis na estrutura da proteína nativa. [Varshney, 2010]

### **2.2.8 Albumina como carreador de fármacos ou compostos biologicamente /farmacologicamente ativos**

A longa persistência de circulação, pouca função imunológica, e uma extraordinária capacidade da ASH em transportar moléculas de fármacos levaram a que muitos estudos fossem direcionados a explorar a possibilidade de usar ASH para entregar vários tipos de novos fármacos projetados para alvos específicos. [Rabbani, 2019]

A interação com a albumina por parte de ligantes altera o padrão e o volume de distribuição, diminui a taxa de depuração e aumenta a meia-vida plasmática do ligante. [Abou-Zied, 2015] A ASH interage principalmente com fármacos hidrofóbicos; no entanto, a seletividade dos sítios de interação é determinada principalmente pelos resíduos de albumina carregados ou polares que estão presentes na vizinhança das cavidades hidrofóbicas. [Abou-Zied, 2015]

Interações fortes podem diminuir a concentração de fármacos livres no plasma, enquanto uma interação fraca pode levar a um tempo de vida curto. A interação com a ASH tem um grande impacto na transferência de fármacos para os tecidos. [Pirna, 2008; Abou-Zied, 2015] Dois comportamentos de interação foram descritos, denominados como interação restritiva e permissiva. Na interação restritiva, apenas a fração do fármaco que está livre no líquido extracelular está disponível para ser transferida para os tecidos. Isso corresponde aos

compostos de forte interação com cinética de dissociação lenta. Pelo contrário, a interação permissiva é caracterizada por uma interação que não restringe a quantidade de fármaco que é ingerida pelos tecidos, sendo controlada exclusivamente pela afinidade do tecido em particular pelo fármaco. [Colmenarejo, 2003; Abou-Zied, 2015]

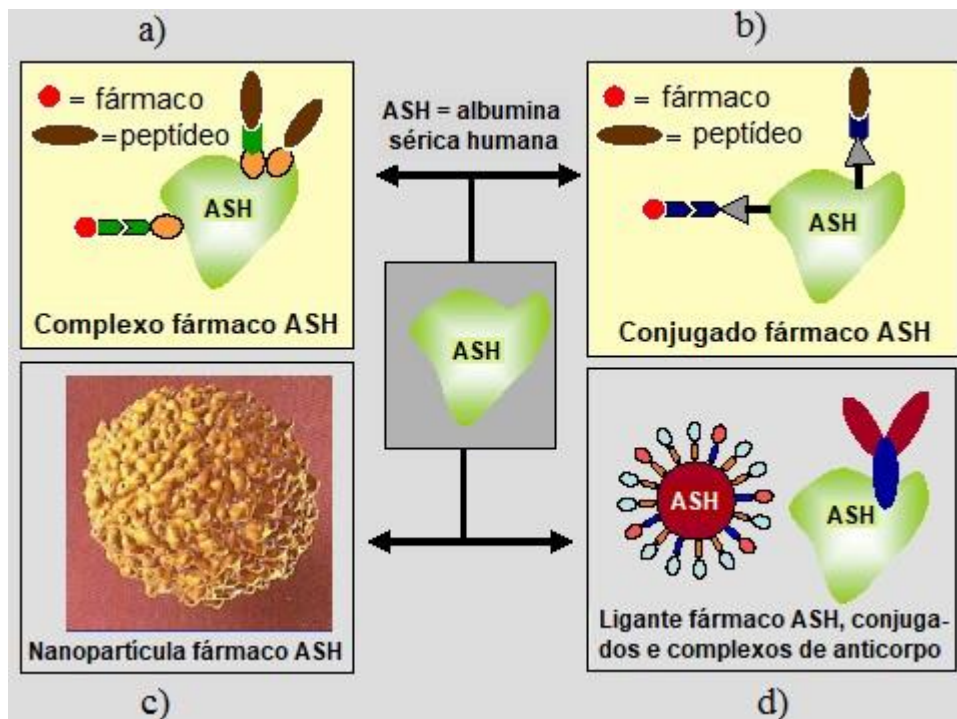
Assim, entre os quatro aspectos importantes da farmacocinética de fármacos (absorção, distribuição, metabolismo e excreção, ou ADME), a ASH tem forte impacto nos três últimos, [Meloun, 1975; Wang, 2015] sendo que a afinidade de interação de ASH é altamente dependente de suas mudanças conformacionais. [Varshney, 2010] Nesse sentido, a ASH surgiu como um carreador versátil para agentes terapêuticos, principalmente para o tratamento de diabetes e câncer, melhorando o perfil farmacocinético do fármaco ou entregando o fármaco ao sítio patogênico. [Kratz, 2014]

Para o tratamento de câncer, além da capacidade de atuar como um carreador, também têm sido exploradas as características que estão ligadas ao diâmetro hidrodinâmico efetivo de 7,2 nm da ASH, permitindo extravasamento para o tecido tumoral, mas não para o tecido normal [Yuan, 1995; Hobbs, 1998]. Além disso, devido a ASH ter peso molecular >40 kDa, ela pode ser eliminada lentamente do interstício tumoral; consequentemente, altas concentrações intratumorais permanecem mesmo 4 dias após a aplicação. [Noguchi, 1998] Dessa forma, a combinação de permeabilidade e retenção aumentadas deve ser o fator responsável pelo acúmulo de albumina em tumores sólidos. [Maeda, 2000; Gou, 2016]

O desenvolvimento de pró-fármacos é uma das estratégias mais promissoras para aumentar a eficiência e diminuir os efeitos colaterais de fármacos. [Joshi, 2014] Os pró-fármacos baseados em ASH têm sido extensivamente estudados devido à grande disponibilidade de resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos contendo grupos funcionais que possuem átomos de S e N bem como carboxilatos, agindo como doadores de elétrons, e que são ativos para modificação química. [Zheng, 2014; Liu, 2010; Elsadek, 2012; Gou, 2016]

As principais tecnologias que usam albumina como carreador de fármacos são: **a)** fármacos, pró-fármacos ou polipeptídeos que podem interagir fisicamente através de um ligante ou grupo de interação de proteína a ASH; **b)** fármacos, pró-fármacos ou polipeptídeos que podem interagir covalentemente através de um ligante ou grupo de interação de proteína a ASH; **c)** nanopartículas, estruturas micelares ou microbolhas com fármacos lipofílicos ou agentes de diagnóstico que podem ser preparadas como formulações galênicas solúveis em

água, adequadas para injeção intravenosa e **d)** nanocorpos ou anticorpos bi-específicos que interagem fisicamente ou são fundidos com albumina substituindo o fragmento Fc da imunoglobulina G (Figura 28). [Kratz, 2012]



**Figura 28.** Representação esquemática dos processos mecânicos empregando ASH como carreador de compostos bioativos. [Kratz, 2012]

### 2.3 Propriedades de proteínas fluorescentes

Nas aplicações bioquímicas normalmente se utiliza a fluorescência intrínseca da espécie a ser investigada. 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 interpretação dos dados espectrais. [Lakowicz, 2006]

Do ponto de vista espectroscópico, a grande vantagem da utilização do triptofano na interpretação estrutural das proteínas reside no fato de que a 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]

A emissão de fluorescência do Trp pode ser suprimida pela adição de um supressor externo ou por grupos próximos dentro da proteína. Um fator que complica a interpretação da fluorescência de proteínas é a presença de inúmeros aminoácidos fluorescentes, tais como tirosina, fenilalanina e triptofano bem como possíveis mudanças conformacionais. O ambiente de cada resíduo é distinto, da mesma forma que as suas propriedades espectrais. Entretanto, o espectro de absorção e emissão de resíduos de Trp em proteínas recobre a maioria dos comprimentos de onda úteis sendo difícil separar contribuições de cada Trp em uma proteína multi-Trp. Mesmo as proteínas com um único Trp como a ASH, exibem intensidade de desativação multi-exponencial dificultando uma interpretação do processo de desativação via tempo de vida. [Lakowicz, 2006]

A fluorescência de proteína pode ser complexa, entretanto, um progresso considerável foi alcançado nas décadas passadas. A origem do decaimento multi-exponencial do Trp em água está agora largamente entendida como consequência da presença de isômeros rotacionais (rotâmeros). Estes rotâmeros têm diferentes orientações dos grupos amino e carboxila em relação ao anel indólico. A grande variação do rendimento quântico de fluorescência do Trp em diferentes proteínas parece resultar de supressores que se encontram nas proximidades do Trp, os quais incluem resíduos de lisina e histidina. Sob condições apropriadas, parece que mesmo grupos amida na coluna peptídica podem atuar como supressores. [Lakowicz, 2006]

Efeitos anisotrópicos exibidos por Tyr e Trp são sensíveis a difusões rotacionais totais de proteínas e ao grau de movimento segmental durante o tempo de vida do estado excitado. Portanto, a fluorescência de proteínas pode propiciar informações consideráveis sobre a estrutura e a dinâmica proteicas e é sempre usada para estudar dobramento de proteínas e reações de associação. [Lakowicz, 2006]

Sumarizando, o crescente entendimento da fotofísica do grupo indol, a habilidade de se alocar o resíduo Trp em locais almejados e a avaliação de numerosas estruturas de proteínas tem resultado no crescente entendimento de fatores gerais que governam o processo de fluorescência de proteínas. A alta sensibilidade da emissão de fluorescência do Trp quanto aos detalhes de seu ambiente local tem proporcionado inúmeras oportunidades para se estudar função, dinâmica e dobramento de proteínas. [Lakowicz, 2006]

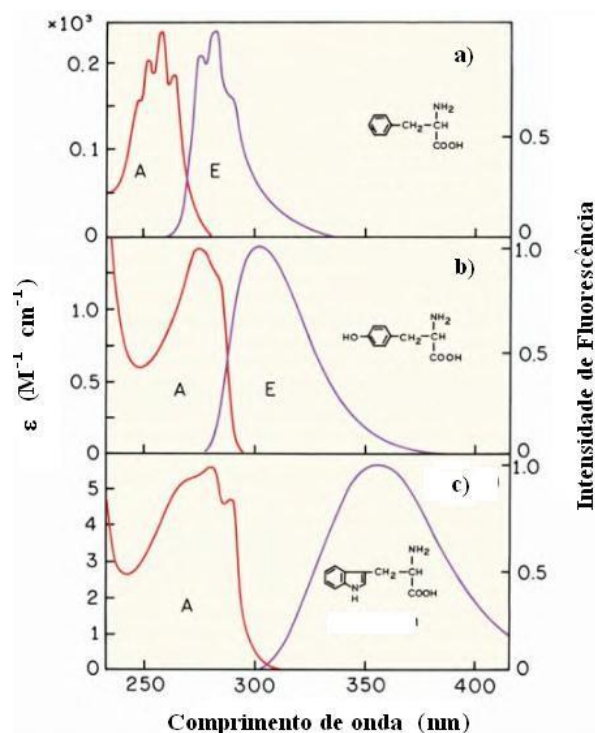
### 2.3.1 Propriedades espectrais dos aminoácidos aromáticos

Como dito anteriormente, os aminoácidos responsáveis pela emissão de fluorescência nas proteínas são Tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe) e Triptofano (Trp), que apresentam diferentes coeficientes de absorção molar e rendimento quântico de fluorescência (Tabela 3). O processo de emissão de fluorescência das proteínas é normalmente dominado pelo resíduo do triptofano (Trp) que absorve em comprimento de onda deslocado para o vermelho quando comparado com tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) (Figura 29), exibindo alto coeficiente de supressão molar, sendo que normalmente a energia absorvida pela fenilalanina e tirosina é transferida para o resíduo Trp na mesma proteína. [Lakowicz, 2006]

**Tabela 3.** Coeficientes de absorvidade molar e rendimento quântico de fluorescência para Phe, Tyr e Trp em solução aquosa neutra a 23°C.

<i>Aminoácido</i>	$\lambda_{abs} (nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	$\epsilon (M^{-1}.cm^{-1})$	$\phi_f$
Fenilalanina, Phe	257	282	200	0,03
Tirosina, Tyr	274	303	1400	0,14
Triptofano, Trp	280	340	5600	0,13

[Lakowicz, 2006]



**Figura 29.** Espectro de absorção e emissão de fluorescência para os aminoácidos **a)** fenilalanina, **b)** tirosina e **c)** triptofano. [modificado de Lakowicz, 2006]

A fenilalanina (Phe) exibe os seus espectros de absorção e emissão deslocados para o azul quando comparados com os demais resíduos fluorescentes ( $\lambda_{\text{abs}} = 257$  e  $\lambda_{\text{em}} = 282$  nm). Já para o resíduo de Tyr os processos de absorção e emissão se encontram em uma situação intermediária ( $\lambda_{\text{abs}} = 274$  e  $\lambda_{\text{em}} = 303$  nm), sendo relativamente insensíveis à polaridade do solvente. Os espectros de absorção e emissão do Trp estão deslocados para o vermelho e em água apresentam os seguintes valores:  $\lambda_{\text{abs}} = 280$  nm e  $\lambda_{\text{em}} = 340$  nm. [Lakowicz, 2006]

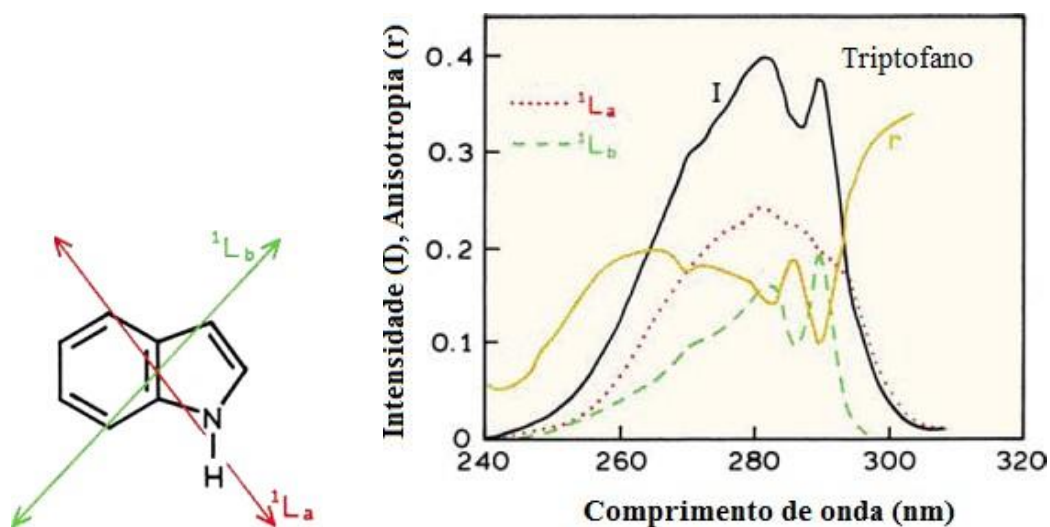
Nos estudos de fluorescência de proteínas, estas são geralmente excitadas em seu máximo de absorção, a cerca de 280 nm ou em comprimento de onda mais longo. Consequentemente, a fenilalanina (Figura 29) não é excitada na maioria dos experimentos. Além disso, o rendimento quântico de fluorescência da Phe é pequeno, em torno de 0,03 (Tabela 3). Assim, a emissão deste resíduo proteico é raramente observada. A absorção da proteína em 280 nm se deve tanto aos resíduos de Tyr quanto ao Trp. A 23 °C, em solução aquosa neutra, o rendimento quântico de fluorescência de Tyr e Trp é de 0,14 e 0,13 respectivamente. Em comprimentos de onda maiores que 295 nm a absorção é predominantemente a partir do Trp. [Lakowicz, 2006]

Devido às suas características químicas, a tirosina se apresenta como um fluoróforo bastante simples. Seu comportamento fotofísico pode apresentar uma maior complexidade em determinados pH. A função fenólica presente em sua estrutura faz com que o seu comportamento químico no estado excitado seja totalmente diferente do estado fundamental. No estado excitado a tirosina pode ser facilmente ionizada ( $pK_a=4$ ), enquanto no estado fundamental esse resíduo de aminoácido apresenta menor acidez ( $pK_a=10$ ). Em solução neutra, o grupo hidroxila do sistema aromático pode dissociar durante o tempo de vida de estado excitado, levando à diminuição do rendimento quântico de fluorescência. Emissão de tirosina só é observável em algumas proteínas, porém, acredita-se que o caminho preferencial para o processo de desativação a partir do estado excitado seja o processo de ionização. [Lakowicz, 2006]

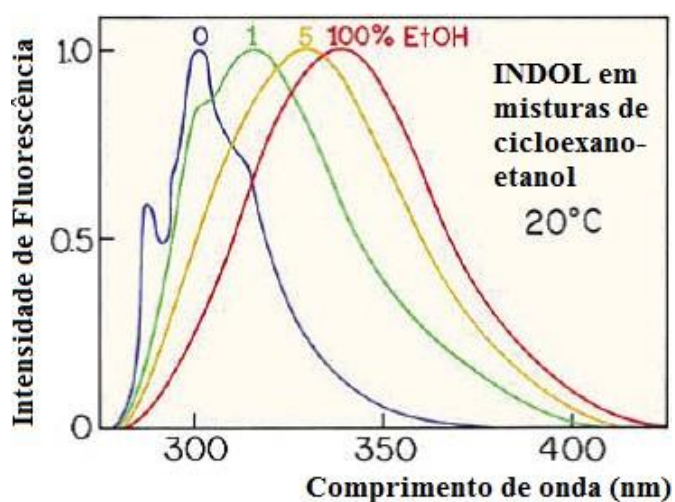
Outro processo de desativação que pode estar contribuindo para o baixo rendimento quântico de fluorescência por parte da Phe e da Tyr pode ser atribuído a processos de transferência de energia que podem ocorrer por vários mecanismos, como transferência de energia de Förster ou mesmo pelo mecanismo trivial. No caso específico do Trp podemos esperar ainda efeito de filtro interno em altas concentrações de proteínas. [Lakowicz, 2006]

O resíduo indólico do triptofano possui duas bandas de emissão características. A possibilidade de excitação eletrônica para dois níveis de energia quase isoenergéticos,  $^1L_a$  e  $^1L_b$  introduz o fenômeno de anisotropia molecular e consequentemente apresentam bandas de absorção (Figura 30) e emissão distintos que são diferentemente sensíveis à polaridade do solvente (Figura 31). [Lakowicz, 2006]

Um segundo efeito associado às mudanças no processo de emissão de fluorescência do Trp está relacionado à sua habilidade de doar elétron no estado excitado (aumento do potencial de redução quando excitado) e, como consequência, há a possibilidade de supressão da fluorescência por um mecanismo colisional. [Lakowicz, 2006]



**Figura 30.** Espectro de excitação para a fluorescência (I) e de anisotropia do triptofano (r), em propilenoglicol à  $-50^{\circ}\text{C}$ . Também são mostrados os espectros de anisotropia-resolvida das transições  $^1L_a$  (pontilhada) e  $^1L_b$  (tracejada). [modificado de Lakowicz, 2006]



**Figura 31.** Espectro de emissão de fluorescência do resíduo indólico do triptofano em diferentes ambientes químicos. [modificado de Lakowicz, 2006]

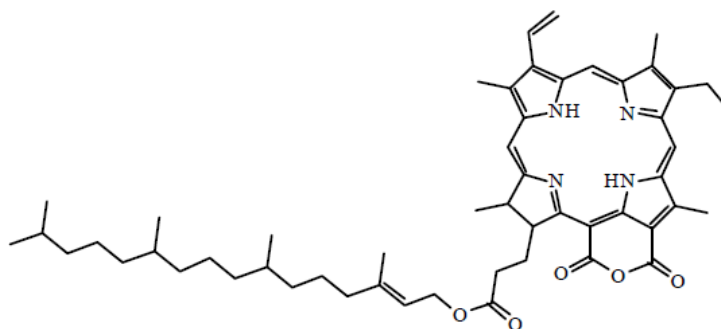


## 2.4 Estudos da interação de compostos bioativos com ASH realizados no Laboratório de Fotoquímica do Instituto de Química da UFRRJ

Nos últimos dez anos, buscando contribuir para a ampliação do conhecimento da interação de compostos bioativos com proteínas séricas, o grupo de fotoquímica liderado pelo professor Dr. José Carlos Netto-Ferreira tem se concentrado nos estudos da interação de uma série de compostos de grande interesse biológico com albuminas, principalmente albumina sérica humana. Os trabalhos em colaboração com diferentes grupos de pesquisa nacionais e internacionais resultaram na publicação de uma série de artigos científicos.

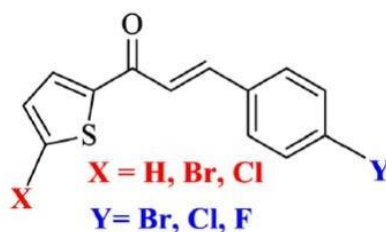
Nesse sentido podemos destacar os estudos dos compostos:

- a) Compostos do grupo das feofitinas (18FP) extraído das folhas da planta *Talinum triangulare*. Essas substâncias, relacionadas à clorofila, possuem propriedades fotofísicas que lhes conferem potencial aplicação em terapia fotodinâmica. [Chaves, 2015]



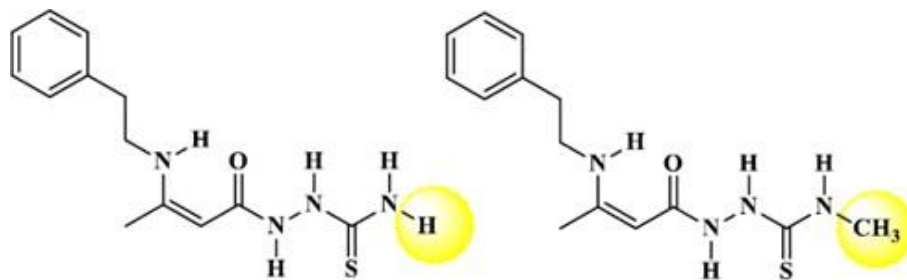
**18FP**

- b) Compostos da classe dos tiofeno-chalconas halogenadas (TCH T1-9) mostraram potentes atividades como inibidores seletivos reversíveis da MAO-B. [Chaves, 2017]



**TCH T1-9**

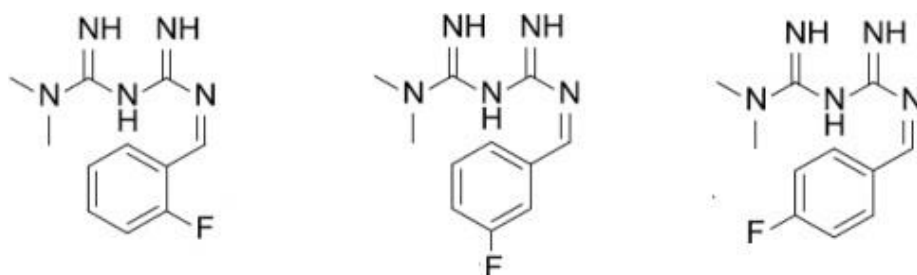
c) „Compostos derivados da tiossemicarbazida (ETS1 e ETS2) com significativa atividade biológica em direção da enzima tirosinase. [Chaves, 2018] e [Chaves, 2018]



**ETS1**

**ETS2**

d) Compostos derivados fluorados da metformina (MTF1, MTF2 e MTF3) que é um hipoglicemiante oral prescrito para o tratamento do diabetes mellitus tipo II. [Chaves, 2018]

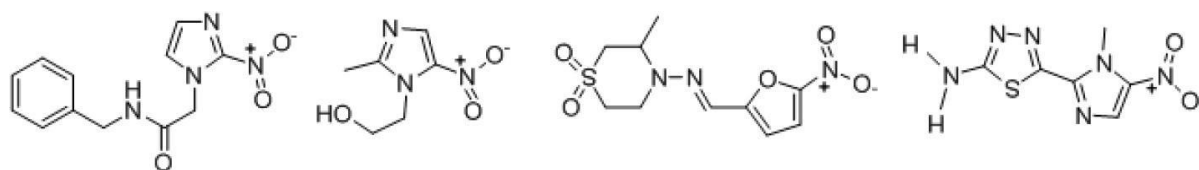


**MTF1**

**MTF2**

**MTF3**

e) Compostos com potencial antiparasitários benznidazol (BZL), metronidazol (MTZ), nifurtimox (NFX) e megalol (MZ). [Chaves, 2018]



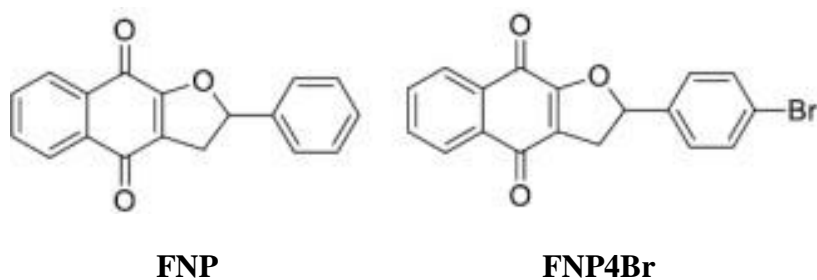
**BZL**

**MTZ**

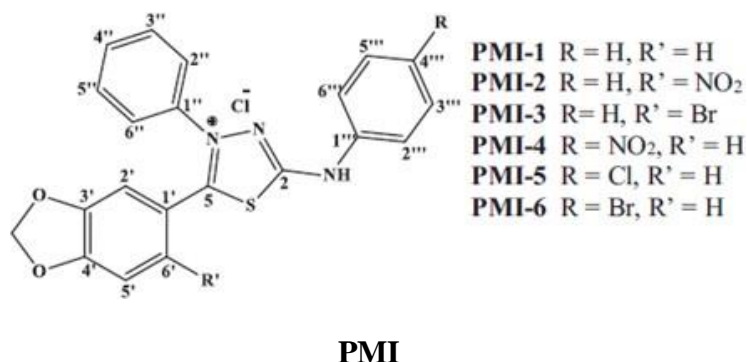
**NFX**

**MZ**

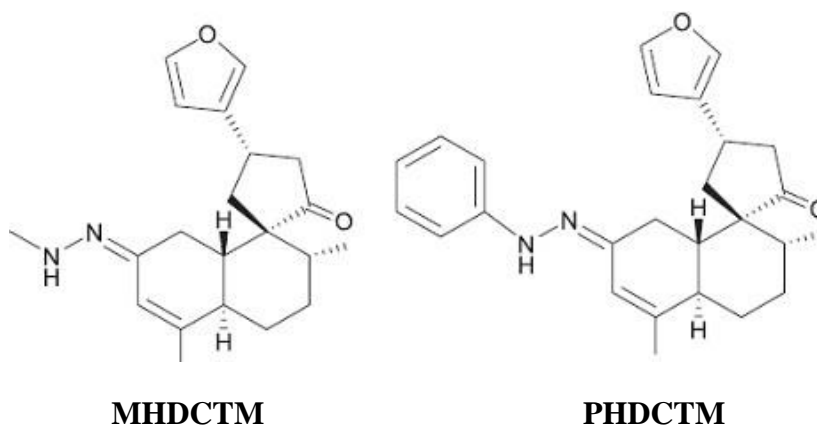
f) Compostos derivados biologicamente ativos de 1,4-naftoquinona (FNP e FNP4Br) que demonstrou potencial atividade biológica como inibidor da cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, bem como possível inibidor de seis cepas de *Candida*: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*, e inibidor de quatro linhas de células tumorais humanas: HL-60 (leucemia), SF-295 (CNS), HCT-8 (cólon) e MDA-MB435 (melanoma). [Ferreira, 2018]



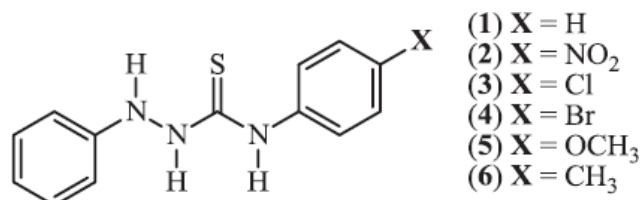
g) Uma nova série de derivados mesoiônicos piperonais (PMI 1-6) com potencial inibição da tirosinase. [Lopes, 2018]



h) Compostos derivados semissintéticos da trans-desidrocrotonina-metil-hidrazona (MHDCTN) e fenil-hidrazona (PHDCTN) exibindo potencial atividade anticancerígena. [Chaves, 2018]

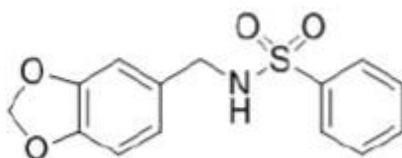


- i) Uma série de N-aryl-2-fenil-hidrazinacarbotoamidas (HCTA) tem sido investigada como possível inibidora da tirosinase, enzima envolvida no desenvolvimento de melanomas. [Sousa-Pereira, 2018]



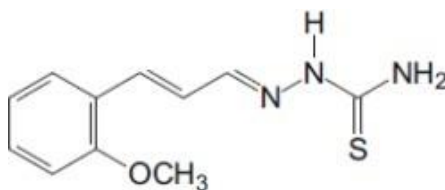
**HCTA**

- j) Composto com potencial anticancerígeno derivado da capsaicina (RPF101). [Chaves, 2018]



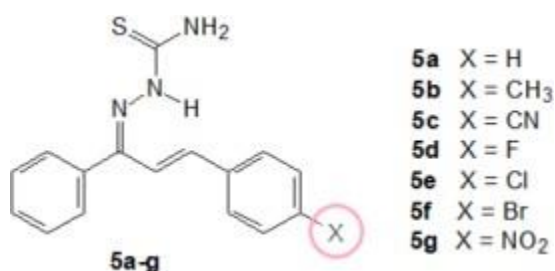
**RPF101**

- k) Composto derivado da tiossemicarbazona (MTSC) apresentando alta capacidade de inibir o crescimento de células cancerígenas, bem como baixa toxicidade. [Chaves, 2019]



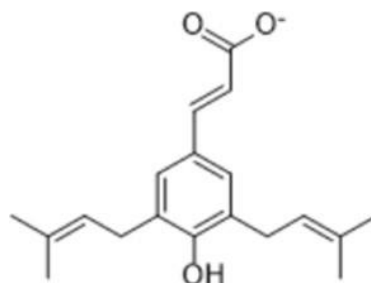
**MTSC**

- l) Composto derivado da chalcona-tiossemicarbazonas (CTSC) com atividade antileishmania. [Mendes, 2019]



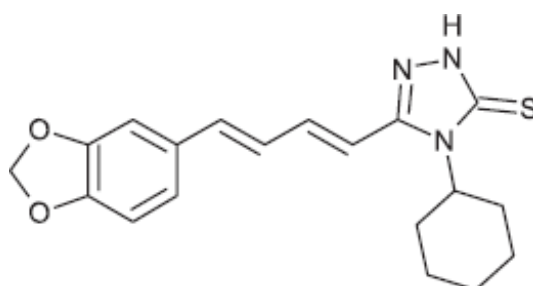
**CTSC**

m) Composto natural Artepillin-C (ATP-C) extraído da própolis verde brasileira produzida na região sudeste do país pelas abelhas *Apis mellifera*, que apresenta diversas atividades biológicas como antimicrobiano, antitumoral, anti-inflamatório e antioxidante que estão associados à presença do (ATY-C). [Chaves, 2019]



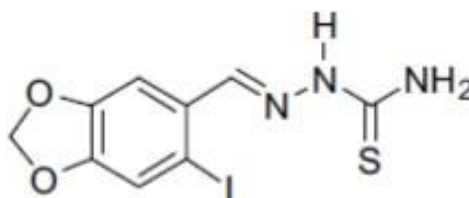
**ATP-C**

n) Com um composto derivado do 1,2,4-triazóis (124TZ) com atividade tripanocida. [Franklin, 2018]



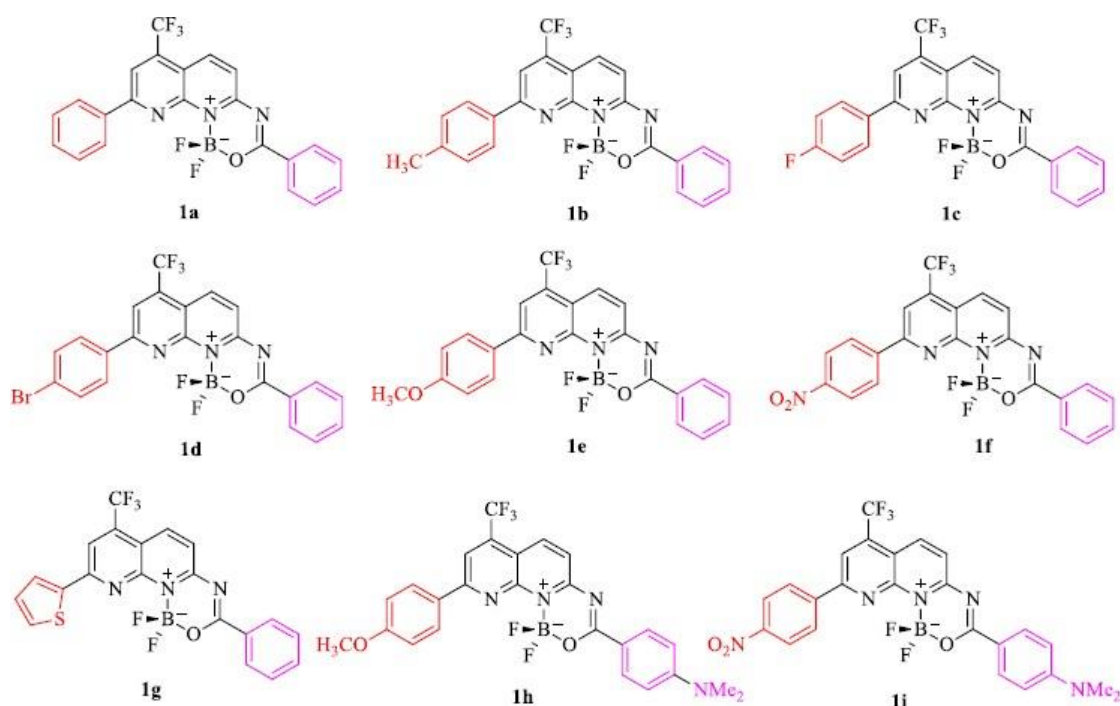
**124TZ**

o) Composto com potencial antiparasitário (*E*)-2-((6-iodobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)metileno) hidrazinacarbotoamida (6-IPTSC). [Chaves, 2020]



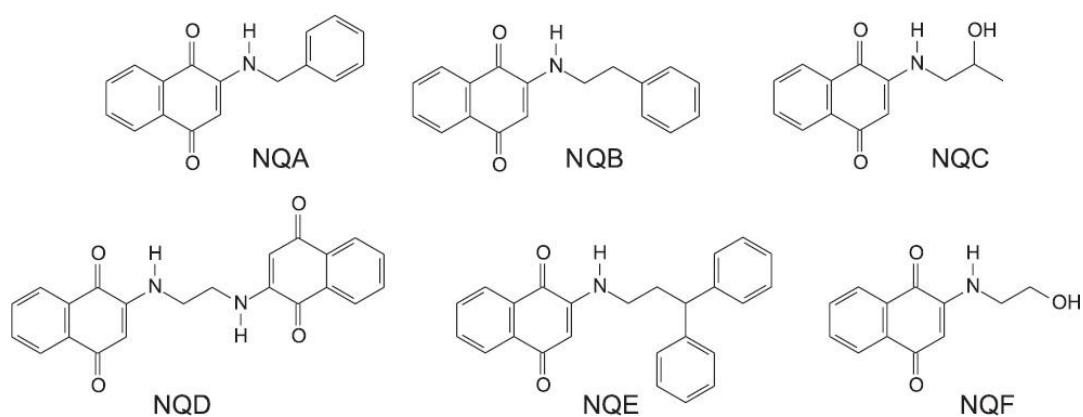
**6-IPTSC**

p) Complexo sintético derivado da BF<sub>2</sub>-naftiridina (BF<sub>2</sub>NF 1a-i) com atividade de inibição da acetilcolinesterase. [Chaves, 2020]



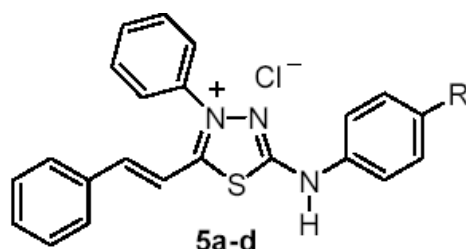
### BF<sub>2</sub>NF

q) Com compostos derivados da 2-amino-1,4-naftoquinona (NQA-F) com potencial atividade contra quatro cepas de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e cinco Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* β-lactamase positiva). [Silva, 2020]



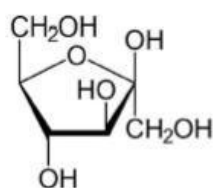
### NQ

r) Os compostos derivados de cloreto de (*E*)-3-fenil-5-(fenilamino)-2-estiril-1,3,4-tiadiazol-3-io (TD5a-d) com potencial atividade biológica contra linhagens celulares MT2 e C92 infectados com o vírus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1), que causa leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL). [Sousa-Pereira, 2020]

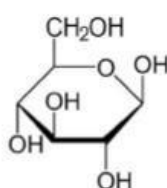


R = CH<sub>3</sub> (**5a**), OCH<sub>3</sub> (**5b**), Cl (**5c**), Br (**5d**)

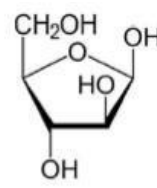
s) Com monossacarídeos frutose, glicose e arabinose, que têm forte impacto na formação de produtos finais de reação de glicação avançada de ASH (AGEs), prevalentes em pessoas com diabetes. [Chaves, 2021]



**Frutose**



**Glicose**



**Arabinose**

Em todos os casos estudados os resultados obtidos pela supresão de fluorescência através das equações de Stern-Volmer, indicam um processo estático. Os valores termodinamicos  $\Delta G^0$ ,  $\Delta H^0$  e  $\Delta S^0$  a 310K bem como os respectivos sítios de interação com ASH estão descritos na tabela 4.

**Tabela 4. Estudo da interação de compostos bioativos com ASH realizados pelo grupo de fotoquímica da UFRRJ liderado pelo prof. Dr José Carlos Netto Ferreira.**

Composto	$\Delta G^0(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta H^0(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S^0(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$	Sítio (ASH)	Referência
<b>18-FP</b>	-28,4	$15,5 \pm 1,2$	0,145	I	[Chaves, 2015]
<b>TCH-T1</b>	-28,1	$14,1 \pm 0,4$	0,136	I	[Chaves, 2017]
<b>TCH-T2</b>	-27,9	$41,9 \pm 4,4$	0,225	I	[Chaves, 2017]
<b>TCH-T3-</b>	-27,7	$24,1 \pm 1,8$	0,167	I	[Chaves, 2017]
<b>TCH-T4</b>	-28,0	$22,8 \pm 2,5$	0,164	I	[Chaves, 2017]
<b>TCH-T5</b>	-33,1	$-18,7 \pm 0,5$	0,0305	I	[Chaves, 2017]
<b>TCH-T6</b>	-29,6	$150,8 \pm 21,3$	0,582	I	[Chaves, 2017]
<b>TCH-T7</b>	-28,0	$17,0 \pm 3,1$	0,145	I	[Chaves, 2017]
<b>TCH-T8</b>	-27,0	$13,6 \pm 2,0$	0,131	I	[Chaves, 2017]
<b>TCH-T9</b>	-28,9	$11,1 \pm 1,1$	0,129	I	[Chaves, 2017]
<b>EST1</b>	-30,0	$-28,7 \pm 2,9$	3,940	I	[Chaves, 2018]
<b>ETS2</b>	-24,6	$33,4 \pm 3,3$	0,187	I	[Chaves, 2018]
<b>MTF1</b>	-25,1	$-135,0 \pm 8$	-0,357	I	[Chaves, 2018]
<b>MTF2</b>	-27,2	$-19,2 \pm 4,4$	0,025	I	[Chaves, 2018]
<b>MTF3</b>	-23,7	$-31,1 \pm 2,3$	-0,023	I	[Chaves, 2018]
<b>BZL</b>	-31,1	$-5,3 \pm 0,55$	0,083	I	[Chaves, 2018]
<b>MTZ</b>	-32,1	$-1,1 \pm 0,02$	0,100	I	[Chaves, 2018]
<b>NTZ</b>	-27,3	$27,6 \pm 2,20$	0,177	I	[Chaves, 2018]
<b>MZ</b>	-31,6	$-6,1 \pm 0,04$	0,082	I	[Chaves, 2018]
<b>FNP</b>	-29,1	$-15,1 \pm 0,29$	0,045	I	[Ferreira, 2018]
<b>FNP4BR</b>	-24,9	$-3,5 \pm 0,29$	0,069	I	[Ferreira, 2018]
<b>PMI5</b>	-28,8	-4,9	0,077	I	[Lopes, 2018]
<b>PMI6</b>	-28,3	-16,5	0,038	I	[Lopes, 2018]
<b>MHDCTN</b>	-31,9	$-18,5 \pm 1,9$	0,043	I	[Chaves, 2018]
<b>PHDCTN</b>	-31,8	$41,4 \pm 6,5$	0,236	I	[Chaves, 2018]
<b>HCTA4</b>	-27,8	$17,2 \pm 1,3$	0,145	I	[Sousa-Pereira, 2018]
<b>RPF101</b>	-28,6	$149 \pm 20$	0,573	I	[Chaves, 2018]
<b>MTSC</b>	-28,2	$11,6 \pm 1,1$	0,053	I	[Chaves, 2019]
<b>CHTSC5e</b>	-27,6	$-5,8 \pm 0,27$	7,020	I	[Mendes, 2019]
<b>ATP-C</b>	-33,5	$-19,9 \pm 1,10$	0,043	I	[Chaves, 2019]
<b>124TZ</b>	-31,1	$5,1 \pm 0,29$	0,117	I	[Franklin, 2019]

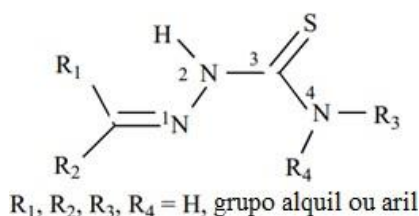


<b>Tabela 4</b>	continuação				
<b>BF2NF1a</b>	-29,1	$-25,9 \pm 0,09$	0,010	I	[Chaves, 2020]
<b>BF2NF1b</b>	-34,9	$-31,9 \pm 3,27$	0,009	I	[Chaves, 2020]
<b>BF2NF1c</b>	-30,0	$22,4 \pm 1,58$	0,169	I	[Chaves, 2020]
<b>BF2NF1d</b>	-52,2	$-39,7 \pm 0,08$	0,040	I	[Chaves, 2020]
<b>BF2NF1e</b>	-36,4	$-32,2 \pm 1,93$	0,013	I	[Chaves, 2020]
<b>BF2NF1f</b>	-29,0	$14,4 \pm 0,33$	0,140	I	[Chaves, 2020]
<b>BF2NF1g</b>	-29,7	$10,3 \pm 1,31$	0,129	I	[Chaves, 2020]
<b>BF2NF1h</b>	-68,1	$-47,3 \pm 2,18$	0,067	I	[Chaves, 2020]
<b>BF2NF1i</b>	-31,5	$-30,0 \pm 1,31$	0,004	I	[Chaves, 2020]
<b>6-IPSC</b>	-98,8	-62,2	0,118	I	[Chaves, 2020]
<b>NQA</b>	-75,7	$-47,8 \pm 4,9$	0,089	I	[Silva, 2020]
<b>NQC</b>	-37,4	$-31,6 \pm 0,9$	0,018	I	[Silva, 2020]
<b>NQF</b>	-49,7	$-37,8 \pm 0,3$	0,038	I	[Silva, 2020]
<b>TD5a</b>	-28,9	$-2,64 \pm 0,15$	0,085	I	[Sousa-Pereira, 2020]
<b>TD5b</b>	-29,2	$-1,88 \pm 0,17$	0,088	I	[Sousa-Pereira, 2020]
<b>TD5c</b>	-29,7	$6,27 \pm 0,10$	0,116	I	[Sousa-Pereira, 2020]
<b>TD5d</b>	-29,4	$3,43 \pm 0,16$	0,106	I	[Sousa-Pereira, 2020]
<b>Frutose</b>	-167	$-92,0 \pm 19,9$	0,243	I	[Chaves, 2021]
<b>Glicose</b>	-134	$-74,6 \pm 2,7$	0,191	I	[Chaves, 2021]
<b>Arabinose</b>	-184	$-98,3 \pm 21,7$	0,275	I	[Chaves, 2021]

## 2.5 Moléculas bioativas

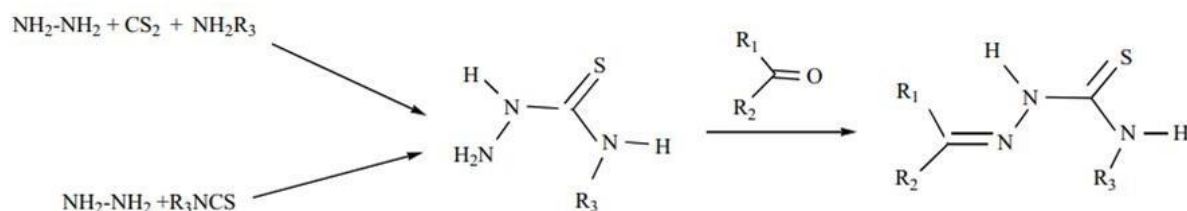
### 2.5.1 Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas (TSCNs) constituem uma ampla família de compostos com estrutura geral  $R_1R_2C=N-NH-C=S-NR_3R_4$  (Esquema 1). São compostos particularmente atraentes porque muitos deles apresentam alguma atividade biológica contra uma ampla gama de microrganismos e células cancerígenas. Sua atividade pode estar relacionada às suas propriedades eletrônicas e estruturais que oferecem um rico conjunto de átomos doadores para coordenação de metais e uma alta deslocalização eletrônica, proporcionando diferentes modos de interação para biomoléculas. [Matesanz, 2021]



Esquema 1

As tiossemicarbazidas podem ser obtidas por uma série de procedimentos sintéticos (Esquema 2). Por exemplo, a reação de hidrato de hidrazina com isotiocianatos ou a reação de aminas com dissulfeto de carbono, seguida da adição de hidrato de hidrazina. [Lobana, 2012; Matesauz, 2009]



Esquema 2

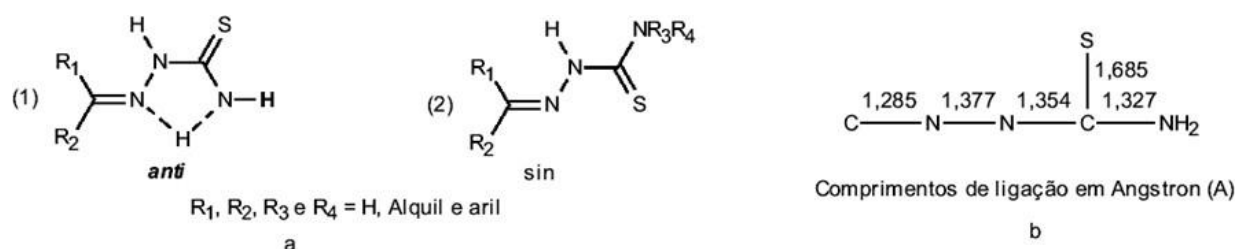
Sua aplicabilidade específica varia em função da modificação química apropriada e sua interação com diferentes metais de transição. [Sales, 2021] A forte tendência dos TSCNs de formar quelatos com íons metálicos proporciona complexos com alta estabilidade. Essa tendência torna as moléculas de TSCN uma fonte potente para extrair íons metálicos de diferentes ambientes. [Matesanz, 2021]

Segundo Casas e colaboradores [Casas, 2000], as tiossemicarbazonas não substituídas na posição N4 ( $\text{C}=\text{N}-\text{NH}-\text{C}=\text{S}-\text{NH}_2$ ) são aproximadamente planares, com o átomo de enxofre em posição *anti* em relação ao átomo de nitrogênio da função imina (Esquema 1). [Tenório, 2005]

As tiossemicarbazonas apresentam-se como sistemas com extrema deslocalização eletrônica, principalmente quando há grupos aromáticos ligados ao carbono da imina. Esta afirmação está baseada nos trabalhos pioneiros de Palenik e colaboradores [Palenik, 1974]. O Esquema 3 mostra a influência nos comprimentos de interação devido à deslocalização dos elétrons nas tiossemicarbazonas. [Tenório, 2005] Pode-se observar que o fragmento N-C-N apresenta um comprimento de interação muito próximo ao observado para as ligações duplas ( $\text{C}=\text{C}$ , 1,201–1,246 Å) [Allen, 1983], enquanto na interação C-S (1,685 Å) ocorre exatamente o inverso, indicando que o átomo de enxofre permite um maior envolvimento das duas ligações C-N na deslocalização dos elétrons. [Casas, 2000; Tenório, 2005]

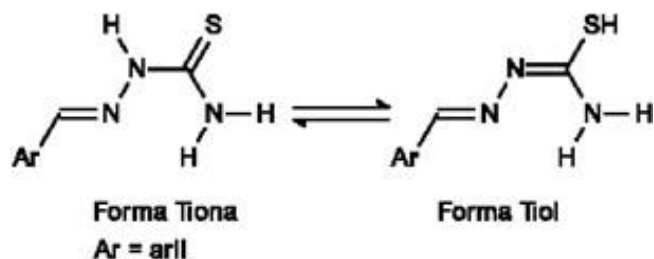
O caráter parcial de interação dupla C-N também pode ser facilmente evidenciado pela técnica de espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ), uma vez que os hidrogênios em  $\text{NH}_2$  aparecem como dois sinais não equivalentes. Isto acontece devido à rotação restrita da interação C- $\text{NH}_2$  por conta da interação dupla parcial que, desta forma, torna os hidrogênios diastereotópicos. [Tarasconi, 2000; Jouad, 2001; Tenório, 2005]

O espectro na região do infravermelho (IV) mostra a forma predominante deste tautomerismo, uma vez que o aparecimento de uma banda forte na região de 1028-1082  $\text{cm}^{-1}$  indica a presença da tiocarbonila ( $\text{C}=\text{S}$ ). Contudo, a ausência desta banda e o aparecimento de outra na região de 2500-2600  $\text{cm}^{-1}$  demonstram que a forma tiol é mais predominante. [Bharti, 2003; Antonini, 1977] Vale ressaltar que o baixo valor da banda de estiramento de  $\text{C}=\text{S}$  é devido ao seu acentuado caráter de interação simples, e que esta pode variar de acordo com o ambiente químico. [Galabov, 2003; Lauvergnat, 1997; Vassilev, 2003; Crews, 1998; Tenorio 2013] Por exemplo, seu caráter hidrofóbico depende da substituição dos átomos de hidrogênio da amina. [Tenório, 2005; Matesanz, 2009; Sales 2021]



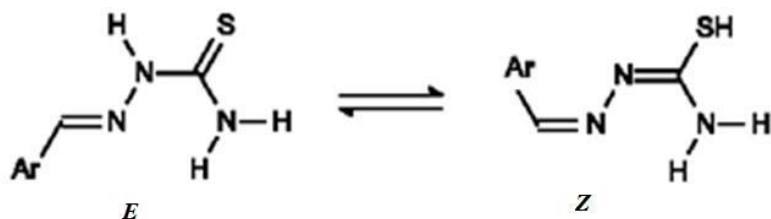
**Esquema 3**

Devido à disponibilidade do grupo  $\text{NH-C=S}$ , a tiossemicarbazona exibe tautomerismo tiona-tiol. No sólido eles existem na forma de tiona, mas em solução eles existem como uma mistura de equilíbrio de forma de tiona e tiol como mostrado no Esquema 4. [Muleta, 2019]



**Esquema 4**

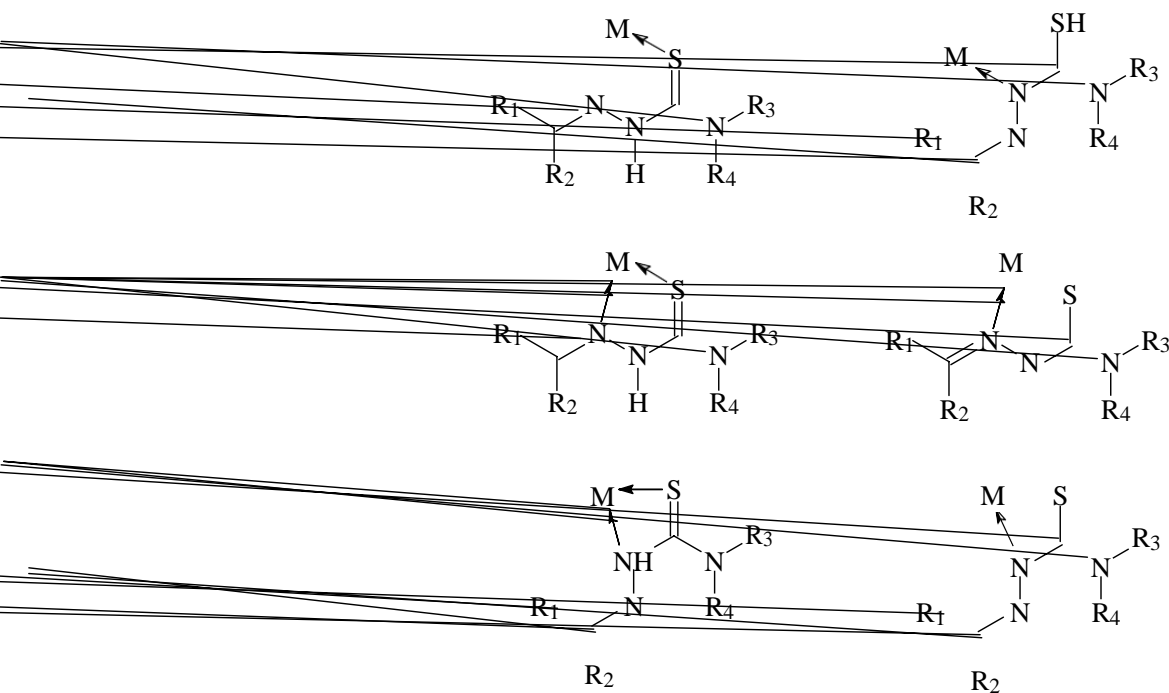
A versatilidade e aplicação dos TSCs podem ser grandemente expandidas devido ao fato desses compostos (apresentando diferentes padrões de substituição) em particular poderem apresentar isomerismo *E/Z* (Esquema 5). [Sales, 2021]



**Esquema 5**

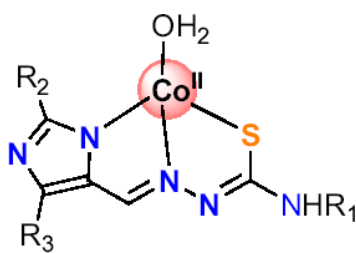
Tiossemicarbazona pode adotar uma variedade de modos de coordenação diferentes. Na maioria das séries, a tiossemicarbazona coordena como ligantes bidentados via nitrogênio azometina e enxofre tiona/tiolato. [Muleta, 2019] As tiossemicarbazonas podem atuar como um ligante monodentado que se liga ao íon metálico através do átomo de enxofre [Lobana, 2006; Suvarapu, 2012] ou como um ligante bidentado que coordena o íon metálico através do

átomo de enxofre e um dos átomos de nitrogênio da fração hidrazina para formar quelato com anéis de quatro ou cinco membros. [Basuli, 1998; Suvarapu, 2012] A forma tiona atua como ligante bidentado neutro e a forma tiol pode desprotonar e servir como ligante bidentado monoaniônico em complexos metálicos (Esquema 6). [Muleta, 2019]



**Esquema 6**

A capacidade de coordenação das tiossemicarbazonas pode ser aumentada devido à presença de aldeídos ou cetonas contendo grupo (s) funcional (is) adicional (is) em posição (ões) adequada (s) para quelatação. [Dessy, 1978; Suvarapu, 2012] Uma série de tiossemicarbazonas e seus complexos contendo heterociclos como pirrol, imidazol, tiazol e triazol demonstrou grande capacidade de formação de um ligante tridentado (Esquema 7). [Matesanz, 2021]



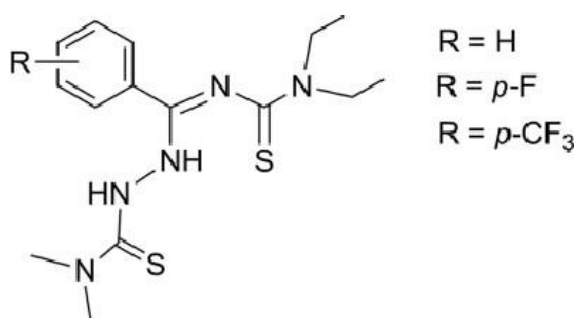
**Esquema 7**

A fração de átomos de flúor quando presente em moléculas biologicamente ativas levou a um aumento muito importante em seus efeitos biológicos. [Wang, 2014; Sharif, 2010] Por várias vezes, as interações fármaco-receptor são melhoradas na presença da fração fluoreto e o transporte do fármaco é facilitado pela alta lipofilicidade dos compostos organoclorados. [Abid, 2012; Santos, 2017]

A substituição por flúor desempenha um papel central na química medicinal. Sabe-se que a introdução criteriosa de flúor em uma molécula orgânica pode influenciar produtivamente na conformação,  $pK_a$ , potência intrínseca, permeabilidade da membrana, vias metabólicas e propriedades farmacocinéticas. Em levantamento feito pelo FDA em 1955, cerca de 150 moléculas fluoradas foram aprovadas para uso terapêutico. Em 2010, estimou-se que cerca de 20% dos medicamentos administrados contêm átomos de flúor ou grupos flúor alquila, uma tendência que está aumentando de 20% para cerca de 30% para todos os medicamentos recém-aprovados, excluindo produtos biofarmacêuticos. [Harrowfield, 1983]

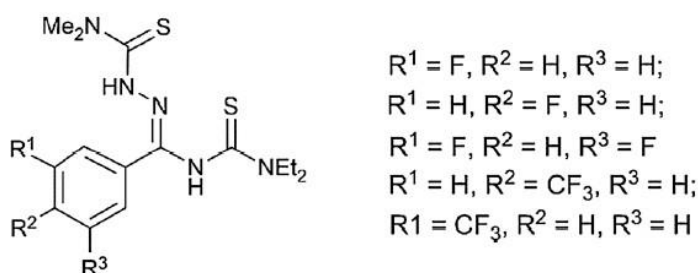
O átomo de flúor pode ser introduzido em moléculas orgânicas como um grupo fluoreto ou trifluormetila, que têm tamanhos e conectividades semelhantes, pela substituição do átomo de hidrogênio, ou de grupos hidroxila ou carbonila, que têm eletronegatividades semelhantes. [Abram, 1998; Salsi, 2020]

Três bis-quelatos de índio (III) com S,N,S-tridentato tiossemicarbazonas (H2L) parcialmente fluoradas (Esquema 8) foram preparados e suas estruturas foram estudadas em solução e no estado sólido por RMN, ESI MS e Difração de raios X de monocristal. Os resultados indicam que a proporção espécies com 5 e 6 coordenadas depende do substituinte presente, sendo as espécies hexacoordenadas preferenciais quando o substituinte é  $CF_3$ . [Salsi, 2020]



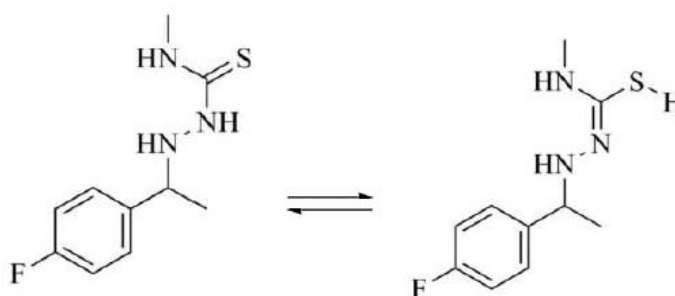
**Esquema 8**

Em estudos anteriores com uma série de tiossemicarbazonas fluoradas, obtidas pela condensação de cloretos de N-(dietilaminotiocarbonil) benzimidazóis halogenados com 4,4-dimetil-3-tiossemicarbazida, foi demonstrado que a fluoreção influencia fortemente as propriedades biológicas dos compostos halogenados contra o parasita *Trypanosoma cruzi*. O composto metafluorado (Esquema 9) foi identificado como o mais potente ( $IC_{50} = 9,0 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $CC_{50} > 200 \text{ } \mu\text{M}$ ), possuindo um índice de seletividade ( $SI = IC_{50}/CC_{50}$ ) que é 4 vezes maior do que o composto não substituído. [Salsi, 2018]



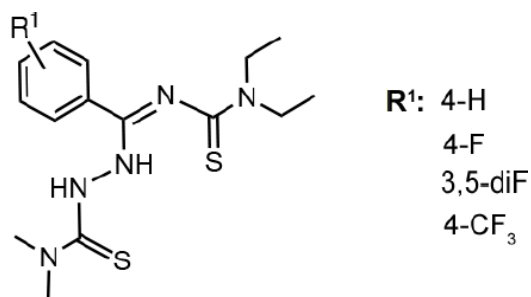
**Esquema 9**

Uma tiossemicarbazona contendo átomo de flúor como substituinte (2E)-2-[1-(4-fluorofenil)etilideno]-N-metil-hidrazina-1-carbotioamida (Esquema 10) foi estudada por cristalografia de Raio-X (refinado pelo Método semi-empírico PM7) e métodos computacionais (cálculos *ab initio* MP2), indicando que a forma tautomérica tiona é termodinamicamente mais estável do que a forma tautomérica tiol em 52,46 kJ/mol na fase gasosa, sendo que o tautômero tiona predomina no estado sólido. [Singh, 2019]



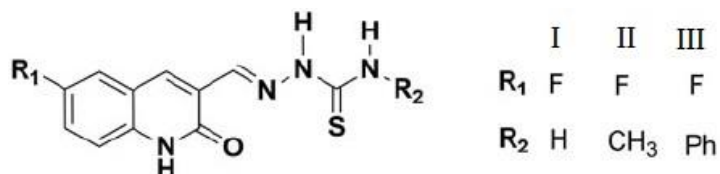
**Esquema 10**

Uma série de complexos mistos [3+2] formados entre rênio (Re) e tiossemicarbazonas tridentadas, tendo um grupo fenila substituído por átomos de flúor em 4-F, 3,5-di-F e 4-CF<sub>3</sub> (Esquema 11), apresentaram propriedades antiparasitárias quando testadas contra as formas epimastigotas e tripomastigotas de duas cepas de *Trypanosoma cruzi* e a forma amastigota de uma delas. Os resultados deste estudo indicam que a atividade dos complexos de rênio pode ser claramente modulada pela substituição de seus ligantes por fluoro. [Salsi, 2019]



**Esquema 11**

Uma série de 2-quinolona tiossemicarbazona fluoradas (Esquema 12) apresentou atividade antibacteriana com MCB (mínima concentração bactericida) na faixa de 15 a 29 mM contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* Rosenbach (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. A melhor atividade foi observada quando um halogênio de maior raio atômico, como cloro e bromo, foi substituído em C-6 na estrutura de quinolona e quando um grupo fenila planar estava presente na porção tiossemicarbazona. A atividade foi reduzida quando um átomo de flúor estava presente em C-6 ou quando um grupo metila estava ligado à tiossemicarbazona. [Govender, 2019]



**Esquema 12**

Os estudos para um conjunto de (*E*)-tiossemicarbazonas substituídas com grupo fenila indicam que, dos compostos fluorados estudados (Esquema 13), aquele apresentando substituição por flúor na posição 3 foi o mais ativo biologicamente frente à inibição de MAO-B, apresentando valores de IC<sub>50</sub> de 0,27 ± 0,015 μM. [Mathew, 2018]



**Esquema 13**



### 2.5.2 Metforminas

A história da metformina está intimamente ligada à *Galega officinalis*, um medicamento tradicional à base de plantas (também conhecido como arruda de cabra e lilás francês), que foi usado desde a Idade Média para tratar os sintomas do que agora sabemos ser diabetes. A erva é uma fonte rica em alcalóides, incluindo guanidina (aminometanomidina) e a galegina, menos tóxica (isoamilenoguanidina). [Bailey, 2004; Thomas, 2017; Drzewoski, 2021]

Pesquisas subsequentes confirmaram essas observações, mas a variabilidade da concentração de glicose, a curta duração do efeito hipoglicêmico e a baixa tolerância limitaram a sua utilidade clínica. Para eliminar esses inconvenientes, uma série de análogos de guanidina foi sintetizada. Logo ficou provado que moléculas com duas guanidinas (biguanidinas) na mesma estrutura: metformina (1,1 dimetilbiguanida), fenformina (feniletilbiguanida) e buformina (butilbiguanida) têm maior efeito do que aquelas que contêm apenas uma guanidina (monoguanidinas). [Drzewoski, 2021]

A síntese pioneira da metformina foi realizada em 1922, por dois químicos irlandeses, Werner e Bell. [Werner, 1922; Drzewoski, 2021] A atividade biológica das biguanidinas foi relatada pela primeira vez para a metformina (N,N-dimetilbiguanida) em 1929. [Slotta, 1929] As décadas de 50 e 60 assistiram ao surgimento de quase todas as biguanidinas famosas, com atividade em vários campos terapêuticos como: antidiabéticos, antimaláricos, desinfetantes e antivirais. [Kathuria, 2018; Grytsai, 2021]

Atualmente, o cloridrato de metformina é um fármaco antidiabético oral de primeira linha, com ênfase especial no tratamento de indivíduos com diabetes mellitus tipo II, especialmente em pessoas obesas ou com sobrepeso, [Campbell, 1996] sendo comercializada com o nome: Glifage, Dimefor, Glucoformin, Glucophage, entre outras marcas, e como medicamento genérico. [Andei, 2016]

Recentemente, as biguanidinas ganharam atenção particularmente crescente em várias áreas, como design de fármacos, química de coordenação e ciência de materiais. [Kathuria, 2018; Grytsai, 2021] As biguanidinas têm sido usadas em química como materiais de partida versáteis em síntese orgânica sendo precursores de vários heterociclos como 1,3,5-triazinas, pirimidinas, heterociclos de boro e benzo[f]quinazolininas [Kathuria, 2018], como catalisadores principalmente para a transesterificação de vários óleos vegetais [Gelbard, 1998], como

superbases [Ishikawa, 2013] e como ligantes para complexação de metais [Ray, 1999] como V(IV), Cr(III), Mn(III), Mn(IV), Co(II), Co(III), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Pd(II), Re(V), Os(VI) [Ray, 1961], sendo que esses complexos encontraram aplicações na área de catálise em várias reações orgânicas como os acoplamentos de Ullmann, de Suzuki, de Suzuki-Miyaura e a reação de Heck. [Kathuria, 2018; Grytsai, 2021]

Os estudos atuais sugerem que a metformina pode ser empregada como fármaco antitumoral, resultando em uma diminuição considerável na incidência de câncer pancreático. [Kordes, 2015] Metformina também pode desempenhar um papel neuroprotetor ao reverter marcas de lesão cerebral (disfunção metabólica, distrofia neuronal e perda celular), além de alterações cognitivas e comportamentais que acompanham o aparecimento de certas doenças cerebrais, como a doença de Alzheimer (DA) e depressão. [El Massry, 2021]

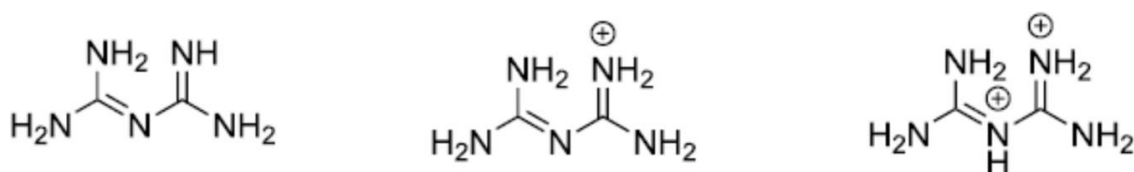
A biguanidina ou amidinoguanidina corresponde a uma função química única com característica puramente sintética, sendo um composto químico derivado da guanidina no qual duas moléculas de guanidina estão ligadas por meio de um átomo de nitrogênio comum. [Grytsai, 2021] Quimicamente, a biguanidina é formada por um pequeno grupo químico que compreende cinco heteroátomos, cinco potenciais sítios aceptores de ligações de H, e pelo menos cinco sítios doadores de ligações de H e oito possíveis formas tautoméricas, sendo duas as mais representativas (Esquema 14). O principal tautômero da biguanidina tem sido debatido há muito tempo e diferentes representações foram descritas.

Historicamente, a estrutura da biguanidina apresentou-se de forma semelhante às dicetonas (Esquema 14a), o que gerou equívocos na tentativa de explicar as propriedades e a reatividade dessa classe de compostos. Uma descrição mais detalhada foi obtida por difração de raio-X mostrando que a biguanidina não possui átomo de hidrogênio na posição 3 [Ernst, 1977], o que foi confirmado posteriormente por estudos de otimização de geometria química quântica (Esquema 14b). [Kathuria, 2018; Grytsai, 2021] De acordo com essas observações, uma representação mais realista da biguanidina incluiria uma deslocalização da densidade de elétrons  $\pi$  ao longo da molécula, juntamente com uma ligação de hidrogênio intramolecular (Esquema 14c). Apesar das evidências, a estrutura mostrada no Esquema 14a permanece comumente utilizada na literatura científica. [Grytsai, 2021]



**Esquema 14**

As biguanidinas são bases relativamente fortes, com  $pK_a$   $1H \approx 11,5$  ( $pK_a$  do ácido conjugado da biguanidina); entretanto, significativamente menos básico que a guanidina ( $pK_a = 13,6$ ). [Kuhlmann, 1996] Estudos cristalográficos de raios X e estudos de modelagem molecular mostraram que a primeira protonação ocorre principalmente no átomo de nitrogênio N4, enfraquecendo substancialmente o caráter intramolecular da interação por interação de H. A segunda protonação ocorre no átomo de nitrogênio N3, causando ruptura de caráter planar e impedindo a interação por interação de H (Esquema 15). [Kathuria, 2018; Grytsai 2021]



**Esquema 15**

### ***O mecanismo de ação da metformina na diabetes mellitus tipo II***

Vários estudos identificaram que a ativação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK) é o principal alvo da metformina. [Eid, 2010; Anwar, 2014; Foretz, 2006; Mroueh, 2019; Geagea, 2019] AMPK é um complexo heterotrimérico de serina/treonina quinase. [Emerling, 2009] Consiste em uma subunidade  $\alpha$  catalítica e subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  reguladoras. A AMPK é descrita como o principal sensor de energia e a chave mestre para a regulação do metabolismo da glicose e lipídios, e é expressa de maneira específica para o tecido. [Eid, 2010; Hardie, 1997; Mitchelhill, 1994; El Massry, 2021] Após seu transporte intracelular através da membrana plasmática, a metformina inibe seletivamente o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial de forma fraca e reversível, resultando em aumento da relação AMP/ATP. [Rena, 2017] Isso, por sua vez, aumenta a fosforilação da AMPK em sua alça de

ativação treonina 172, permitindo que ela exerça seu efeito em grande parte em três níveis diferentes:

1) Reduzindo a produção de glicose hepática, diminuindo a gliconeogênese e a glicogenólise, enquanto aumenta a captação de glicose via translocação de GLUT-1 para os hepatócitos em um mecanismo mediado pelo substrato-2 do receptor de insulina (IRS-2) [Hundal, 2000; Gunton, 2003];

2) Regulação positiva da utilização de glicose por órgãos periféricos, como os músculos esqueléticos. Este processo foi sugerido para compreender um aumento na atividade da tirosina quinase do receptor de insulina, na glicogênese e no número e atividade do transportador GLUT-4; [Cusi, 1998; Johnson, 1993; Klip, 1990; Rossetti, 1990]

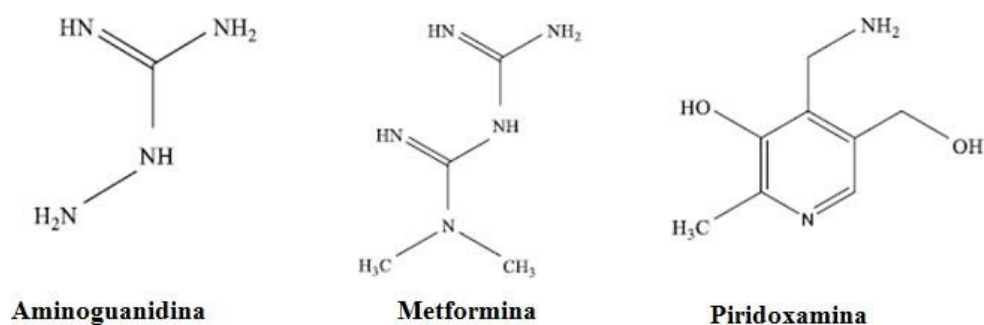
3) Regular o metabolismo lipídico, reduzindo a oxidação dos ácidos graxos enquanto promove a sua reesterificação, o que se acredita melhorar a secreção e a sensibilidade da insulina, minimizando o nível de ácidos graxos livres circulantes. [Massry, 2021]

Na literatura recente temos alguns estudos envolvendo a interação de metformina e ASH em diferentes condições. O mais recente envolve o estudo do comportamento da interação entre albumina sérica humana glicada e não glicada (gASH) e metformina (Met) na presença de nanopartículas de prata (AgNPs), realizado pela combinação de espectroscopia, calorimetria e dinâmica molecular. [Ezazi-Toroghi, 2022] Nesse caso, foi observado que a interação de metformina com ASH glicada e não glicada na presença de 3 diferentes AgNPs (AgI = 1,7; AgII = 6,5 e AgIII = 13,7nm), apresentou a afinidade de interação de metformina para gASH na presença de AgNPs menor que o sistema sem as AgNPs.

O caso do complexo metformina-(gASH-AgII) apresentou uma diminuição na polaridade do microambiente próximo ao Trp214, resultando em aumento da afinidade de interação de metformina e (gASH-AgII) quando comparado a outros sistemas. Esse estudo apontou que diferentes constantes de velocidade de supressão da emissão de fluorescência de gASH na interação com metformina na presença de AgNPs foi indicativo do papel crítico dos tamanhos de AgNPs na formação do complexo gASH-metformina. [Ezazi-Toroghi1, 2022]

Um estudo focando as condições físico-químicas e mecanísticas envolvidas na interação de diferentes compostos (Esquema 16), incluindo metformina, com ASH glicada e não glicada indicam que a interação de fármacos com ASH glicada é fortalecida em

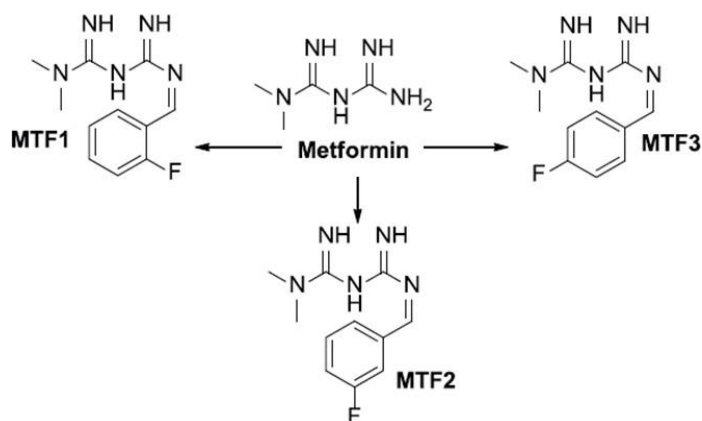
comparação com ASH não glicada ou permanece da mesma ordem. [Ghosh, 2022] Isso implica que a capacidade de interação desses fármacos não é afetada adversamente em condições diabéticas. É ainda inferido que as moléculas de fármaco de cadeia aberta com grupo biguanidina têm capacidades de interação melhoradas para a proteína glicada e, portanto, têm maior importância no campo da diabetes. [Ghosh, 2022]



**Esquema 16**

Em um trabalho utilizando derivados da metforminas fluoradas (Esquema 17) [Chaves, 2018], foi observado que em todos os casos os valores de  $\Delta G^o < 0$  (variando entre -29,3 e -23,9 kJmol<sup>-1</sup>) são decorrentes principalmente das interações hidrofílicas muito fortes, principalmente para os derivados contendo flúor nas posições 1 e 3 (*orto/para*) com valores de  $\Delta H^o < 0$  da ordem de -135,8 e -31,1 kJ/mol, respectivamente, sendo que em ambos os casos a contribuição entrópica é desfavorável com  $\Delta S^o < 0$  com valores de -0,357 e -0,0236 kJ/mol, evidenciando que fortes interações hidrofílicas como ligação de hidrogênio e interações dipolares são preponderantes no processo de interação ligante/ASH. [Ross,1981]

Já o composto derivado da metformina possuindo substituição por átomo de flúor na posição *meta*, que impede qualquer deslocalização eletrônica por mecanismos de ressonância, apresenta valores de  $\Delta H^o = -19.2$  kJ/mol e  $\Delta S^o = +0,0258$  kJ/mol, indicando uma menor contribuição entálpica para o valor de  $\Delta G^o < 0$  entre os três compostos estudados devido às menores interações hidrofílicas, tendo sido também observada uma pequena participação hidrofóbica evidenciada por valor de  $\Delta S^o > 0$ . [Ross, 1981]



**Esquema 17**

A interação entre a metformina e a albumina sérica humana (ASH), bem como a sua forma glicada (gASH), foi investigada por múltiplas técnicas espectroscópicas, potencial zeta e modelagem molecular em condições fisiológicas. [Rahnama, 2015] Os dados de estado estacionário e de fluorescência resolvida no tempo mostraram que o mecanismo de supressão de ASH-metformina e gASH-metformina era estático. As informações de interação, incluindo as constantes de interação, número de sítios de interação e constante de supressão efetiva mostraram que a afinidade de interação da metformina para ASH era maior do que para gASH, o que também foi confirmado por medições de anisotropia. Os espectros de CD de UV demonstraram que o conteúdo  $\alpha$ -helicoidal diminuiu com o aumento da concentração de metformina. [Rahnama, 2015]

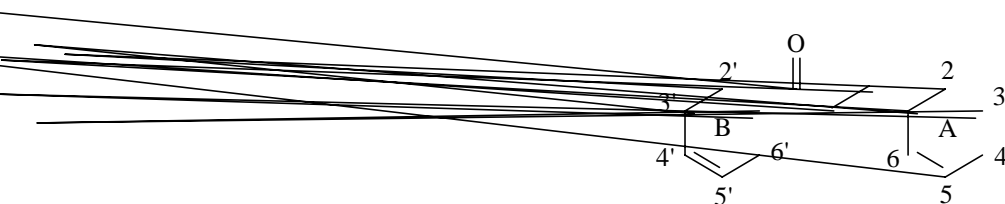
Um estudo envolvendo complexos ternários cobalto(II)-metformina-glicina, histidina e prolina (Complexo 1 a 3) foram estudado por técnicas espectroscópicas de fluorescência e absorção UV-Vis. [Jayasri, 2023] Os resultados mostraram que os complexos exibem capacidade adequada para suprimir a fluorescência de ASH através principalmente de um mecanismo de supressão estático. [Jayasri, 2023]

### 2.5.3 Chalconas

As chalconas (1,3-difenilpropen-3-ona) são produtos naturais encontrados em diversas espécies de plantas, representando um grupo importante de compostos naturais e sintéticos, e atuando como precursores na biossíntese de compostos heterocíclicos com importância biológica, como flavonas, flavanonas, flavonóides, cromanonas, benzodiazepinas, pirazolinas. [Bayach, 2019; Michelini, 2018; Custodio, 2018; Montes-Gozalez, 2019; Khamees, 2018; Lemes, 2018; Maidur, 2017; Makhoulf, 2017]

Além disso, as chalconas são usadas em vários campos de aplicação, tais como filtros de absorção do UV em polímeros, na aplicação direta como filtro solar, em fotografia a cores, em resinas sensíveis à irradiação, como catalisadores para fotopolimerização, padrão cromatográfico para sistemas de eluentes em cromatografia líquida de alta eficiência, em células coletoras de energia solares conversor de frequências de luz para a faixa de cor verde para azul, em diferentes tipos de materiais ópticos, na indústria de alimentos e tecnologias de registro holográfico. [Rachelin, 2018]

Quimicamente, as chalconas (Esquema 18) podem ser definidas como cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas onde tanto a carbonila quanto a porção olefínica estão ligadas a grupamentos aromáticos. Tais interações favorecem a deslocalização dos elétrons  $\pi$  com o grupo carbonílico ( $C=O$ ), resultando em que as chalconas sejam moléculas com um considerável momento de dipolo (2,9 D) em benzeno. [Abegão, 2017]



**Esquema 18**

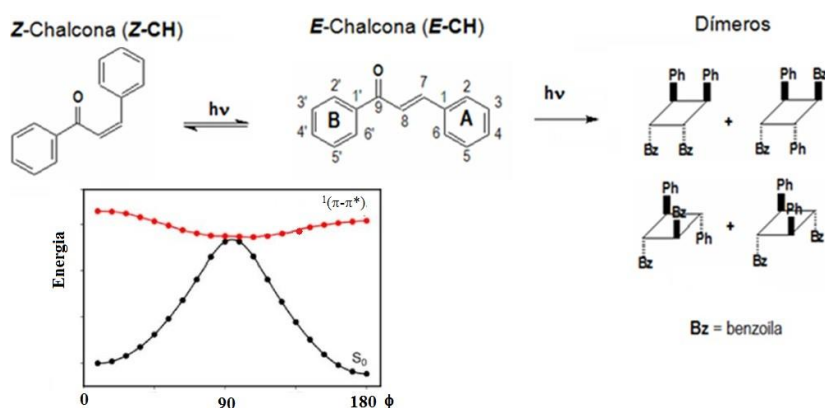
A maioria das chalconas pode ser sintetizada em laboratório com o uso de método de baixo custo a partir da condensação de aldeídos aromáticos com cetonas aromáticas (ou seus análogos substituídos), em presença de base forte, através da reação de Claisen-Schmidt. [Abegão, 2017]

Devido à presença de um grupo cromóforo cetovinílico ( $-CO-CH=CH-$ ), a chalcona e seus análogos possuem interessantes propriedades ópticas e espectrais.

Para a maioria das chalconas, o sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado ( $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-$ ) apresenta a configuração *trans* como sendo mais estável em relação à configuração *cis* devido à presença de um efeito estérico entre o anel cinamoílico (anel B) e o grupo carbonílico nesta última.

A fotofísica e a fotoquímica de  $\alpha,\beta$ -enonas são muito sensíveis à sua estrutura (acíclica ou cíclica), aos substituintes, à polaridade e à viscosidade do solvente e também ao estado de agregação. Substituintes tanto doadores quanto aceptores de elétrons causam uma diminuição na energia do estado excitado singlete  $^1(\pi-\pi^*)$ . [Markhlouf, 2017] O baixo rendimento quântico de fluorescência observado a partir desse estado singlete é devido a uma conversão interna rápida para  $S^0$  ou o estado  $^1(\pi-\pi^*)$  pode ser estabilizado pela rotação ao redor da interação  $\text{C}=\text{C}$  e assim a rotação do ângulo  $\phi$  deste estado pode levar a um mínimo de energia na geometria próxima a  $\phi=90^\circ$ . Próximo ao mínimo  $\phi=90^\circ$  o estado excitado  $^1(\pi-\pi^*)$  pode cruzar com o estado  $S^0$ , levando à isomerização da interação dupla (Esquema 19). [Sashida, 1991] Além do mais, esse modelo proposto por Becker prevê um processo eficiente de fotoisomerização a partir de um estado  $^1(\pi-\pi^*)$  para a excitação acima de 300 nm.

Apesar da excitação fotoquímica em solução resultar na isomerização da interação dupla para chegar ao estado fotoestacionário [Nicodem, 1981], quando no estado sólido esse movimento é dificultado e a velocidade de isomerização torna-se insignificante, favorecendo consequentemente o processo de fotocicloadição intermolecular (Esquema 19).



**Esquema 19**

A substituição por um grupo funcional apropriado em cada um dos dois anéis aromáticos gera um eixo de transferência de carga intramolecular (TCI) devido à presença de conjugação cruzada, através da qual as cargas são transferidas do doador para o grupo aceptor



tanto no estado fundamental como no estado excitado. [Satheeshchandra, 2019; Bayach, 2019]

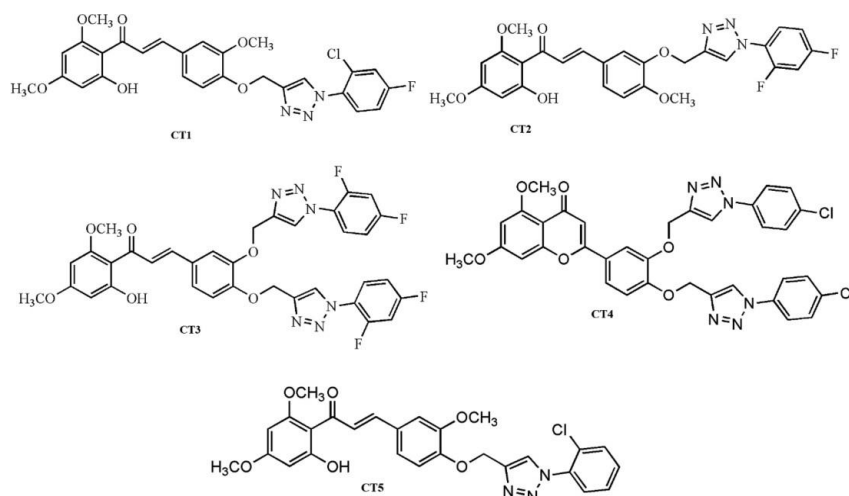
Outro aspecto interessante das chalconas refere-se às suas propriedades incomuns de emissão de fluorescência em condições especiais quando protonadas, em solventes viscosos ou no estado sólido, resultando no processo de fluorescência dupla, bem como apresentando deslocamentos de Stokes extraordinariamente grandes, tornado estes compostos excelentes sondas fluorescentes com elevada sensibilidade ao meio circundante, tais como polaridade, efeitos de ligação de hidrogênio, pH, temperatura e fatores relacionados. [Fayed, 2004]

Uma série de investigações bioquímicas e moleculares revelou que as proteínas (incluindo enzimas) são frequentemente os "alvos" para chalconas terapeuticamente ativas de origem natural e sintética. Os possíveis benefícios fitoterápicos e farmacêuticos das chalconas levaram a uma investigação intensa acerca da sua interação com proteínas, visando fornecer uma base molecular para elucidar o mecanismo de sua ação como fármaco. No entanto, muito pouco se sabe sobre o modo de interação desses compostos com suas respectivas proteínas-alvo em nível molecular. Devido à grande flexibilidade na sua estrutura molecular, chalconas são capazes de se ligar a diferentes receptores e, como consequência, possuem um amplo espectro de atividade biológica. [He, 2005]

Na literatura há alguns poucos estudos envolvendo a interação de ASH com chalconas, nas quais a sua estrutura básica se mantém preservada (sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado). As informações mecanísticas sobre a interação de cinco análogos de chalcona ligados a triazol (CT1-CT5) (Esquema 20) com albumina sérica humana foram obtidas usando várias técnicas espectroscópicas (absorção UV-visível, fluorescência e dicroísmo circular) e docagem molecular. [Yadav, 2019] Os resultados de constante de interação obtidos pela supressão da fluorescência de ASH ( $K_b \sim 10^{6-9} \text{ L.mol}^{-1}$ ) indicam um mecanismo estático.

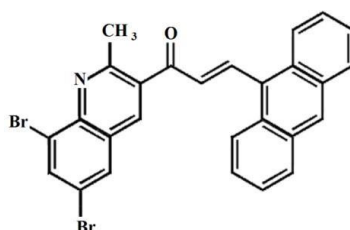
As propriedades termodinâmicas, como as variações negativas de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ \sim -56$  a  $-28 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) e de entalpia ( $\Delta H^\circ \sim -171$  a  $-28 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), revelaram que o processo de interação foi espontâneo e exotérmico, e implicam o envolvimento de interações de ligação de hidrogênio e dipolo-dipolo na formação do complexo CT/ASH. Já os valores negativos para a entropia ( $\Delta S^\circ \sim -0,108$  a  $-0,059 \text{ kJ.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ), exceto para CT2, indicam ausência ou pouca contribuição hidrofóbica para a espontaneidade do processo. Além disso,

os análogos com maior número de porções triazol e átomos de flúor apresentaram maiores valores de constantes de interação ( $K_b$ ) em comparação com outros análogos. [Yadav, 2019]



**Esquema 20**

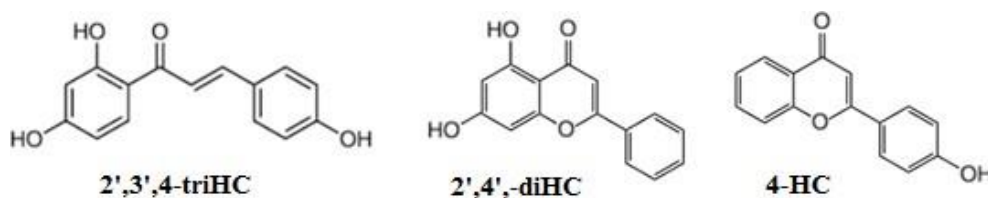
O derivado heterocíclico (*E*)-3-(antracen-10-il)-1-(6,8-dibromo-2-metilquinolin-3-il) prop-2-en-1-ona (ADMQ) foi estudado por técnicas espectroscópicas e modelagem molecular computacional (Esquema 21). [Kumar, 2018] O valor de entalpia positivo ( $\Delta H^\circ = 5,84 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) encontrado para a antracenil chalcona ADMQ, indica que o processo de interação ADMQ/ASH foi endotérmico. O valor de entropia positivo ( $\Delta S^\circ = 0,108 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ) evidencia que o tipo de interação entre a ADMQ/ASH possui caráter hidrofóbico, sendo que os valores de  $\Delta G^\circ$  negativos ( $\Delta G^\circ = -33 \text{ a } -32 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) demonstram a espontaneidade da interação do derivado da chalcona ADMQ/ASH. [Kumar, 2018]



**Esquema 21**

O mecanismo de interação entre três derivados da chalcona, 2',4',4-triidroxiflavona (2',4',4-triHC), 2',4'-diidroxiflavona (2',4'-diHC) e 4-hidroxiflavona (4-HC) (Esquema 22) com a albumina sérica humana (ASH) foi investigado por supressão da fluorescência da proteína, e absorção na região do UV-vis, indicando um processo de supressão estático. As afinidades de interação de três chalconas com ASH em pH=7,4 foram classificadas, segundo a constante de interação, na ordem 2',4',4-triHC > 2',4' -diHC > 4-HC, com constantes de

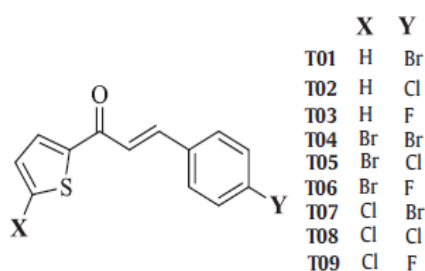
interação na faixa de  $0,28 - 2,39 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}$ , indicando que as três chalconas exibiram afinidades fortes para ASH e que o grupo hidroxila presentes nas chalconas desempenhou um papel fundamental em suas afinidades de interação com ASH. [Ma, 2017]



**Esquema 22**

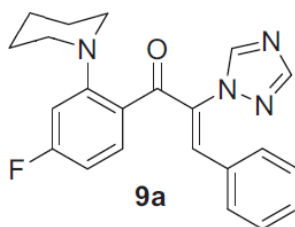
A interação entre derivados de tiofeno-chalconas halogenadas T1–T9 com ASH, foi investigada *in vitro*, sob condições fisiológicas simuladas, por técnicas espectroscópicas (UV-vis, fluorescência e dicroísmo circular), potencial zeta e docagem molecular (Esquema 23). [Chaves, 2017] Os valores para a constante de velocidade de supressão ( $k_q \approx 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) indicam um mecanismo de supressão estático com valores três ordens de grandeza mais alto do que a constante de velocidade de difusão ( $k_{diff} \approx 5,00 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a 298 K) [Brune, 1993] Já as constantes de interação de Stern-Volmer modificadas ( $K_a \approx 10^4 \text{ L. mol}^{-1}$ ), dicroísmo circular e dados de superfície potencial sugerem que a associação ASH-tiofeno chalcona é moderada e não há uma perturbação significativa na estrutura secundária da albumina, bem como em sua superfície.

Os parâmetros termodinâmicos de energia livre de Gibbs negativos ( $\Delta G^\circ \sim -34$  a  $-20 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) indicam uma associação espontânea. Os valores positivos tanto para a entalpia ( $\Delta H^\circ = 158$  a  $11 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) quanto para a entropia ( $\Delta S^\circ = 0,582$  a  $0,031 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) indicam que o processo de interação para a maioria dos derivados da chalcona é regido predominantemente por interações hidrofóbicas. Por outro lado, para o derivado T05, além da associação impulsionada pela entropia ( $\Delta S^\circ = 0,031 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), há também uma contribuição da variação negativa de entalpia ( $\Delta H^\circ = -18,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Os resultados do docagem molecular sugerem interações por ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas como as principais forças de interação para a associação ASH/tiofeno chalconas. [Chaves, 2017]



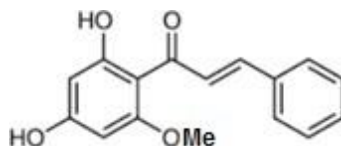
### Esquema 23

Uma série de  $\alpha$ -triazolil chalconas mostrou atividades antibacterianas e antifúngicas eficazes sendo que o composto  $\alpha$ TC9a (Esquema 24) foi o que apresentou os resultados mais promissores, sendo este então submetido a estudo da interação com ASH por técnicas espectroscópicas. [Yin, 2014] Os resultados obtidos demonstraram que o mecanismo de supressão de fluorescência foi estático, enquanto parâmetros termodinâmicos calculados indicaram que o processo de interação foi espontâneo ( $\Delta G^0$  entre  $-25 - 26 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), com  $\Delta H^0 = -13,189$  e  $\Delta S^0 = 0,043 \text{ kJ mol}^{-1}$ , indicando que a espontaneidade do processo é favorecida tanto entálpica como entropicamente. [Yin, 2014]



### Esquema 24

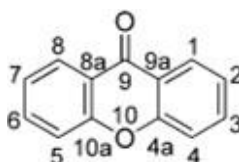
A cardamonina (2'',4''-diidroxí-6''-metoxichalcona), um dos principais constituintes das sementes de *Alpinia katsumadai* Hayata, (Esquema 25) demonstrou atividade antibacteriana, antiinflamatória e outras importantes atividades terapêuticas de potência significativa e baixa toxicidade sistêmica. [He, 2005] A interação da cardamonina com a albumina sérica humana (ASH) foi estudada por métodos espectroscópicos, incluindo espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, dicroísmo circular (CD) e espectroscopia de absorção no UV-vis em combinação com supressão de fluorescência sob condições fisiológicas. Os resultados obtidos para os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H^0 = -25,31 \text{ kJ.mol}^{-1}$  e  $\Delta S^0 = +0,007 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ) sugerem que tanto interações hidrofóbicas como interações hidrofílicas contribuem para a espontaneidade do processo ( $\Delta G^0 = -27 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). [He, 2005]



### Esquema 25

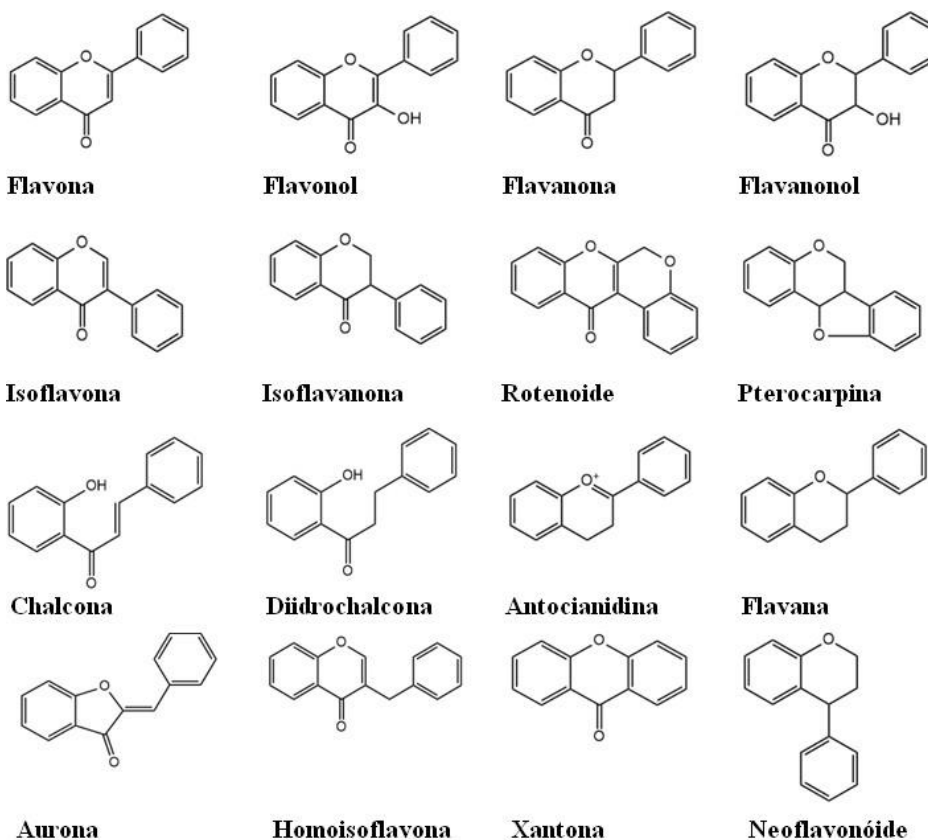
## 2.5.4 Xantonas

As xantonas, do grego "xanthos" para "amarelo", são uma classe de compostos heterocíclicos que contêm uma fração *orto*-pirânica condensada com dois anéis de benzeno descritas pela IUPAC como 9H-xanten-9-ona (Xantona - XT), mostrada no Esquema 26. [Masters, 2012]



**Esquema 26**

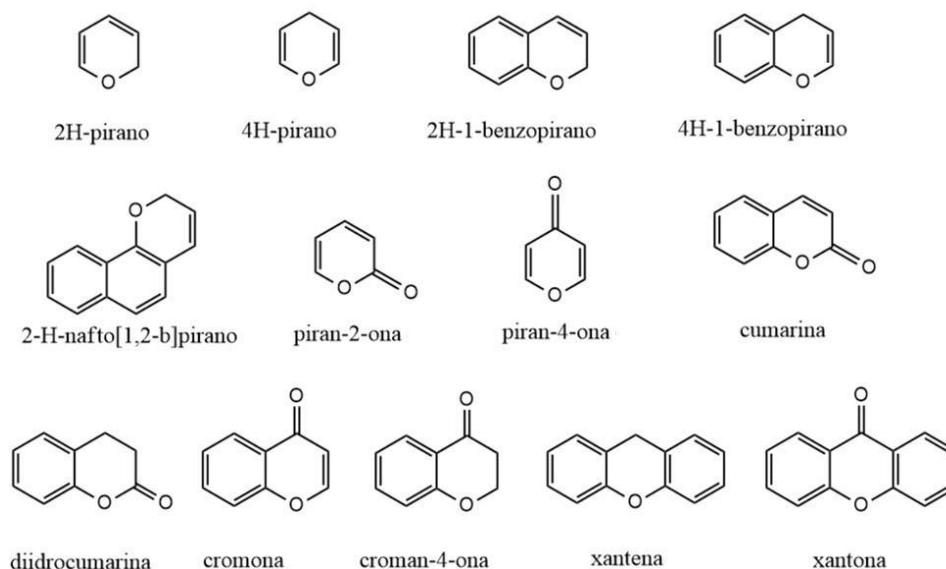
As xantonas também podem ser classificadas como flavonóides e se destacam dos demais compostos desta classe por apresentarem uma estrutura totalmente planar (Esquema 27). [Wang, 2014]



**Esquema 27**

Do ponto de vista do sistema pirânico, as xantonas ainda podem ser englobadas em um vasto conjunto de compostos encontrados amplamente em produtos naturais, tais como

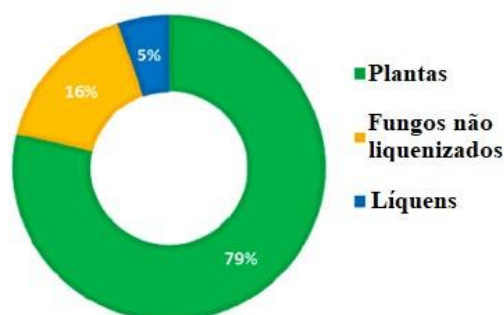
cumarinas, benzopiranos, açúcares etc. (Esquema 28), sendo a porção heterocíclica classificada como blocos de construção predominantes para compostos biologicamente ativos. [Kumar, 1983]



**Esquema 28**

Na natureza, as xantonas são encontradas como metabólitos secundários em plantas da família das *Clusiaceae*, *Gentianaceae*, *Moraceae* e *Polygalaceae* e em muitas espécies de fungos [Bräse, 2009], líquens e bactérias [Masters, 2012], sendo ainda isolados de combustíveis fósseis, o que sugere uma estabilidade considerável da estrutura básica da xantona. [Masters, 2012] Em uma revisão recente, pode ser observada a porcentagem de derivados de xantona segundo a sua fonte natural (Figura 32). [Pogam, 2016]

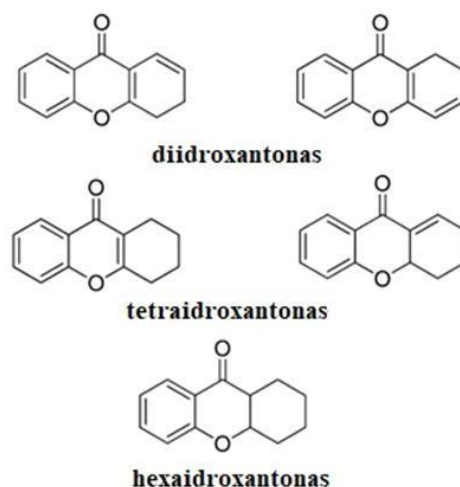
**ORIGENS DE XANTONAS NATURAIS**



**Figura 32.** Distribuição da origem para 1940 xantonas naturais. [Pogam, 2016]

A família das xantonas pode ser dividida nas seguintes categorias, com base nas suas características estruturais: monômeros, dímeros e heterodímeros de xantona e ainda em três

subclasses com base no nível de oxidação de um dos anéis aromáticos xantônicos: diidro, tetraidro e hexaidro-xantona (Esquema 29). [Masters, 2012]



**Esquema 29**

Alguns dos compostos à base de xantona são encontrados em aplicações como corantes, em terapia fotodinâmica e em tecnologias de laser. Como compostos biologicamente ativos, as xantonas apresentam uma ampla gama de atividades biológicas como: anticâncer, antimalárico, antimicrobiano, anti-HIV, anticonvulsivante, anti-colinesterase, antioxidante, anti-inflamatório e como inibidores de várias enzimas: glicosidase, topoisomerase, proteína quinase, aromatase, entre outras, com a atividade variando conforme a estrutura química e a posição dos substituintes no anel aromático. [Shagufta, 2016]

O uso de derivados de xantona na medicina popular remonta a milhares de anos, com plantas da espécie *Swertia*, ricas em compostos xantônicos, bem como diferentes flavonóides, sendo empregadas como fitoterápicos, especialmente em países asiáticos. [Li, 2017] Durante séculos, na prática tradicional da medicina indiana e chinesa, plantas contendo mangiferina (uma xantona glicosilada), obtida principalmente da *mangifera indica*, têm sido empregadas tanto como um componente importante no tratamento de doenças quanto relacionadas a diversos benefícios à saúde [Ehianeta, 2016]. Sabe-se de há algum tempo que a biossíntese do núcleo de xantona monomérico procede de forma diferente em fungos [Li, 2017] e plantas superiores. [Ehianeta, 2016]

Os estudos fotoquímicos de xantonas são fortemente influenciados pela rigidez da sua estrutura, pois qualquer medida cinética realizada experimentalmente que apresenta

dependência com a polaridade do solvente pode ser atribuída inicialmente a processos fotofísicos, e não a mudanças significativas na estrutura do seu estado excitado [Vachev, 1996] Além disso, moléculas planas e rígidas têm maiores constantes de velocidade de cruzamento entre sistemas do que as suas análogas não planas. [Nijegorodov, 1994]

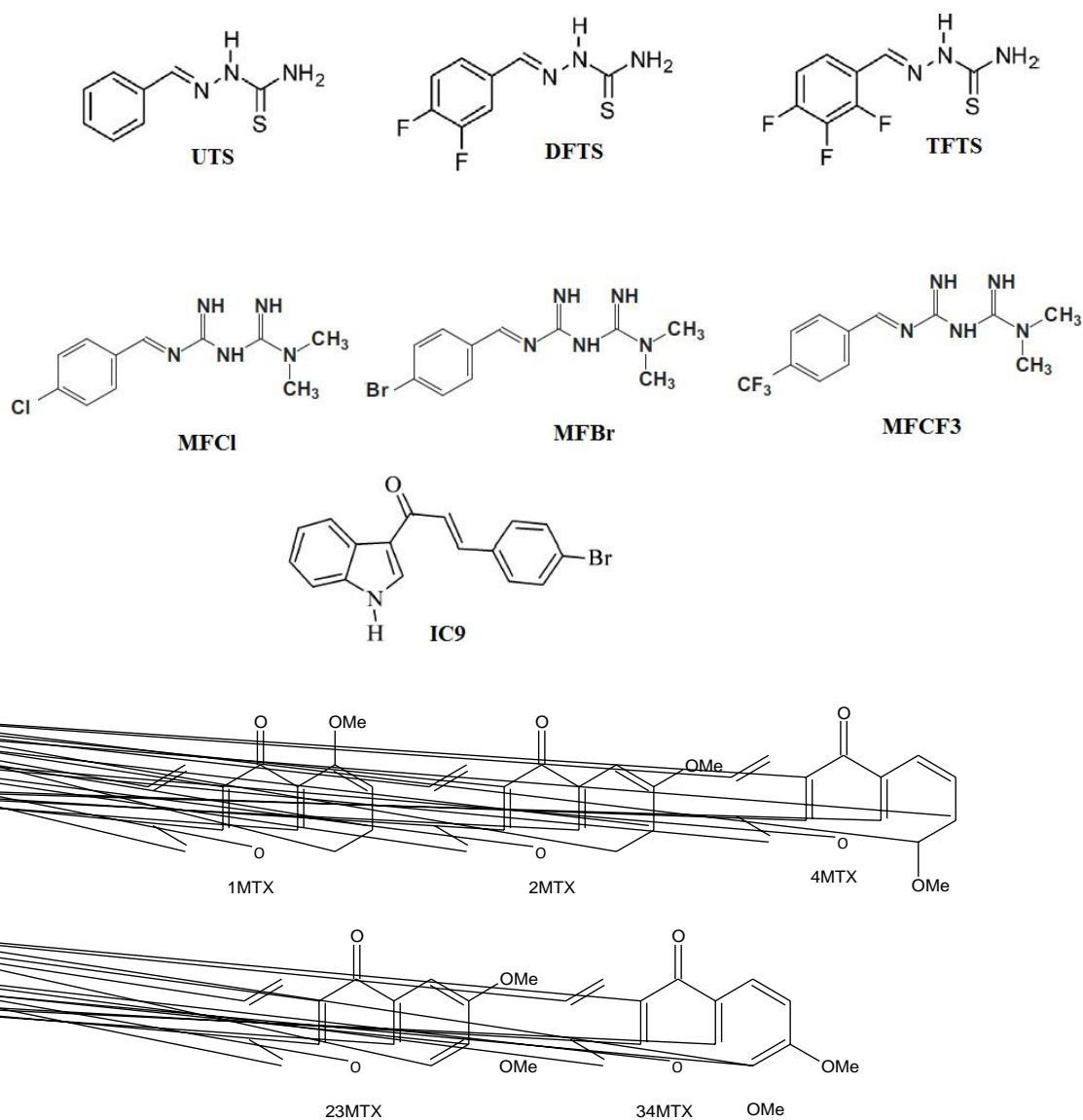
Em muitos casos, compostos carbonilados aromáticos fluorescem em solventes polares e não exibem fluorescência em solventes apolares, indicando que o estado excitado fluorescente singlete tem caráter  $^1\pi\pi^*$  em solventes polares, enquanto em solventes apolares o estado excitado singlete de energia mais baixa tem caráter  $^1n\pi^*$ . Sabe-se que a xantona fotoexcitada apresenta constante de velocidade de cruzamento entre sistemas ( $k_{ces}$ ) muito alta, no domínio do tempo de 1 ps. Consequentemente, o seu rendimento quântico de fluorescência na maioria dos solventes é muito baixo (aproximadamente  $10^{-4}$ ). Surpreendentemente, o rendimento quântico de fluorescência em água é 100 vezes maior que em acetonitrila, mesmo que o cruzamento entre sistemas ( $k_{ces}$ ) ainda seja rápido (aproximadamente 1 ps). [Scaiano, 1980] O rendimento quântico para o cruzamento entre sistemas da xantona é de 0,97 em acetonitrila, a temperatura ambiente. [Scaiano, 1980]

Devido a estas características, ou seja, mudança da configuração do estado excitado como uma função da polaridade do solvente e variação do momento dipolar após o processo de excitação eletrônica, xantona tem sido frequentemente empregada como sensor de polaridade do ambiente micro heterogêneo em complexos supramoleculares formados por micelas, [Mohtat, 1998] ciclodextrinas, [Song, 2001; Okano, 2001] membranas de Nafion, [Weir, 1987] e zeólitas. [Scaiano, 1995, 1997] A reatividade do estado excitado tripleto de xantona ( $\lambda_{Max} = 630$  nm e  $\tau = 1,8$   $\mu$ s, em ACN) [Scaiano, 1980] tem sido exaustivamente estudada. Estudos por fotólise por pulso de laser mostraram que a irradiação de xantona em presença de supressores que têm a capacidade de doar elétron, como aminas, resulta na formação do seu ânion radical, [Kumar, 1983] enquanto em presença de doadores de hidrogênio, tais como álcoois, hidreto de tributil estanho, indol e alguns fenóis, observa-se a formação do radical cetila correspondente. [Santos, 2007]



### 3 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo estudar a interação da albumina sérica humana (ASH) com uma série de compostos bioativos derivados de: tiossemicarbazona (UTS, DFTS e TFTS); metformina (MFC1, MFBr e MFCF3); chalcona (4-bromo-indoilchalcona IC9) e xantona (1MTX, 2MTX, 4MTX, 23MTX e 34MTX) (Esquema 30), através de técnicas espectroscópicas de absorção no UV/Vis, de emissão de fluorescência, dicroísmo circular e modelagem molecular visando obter informações sobre os parâmetros físico-químicos  $K_a$ ,  $K_{sv}$ ,  $k_q$ ,  $K_b$ ,  $n$ , elipticidade- $\alpha$ ,  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  bem como a forma de interação envolvida nos processos de complexação ASH/ligante.



**Esquema 30.**

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Aparelhos**

Os espectros na região do ultravioleta/visível (UV-vis) e os espectros de emissão fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro/polarímetro Jasco modelo J-815 com cela de quartzo de 1 cm de passo óptico equipada com sistema termostatizado Jasco PFD-425S15F com precisão de (0,1°C).

Os experimentos de emissão de fluorescência com resolução temporal foram realizados utilizando-se um espectrofluorímetro Edinburgh Instruments modelo FLS-920, onde foi empregado, para excitação, um laser de diodo pulsado da Edinburgh Instruments ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \pm 10$  nm; pulso de 850 ps; 1,8  $\mu\text{W}$ /pulso).

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

Os experimentos de emissão de fluorescência síncrona (SFS) e fluorescência tridimensional (F3D) foram realizados em um espectrofluorímetro da Edinburgh Instruments modelo Xe-900 com cela de quartzo de 1 cm de passo óptico.

#### **4.1.2 Vidraria**

Todo o material de vidro utilizado nos processos de preparação e na manipulação das amostras foi limpo de acordo com o roteiro abaixo:

A vidraria foi colocada em imersão em uma solução de etanol/água, com 10% de NaOH, durante 24 horas;

- Enxaguada com água corrente;
- Enxaguada com água destilada;
- Enxaguada com etanol P.A.;
- Enxaguada com acetona P.A.;
- Enxaguada com acetona grau espectroscópico;
- Seca em estufa a 150 °C.

#### 4.1.3 Reagentes

As tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS foram sintetizadas pelo grupo liderado pela professora Dra. Áurea Echevarria, do Departamento de Química Orgânica, do Instituto de Química, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro conforme descrito na literatura. Todos os produtos foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, espectrometria de massas e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . [Oliveira, 2008; Paiva, 2014]

As metforminas halogenadas MFCl, MFBr e MFClF<sub>3</sub> e o derivado análogo a chalcona 4-bromo-indolilchalcona IC9 foram sintetizadas conforme descrito na literatura por grupos liderados pelo Dr. Bijo Mathew, da Divisão de Design de Medicamentos e Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal, Departamento de Química Farmacêutica, Ahalia School of Pharmacy, Palakkad, Kerala, Índia. Todos os dados espectroscópicos e espectrométricos do produto estão totalmente de acordo com a estrutura proposta. [Mahmoud, 2016; Sasidharan, 2016]

As metoxixantonas 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT foram sintetizadas conforme descrito na literatura pelo grupo liderado pela Dra. Madalena Pinto, do Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia, da Faculdade de Farmácia, da Universidade do Porto, Portugal. Todos os produtos foram caracterizados por espectroscopias na região do infravermelho, espectrometria de massas e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . [Pedro, 2002]

Metanol, grau espectrofotométrico, foi adquirido à Vetec.

Albumina sérica humana (ASH) foi comprado da Aldrich.

Sachês de PBS, comprados da Aldrich, foram utilizados na preparação de soluções tampão fosfato de pH = 7,4.

Água, grau milli-Q, foi obtida através do aparelho DIRECT-Q, modelo MILLIPORE, que se encontra no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LBBMA-UFRRJ).

## 4.2 Métodos de análise

A interação entre a albumina sérica humana (ASH) e os compostos bioativos foi analisada por técnicas de: espectroscopia na região do ultravioleta/visível (UV-Vis), espectroscopia de emissão de fluorescência e dicroísmo circular (DC) em diferentes temperaturas e por modelagem molecular, onde foram utilizadas as técnicas de docagem molecular (*molecular docking*). Alguns compostos foram ainda analisados por fluorescência sincronizada e fluorescência tridimensional (F3D), fluorescência com resolução temporal e modelagem molecular por mapeamento de potencial eletrostático molecular (*molecular electrostatic potential mapping*).

### 4.2.1 Soluções

Soluções de concentração de  $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L dos derivados dos compostos bioativos em etanol (solução 1);

Solução tampão fosfato (PBS) a pH = 7,4 (1 sachê solubilizado em 1 L de água milli-Q);

Soluções  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L de albumina sérica humana (ASH) em solução tampão fosfato (PBS) a pH = 7,4 (solução 2);

Soluções  $1,00 \times 10^{-6}$  mol/L de albumina sérica humana (ASH) em solução tampão fosfato (PBS) a pH = 7,4 (solução 3).

### 4.2.2 Estudos espectroscópicos na região do ultravioleta/visível

Os espectros de absorção na região do UV-Vis (200 a 450 nm) foram obtidos usando um espectrofotômetro Jasco J-815 para os compostos bioativos em solução tampão de PBS (pH = 7,4), para ASH livre ( $[ASH] = 1,00 \times 10^{-5}$  M, em solução tampão de PBS pH = 7,4) e complexada com os compostos bioativos por titulação (Solução 1), resultando em soluções com concentração crescente de cada ligante segundo as tabelas 9-11 na temperatura de 310 K.

### 4.2.3 Estudos espectroscópicos de emissão de fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência no estado estacionário foram obtidos por titulação espectrofotométrica usando um espectrofluorímetro Jasco J-815 ( $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm, emissão 290 - 450 nm), para ASH livre ( $[\text{ASH}] = 1,00 \times 10^{-5}$  M, em solução tampão fosfato a pH = 7,4) e complexada com os compostos bioativos, resultando em soluções com concentração crescente de cada ligante segundo as tabelas 5-7, nas temperaturas de 296 K, 303 K e 310 K para as tiossemicarbazonas; 305 K, 310 K e 315 K para as metforminas e metoxixantonas e 296 K, 303 K, 310 K e 317 K para 4-bromo-indolilchalcona. O volume das alíquotas dos compostos bioativos ( $[\text{Q}] = 1,00 \times 10^{-3}$  mol/L) adicionadas a solução de ASH ( $[\text{ASH}] = 1,00 \times 10^{-5}$  M) foram ajustadas de modo a obter um valor de supressão inicial de fluorescência ( $F_0 - F$ ) com aproximadamente 10% do valor da fluorescência inicial da ASH ( $F_0$ ). Já para a obtenção das constantes de supressão de Stern-Volmer, as condições utilizadas para as análises foram as seguintes: espectro de emissão de fluorescência (varredura de 337 nm a 343 nm), e comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm), com fendas de emissão a 5,0 nm e de excitação a 10 nm e velocidade de 100 nm/min.

Em todos os casos, para a determinação das constantes de velocidade de supressão  $k_q$ , foi utilizado o valor de  $\tau_0 = 10$  ns para o tempo de vida de ASH na ausência de supressor. [Kandagal, 2006; Zhang, 2008; Cheng, 2009]

### 4.2.4 Correção do efeito filtro interno

Para compensar o efeito do filtro interno, os valores de intensidade de fluorescência das amostras contendo ASH complexadas com os compostos bioativos, foram corrigidos para a absorção das soluções de cada ligante com concentração crescente segundo as tabelas (5-7) nos comprimentos de onda de excitação e emissão usando a equação (1). [Weert, 2010]

$$F_{\text{cor}} = F_{\text{obs}} 10^{\left[ \frac{A_{\text{exc}} + A_{\text{em}}}{2} \right]}$$

**Equação 1**

### 4.2.5 Estudos espectroscópicos de fluorescência resolvida no tempo

Os espectros de decaimento de emissão de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Edinburgh Instruments, modelo FL-920 CD para uma solução de ASH livre ( $[\text{ASH}] = 1,00 \times 10^{-5}$  M, em solução tampão de PBS pH = 7,4) e complexada com os

compostos bioativos por titulação, resultando em soluções com concentração crescente de cada ligante segundo as tabelas 5-7 a temperatura ambiente (a 298 K) e com monitoramento da emissão a (340 nm).

#### **4.2.6 Estudos espectroscópicos de dicroísmo circular**

Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos usando um espectropolarímetro Jasco J-815 para ASH livre ( $[ASH] = 1,00 \times 10^{-6}$  M, em solução tampão de PBS pH = 7,4) e complexada com os compostos bioativos por titulação, resultando em soluções com concentração crescente de cada ligante segundo a tabela (8). As análises foram feitas na faixa de (200–260 nm), com velocidade de (100 nm/min) no espectropolarímetro a temperatura de ( $T = 310$  K). A linha de base foi realizada com uma solução aquosa de PBS (pH = 7,4). Os conteúdos helicoidais de ASH livre e na presença dos ligantes foram calculados a partir dos valores de elipticidade residual molar (MRE) nos comprimentos de onda de 208 e 222 nm. [Chen 1972]

#### **4.2.7 Estudos espectroscópicos de fluorescência sincronizada**

Os espectros de fluorescência síncrona (SFS) foram obtidos em um espectrofluorímetro da Edinburgh Instruments modelo Xe900 para ASH livre ( $1,00 \times 10^{-5}$  M, em solução tampão de PBS pH = 7,4) e associada com os compostos bioativos por titulação, resultando em soluções com concentração crescente de cada ligante segundo as tabelas (5-7). As características de fluorescência síncrona de ASH/compostos bioativos foram anotadas em diferentes intervalos de varredura de  $\Delta\lambda$  ( $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$ ). Quando  $\Delta\lambda = 15$  nm, as características do espectro de resíduos de tirosina de proteína foram observadas e quando  $\Delta\lambda = 60$  nm, as características de espectro de resíduos de proteína triptofano foram observadas à temperatura ambiente (298 K).

#### **4.2.8 Estudos espectroscópicos de emissão de fluorescência tridimensional**

Os espectros de fluorescência tridimensionais (F3D) foram obtidos em um espectrofluorímetro da Edinburgh Instruments modelo Xe-900 para ASH livre ( $1,00 \times 10^{-6}$  M, em solução tampão de PBS pH = 7,4) é complexados com o ligante 4-bromo-indolilchalcona ( $[IC9] = 1.32 \times 10^{-5}$  M) nas seguintes condições: faixa de comprimento de onda de excitação de 200–370 nm e faixa de comprimento de onda de emissão de 210–470 nm e um incremento

de 10 nm. Os outros parâmetros de varredura foram os mesmos dos espectros de supressão de fluorescência e realizada a temperatura de (310K).

#### **4.2.9 Estudos espectroscópicos de competição**

Os experimentos de competição foram realizados usando sondas para diferentes sítios: varfarina, ibuprofeno e digitoxina para os sítios I, II e III, respectivamente [Sudlow, 1976; Zsila, 2013], mantendo a concentração de ASH e das sondas constantes na razão 1:1 ( $[ASH] = [Sonda] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ ). A titulação de supressão de fluorescência foi realizada como descrita no item **4.2.3** de modo a determinar a constante de interação de ASH-compostos bioativos na presença das sondas de sítio a temperatura de 310 K. Para cada dado, a correção do filtro interno foi introduzida como mostrado na equação (1) e os valores de constante de supressão  $K_a$ , na presença de cada marcador de sítio, foram obtidos da equação de Stern-Volmer modificada (Item 4.3.4). [Lakowicz 2006]

**Tabela 5.** Concentração final dos compostos bioativos, após a adição de alíquotas de uma solução estoque de 4-bromo-indolilchalcona (IC9) ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), a 3 mL da solução de ASH ( $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L).

Adição do composto bioativo (de 5 $\mu$ L em 5 $\mu$ L)	Concentração de Q ( $\times 10^{-6}$ M L <sup>-1</sup> )
0 $\mu$ L	0
05 $\mu$ L	1,66
10 $\mu$ L	3,32
15 $\mu$ L	4,97
20 $\mu$ L	6,62
25 $\mu$ L	8,28
30 $\mu$ L	9,96
35 $\mu$ L	11,62
40 $\mu$ L	13,20

**Tabela 6.** Concentração final dos compostos bioativos, após a adição de alíquotas de uma solução estoque das tiossemicarbazonas (UTS, DFTS e T FTS), metforminas (MFCl, MFBr e MF3CF) e dimetoxixantonas (23MXT e 34MXT) ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), a 3 mL da solução de ASH ( $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L).

Adição do composto bioativo (de 10 $\mu$ L em 10 $\mu$ L)	Concentração de Q ( $\times 10^{-6}$ M L <sup>-1</sup> )
0 $\mu$ L	0
10 $\mu$ L	3,32
20 $\mu$ L	6,62
30 $\mu$ L	9,90
40 $\mu$ L	13,20
50 $\mu$ L	16,40
60 $\mu$ L	19,60
70 $\mu$ L	22,80
80 $\mu$ L	26,00



**Tabela 7.** Concentração final dos compostos bioativos, após a adição de alíquotas de uma solução estoque das monometoxixantonas (1MXT, 2MXT e 4MXT) ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), a 3 mL da solução de ASH ( $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L).

Adição do composto bioativo (de 15 µL em 15 µL)	Concentração de Q ( $\times 10^{-6}$ M L <sup>-1</sup> )
0 µL	0
15 µL	4,98
30 µL	9,96
45 µL	14,94
60 µL	19,92
75 µL	24,90
90 µL	29,88
105 µL	34,86
120 µL	39,84

**Tabela 8.** Concentração final dos compostos bioativos, após a adição de alíquotas de uma solução estoque de 4-bromo-indolilchalcona (IC9), tiossemicarbazonas (UTS, DFTS e TFTS), metforminas (MFCl, MFBr e MFClF3) e metoxixantonas (1MXT, 2MXT, 3MXT, 23MXT e 34MXT) ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), a 3 mL da solução de ASH ( $1,00 \times 10^{-6}$  mol/L)

Adição do composto bioativo	Concentração ( $\times 10^{-6}$ M L <sup>-1</sup> )
0 µL (1:0)	0
12 µL (1:4)	3,90
24 µL (1:8)	7,90
48 µL (1:16)	15,70
96 µL (1:32)	31,00

#### 4.2.10. Estudos teóricos de docagem molecular

A estrutura cristalográfica da ASH foi obtida do Protein Data Bank [PDB ID, 1N5U] [Wardell 2002]. Estruturas moleculares dos ligantes, isto é, tiossemicarbazonas (UTS, DFTS e TFTS); metforminas (MFCl, MFBr e MFCF3); 4-bromoindolcahlcona IC9 e metoxixantonas (1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT), foram construídas e minimizadas em energia por cálculos da Teoria Funcional da Densidade (DFT) (potencial B3LYP) com conjunto de bases 6-31G\*, disponível no programa Spartan<sup>®</sup>14 (Wavefunction, Inc.). [Hehre 2003]

Os estudos de docagem molecular foram realizados com o programa GOLD 5.2 (CCDC, Cambridge Crystallographic Data Centre). Átomos de hidrogênio foram adicionados à proteína de acordo com os dados inferidos pelo programa sobre a ionização e estados tautoméricos. [http://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/] O número de operações genéticas (*crossover*, migração, mutação) em cada corrida de docagem usada no procedimento de busca foi definido como 100.000. O programa otimiza as geometrias das interações de hidrogênio girando grupos hidroxila e amino das cadeias laterais de aminoácidos.

A função de pontuação utilizada foi „ChemPLP“, que é a função padrão do programa GOLD 5.2. [http://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/] A pontuação de cada *pose* identificada foi calculada como o negativo da soma de uma série de termos energéticos envolvidos no processo de interação proteína-ligante, de modo que, quanto mais positiva a pontuação, melhor é a interação. As representações gráficas das melhores pontuações foram geradas com o programa PyMOL (DeLano Scienti.c LLC). [DeLano 2002]

A cavidade de interação de docagem na proteína foi estabelecida com um raio de 10 Å do resíduo Trp-214. Esse resíduo de aminoácido foi escolhido para exploração de docagem devido a descobertas experimentais sobre a interação competitiva indicando o Sítio I como o principal local para os compostos bioativos tiossemicarbazona (UTS, DFTS e TFTS); metformina (MFCl, MFBr e MFCF3); 4-bromoindolcahlcona IC9 e (1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT).

#### 4.2.11 Estudos teóricos de cálculo químico quântico

##### *Metformina (MFCl, MFBr e MF3)*

A otimização da geometria, o mapeamento do potencial eletrostático molecular e os cálculos dos orbitais moleculares de fronteira dos três derivados da metformina foram realizados na fase gasosa usando o pacote de software Gaussian 09W com Density Functional Theory (DFT). O conjunto de base usado foi 6-31 G(d') que envolve uma função de polarização, enquanto o B3LYP usado na abordagem DFT contém funcionais híbridos de correlação de troca que podem fornecer parâmetros geométricos razoáveis. [Lee, 1988]

##### *4-bromo-indoilchalcona (IC9)*

A otimização da geometria molecular foi realizada na fase solvente (água) usando a teoria funcional da densidade (DFT) com polarização contida no conjunto de base e funções difusas 6-31+G(d,p), de acordo com o modelo contínuo polarizável do pacote de software Gaussian 09W. [Frisch, 2009] O presente cálculo funciona com a palavra-chave B3PW91, que invoca o método híbrido de três parâmetros de Becke. [Lee, 1988] A análise do potencial eletrostático molecular (MESP) foi concluída com o mesmo nível de teoria usado para otimização. A análise NBO foi concluída usando NBO 3.1 incorporado no pacote Gaussian 09W no nível B3PW91/6-31+G(d,p) para entender várias interações intramoleculares entre os orbitais preenchidos de um subsistema e os orbitais vagos de outro subsistema. [Joy, 2017]

### **4.3 A espectroscopia de absorção, emissão de fluorescência e suas aplicações em experimentos de supressão**

#### **4.3.1 Absorção de luz no ultravioleta-visível (UV-Vis)**

A absorção de luz não-polarizada é descrita pela absorbância (A) e é definida pela equação (2). [Fasman, 1996; Woody, 1995]

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

#### **Equação 2**

Onde:

**A** - absorbância;

**I<sub>0</sub>** - intensidade da luz incidente;

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

Segundo a lei de Lambert-Beer (Equação 3) [Pace, 1995] pode-se determinar o coeficiente de supressão molar, ou coeficiente de absorção molar, ou absortividade molar ( $\epsilon$ ). [Pace, 1995]

$$A = \epsilon.c.l$$

#### **Equação 3**

Onde:

**A** - absorbância;

**c** - concentração da espécie que absorve a luz (em mol/L);

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

$\epsilon$  - coeficiente de supressão molar (em L/cm.mol).

Efeitos de deslocamento na banda de absorção máxima da ASH próximo à região de  $\lambda_{\max} = 280$  nm é referente à transição  $\pi\pi^*$  que está diretamente ligada ao resíduo cromofórico do triptofano, e podem indicar a formação de um complexo de associação (interação ligante) entre os compostos bioativos-proteína. Um deslocamento para menores comprimentos de onda, quando sob complexação, comparado com o espectro de absorção da proteína livre, indica um ambiente químico mais hidrofóbico, enquanto que o oposto, um deslocamento batocrômico está diretamente associado a um ambiente químico próximo ao resíduo do triptofano como sendo mais hidrofílico. [Lakowicz, 2006]

### 4.3.2 Absorção de luz circularmente polarizada (Dicroísmo Circular)

O dicroísmo circular (DC) é uma técnica sensível que possibilita monitorar mudanças conformacionais em proteínas, [Yue, 2008] sendo geralmente usado para a determinação da estrutura secundária de macromoléculas. [Kelly, 2005; Cheng, 2009] O dicroísmo circular é particularmente útil para o estudo de moléculas quirais e macromoléculas, tais como proteínas, carboidratos, dendrímeros etc., compostos esses que possuem unidades opticamente ativas, ou seja, podem exibir sinal na espectroscopia de dicroísmo circular. 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). O DC é a diferença de absorção ( $A$ ) da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita (Equação 4). [Fasman, 1996; Hecht, 1998; Woody, 1995]

$$DC = A_E - A_D.$$

#### Equação 4

Onde:

DC - dicroísmo circular;

$A_E$  - absorbância para a luz circularmente polarizada para a esquerda e

$A_D$  - absorbância para a luz circularmente polarizada para a direita.

Da mesma forma que a absorção de luz não-polarizada é descrita pela absorbância, o mesmo pode ser feito para a luz circularmente polarizada, onde temos um coeficiente de supressão molar para a direita ou para a esquerda,  $\epsilon_D$  e  $\epsilon_E$ , respectivamente.

O dicroísmo circular molar ( $\Delta\epsilon$ ), (Equação 5), é definido como a diferença entre os coeficientes de supressão à esquerda e a direita. [Fasman, 1996; Hecht, 1998; Woody, 1995]

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

#### Equação 5

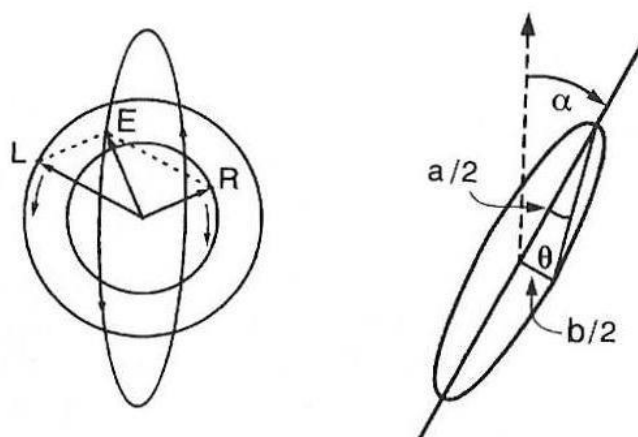
Onde:

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

$\epsilon_E$  - coeficiente de supressão molar para a luz circularmente polarizada para a esquerda (em L/cm.mol) e

$\epsilon_D$  - coeficiente de supressão molar para a luz circularmente polarizada para a direita (em L/cm.mol).

A luz linearmente polarizada é composta de dois componentes circularmente polarizados de mesma intensidade. Em cada uma dessas componentes o vetor eletromagnético gira na direção de propagação. Observando-se perpendicularmente a variação no vetor elétrico com o tempo, para uma amostra que apresente dicroísmo circular, percebe-se que a ponta deste vetor segue uma hélice, rodando no sentido horário para a luz polarizada circularmente para a direita e anti-horário para a esquerda (Figura 33).  
[[www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo\\_circular.pdf](http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf)]



**Figura 33.** Esquema da luz elípticamente polarizada gerada por dicroísmo circular, onde (R) e (L) representam a magnitude dos vetores elétricos da luz circularmente polarizada para a direita e esquerda respectivamente, sendo  $\theta$  o valor medido para a elipticidade como resultado do efeito Cotton observado.

[[www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo\\_circular.pdf](http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf)]

Todos os instrumentos comerciais de DC (Figura 34) medem a variação de absorbância ( $\Delta A$ ) ( $\Delta A = A_E - A_D = (\epsilon_E - \epsilon_D) \cdot c \cdot l$ ). Por razões históricas, entretanto, os aparelhos de DC são calibrados para elipticidade ( $\theta$ ) (Equação 6). [Fasman, 1996; Woody, 1995; [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo\\_circular.pdf](http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf)]

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

#### Equação 6

Onde:

$\theta$  - elipticidade (em deg (graus));  
 $\Delta A$  - variação de absorbância.

Para eliminar os efeitos do caminho óptico e da concentração, a elipticidade ( $\theta$ ) é expressa na forma de elipticidade molar ( $\theta_m$ ), (Equação 7) [Fasman, 1996; Hecht, 1998;

Woody, 1995; [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo\\_circular.pdf](http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf)], que também é representada por *MRE* (elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual). Dessa forma, o dicroísmo circular (DC) gera luz elipticamente polarizada. [[www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo\\_circular.pdf](http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf)]

$$\theta_m = 1000/c.l = 3298\Delta\epsilon$$

### Equação 7

Onde:

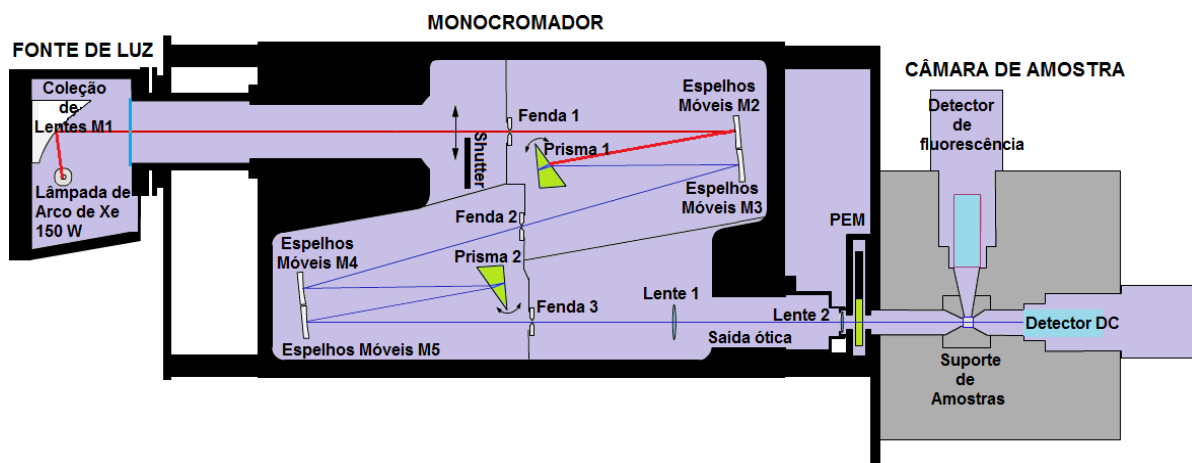
$\theta_m$  - elipticidade molar (em  $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ );

$\theta$  - elipticidade (em deg (graus));

$c$  - concentração da espécie que absorve a luz;

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

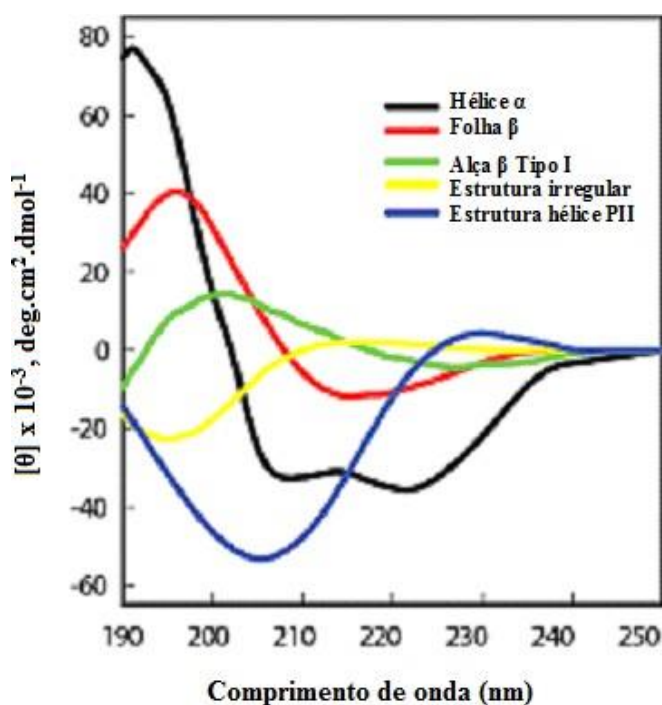
$\Delta\epsilon$  - dicroísmo circular molar (em  $\text{L/cm.mol}$ ).



**Figura 34.** Representação esquemática de um aparelho de dicroísmo circular DC, onde são mostrados os componentes básicos para a sua operação. [modificado de <http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy/5-cd-spectrometer-performance>]

Para avaliar a estrutura secundária de proteínas globulares que apresentam sua conformação preferencial na forma de uma hélice- $\alpha$  são feitas medidas na região do ultravioleta, sendo que valores negativos máximos de elipticidade ( $\theta$ ) em 208 nm e 222 nm indicam a presença de uma estrutura predominantemente na conformação hélice- $\alpha$ , enquanto que bandas negativas a 205 nm e 225 nm sugerem a presença de estrutura em folha- $\beta$  (Figura 35). [Johnson, 1988; Venyaminov, 1996; Cordeiro, 2005]

Existem algumas vantagens na utilização desta técnica, uma vez que são experimentos simples e rápidos; há a recuperação total da amostra (técnica não destrutiva); as análises são feitas em solução e tem-se uma reprodução muito próxima do que é a realidade dos sistemas biológicos *in vivo*. [modificado de [www.chem.uzh.ch/zerbe/CD-Spectroscopy.pdf](http://www.chem.uzh.ch/zerbe/CD-Spectroscopy.pdf)]



**Figura 35.** Espectros de dicroísmo circular representativos de estruturas secundárias de proteínas. [modificado de [www.chem.uzh.ch/zerbe/CD-Spectroscopy.pdf](http://www.chem.uzh.ch/zerbe/CD-Spectroscopy.pdf)]

#### 4.3.2.1 Cálculos da porcentagem de estrutura hélice- $\alpha$

Estimativas acerca da % de hélice- $\alpha$  para a estrutura secundária de ASH na ausência e na presença de supressor podem ser estimadas usando as equações (8) e (9). [Chen, 1972] Os valores experimentais de elipticidade molar ( $\theta_m$ ) nos comprimentos de onda de 208 nm e 222 nm são utilizados para calcular a elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual (*MRE*), especificamente  $MRE_{208}$  e  $MRE_{222}$  (Equação 8). [Chen, 1972] Essas bandas negativas em torno de 208-209 nm e 222-223 nm (na região do ultravioleta) são características da estrutura hélice- $\alpha$  de proteína e correspondem às transições  $n\pi^*$  que ocorrem na sua estrutura secundária (no caso, albumina sérica humana (ASH)). [Chen, 1972] Posteriormente, os valores de  $MRE_{208}$  e  $MRE_{222}$  são substituídos na equação (9) e assim



usados para calcular os valores de percentual de hélice- $\alpha$  na estrutura secundária da ASH (% hélice- $\alpha$ ).

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

#### Equação 8

Onde:

$MRE$  = elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual (deg.cm<sup>2</sup>/dmol);

$\theta$  = elipticidade observada (mdeg);

$n$  = número de aminoácidos residuais ou resíduos de aminoácido (582 para ASH);

$l$  = comprimento óptico da cubeta (1 cm);

$C_p$  = concentração molar de ASH (1,00x10<sup>-6</sup> mol/L).

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

#### Equação 9

Onde:

$MRE_{208}$  - elipticidade residual significativa em 208 nm (deg.cm<sup>2</sup>/dmol);

$MRE_{222}$  - elipticidade residual significativa em 222 nm (deg.cm<sup>2</sup>/dmol);

% hélice- $\alpha$  - percentual de hélice- $\alpha$  na estrutura da ASH

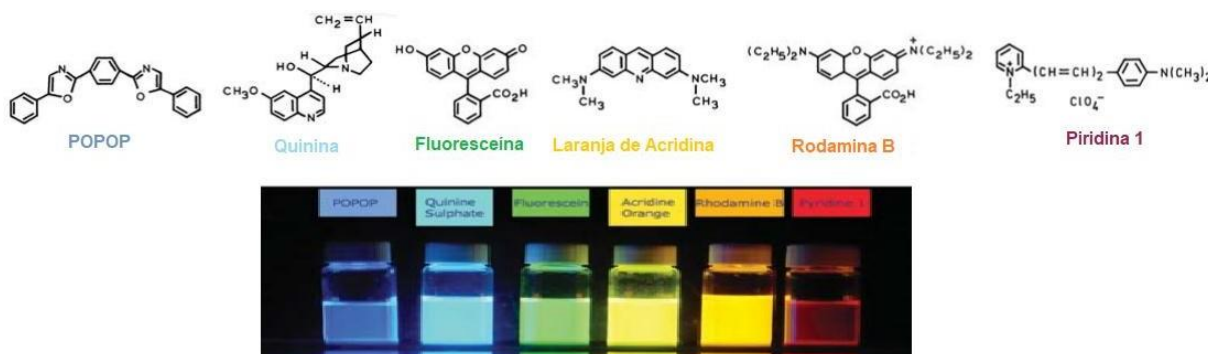
### 4.3.3 A espectroscopia de emissão de fluorescência

A espectroscopia de emissão de fluorescência pode ser aplicada a uma ampla gama de problemas nas ciências químicas e biológicas. As medições podem fornecer informações sobre um grande conjunto de processos moleculares, incluindo as interações de moléculas de solvente com fluoróforos, difusão rotacional de biomoléculas, distâncias entre sítios em biomoléculas, mudanças conformacionais e interações de interação. A luminescência é a emissão de luz de qualquer substância e ocorre a partir de estados eletronicamente excitados. A luminescência é formalmente dividida em duas categorias – fluorescência e fosforescência – dependendo da natureza do estado excitado. [Valeur, 2002; Lakowicz, 2006; Turro, 2008]

A fluorescência ocorre a partir de estados excitados singlete, com o elétron no orbital excitado estando emparelhado (por spin oposto) ao elétron no orbital do estado fundamental. Consequentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido por spin e ocorre

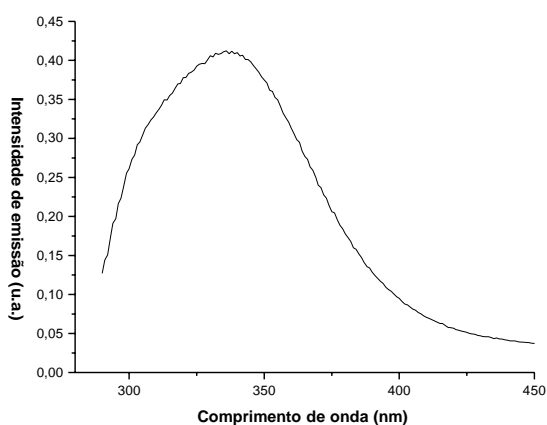
rapidamente pela emissão de um fóton. As constantes de velocidade de emissão de fluorescência são observadas tipicamente no intervalo de  $10^{10}$  a  $10^8 \text{ s}^{-1}$ . [Turro, 2008]

A fluorescência normalmente ocorre a partir de moléculas aromáticas. Algumas substâncias fluorescentes típicas (fluoróforos) são mostradas na Figura 36.



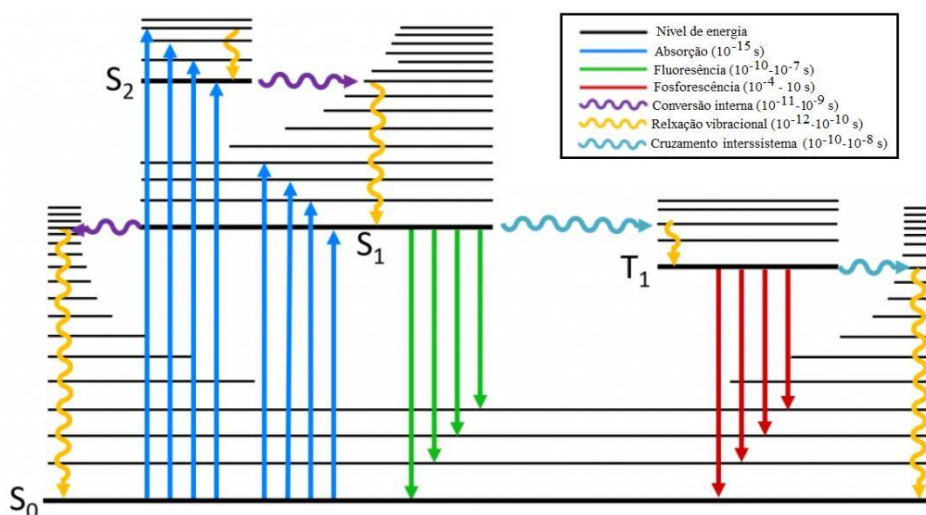
**Figura 36.** Diversos compostos fluorescentes em diferentes regiões do visível do espectro eletromagnético. [modificado de Lakowicz, 2006]

Um espectro de emissão de fluorescência é um gráfico da intensidade de fluorescência versus comprimento de onda (nanômetros) ou número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Figura 37). Para a obtenção deste tipo de espectro é realizado o processo de excitação em um determinado comprimento de onda (na região de absorção do composto fluorescente), sendo analisada a emissão de luminescência em um intervalo de comprimento de onda superior ao comprimento de onda de excitação. Uma característica importante da fluorescência é a alta sensibilidade de detecção que, para a ASH, pode ser observada na faixa de concentração entre  $10^{-5}$  a  $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ . [Lakowicz, 2006]



**Figura 37.** Espectro de fluorescência da albumina sérica humana [ASH]. =  $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  [próprio autor]

Os processos que ocorrem entre a absorção e a emissão da luz são geralmente ilustrados pelo diagrama de Jablonski que podem ser usados em uma variedade de formas para ilustrar os vários processos moleculares que podem ocorrer a partir de estados excitados. (Figura 38).

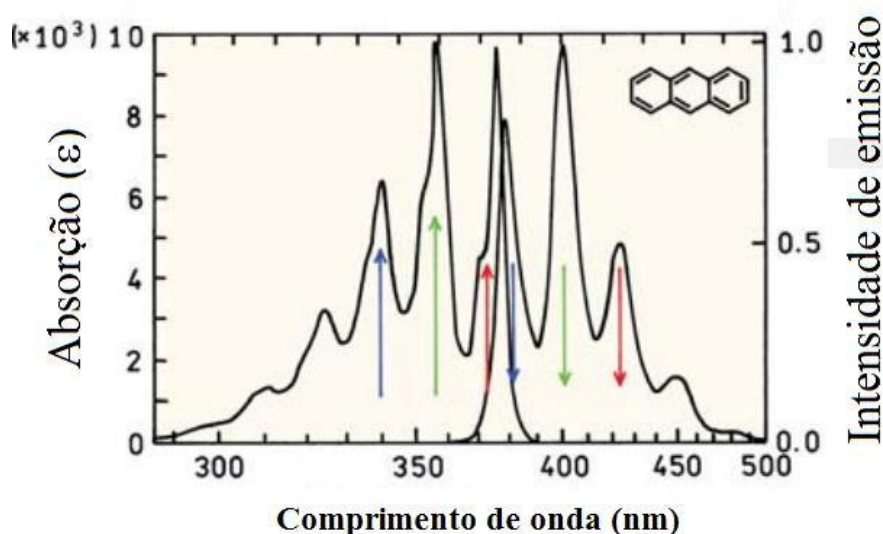


**Figura 38.** Diagrama de Jablonski. [modificado de <https://www.edinst.com/blog/jablonski-diagram-2/>]

No diagrama de Jablonski o singlete de energia mais baixa (estado fundamental) e os estados excitados eletrônicos subsequentes são representados por S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> ... S<sub>n</sub>, respectivamente. Em cada um desses níveis de energia eletrônica, os fluoróforos podem existir em vários níveis de energia vibracional, representados por 0, 1, 2, etc. As transições entre os estados são representadas como linhas verticais para ilustrar a natureza instantânea da absorção de luz. As transições ocorrem em cerca de  $10^{-15}$  s, um tempo muito curto para deslocamentos significativos de núcleos. Este é o princípio de Franck-Condon. [Turro, 2008]

Posteriormente à absorção de luz, vários processos podem ocorrer. Um fluoróforo geralmente é excitado para algum nível vibracional mais alto de S<sub>1</sub> ou S<sub>2</sub>. Com algumas raras exceções, moléculas em fases condensadas relaxam rapidamente para o nível vibracional mais baixo de S<sub>1</sub>. Esse processo é chamado de conversão interna e geralmente ocorre dentro de  $10^{-10}$  a  $10^{-12}$  s ou menos. Como os tempos de vida da fluorescência são tipicamente próximos de  $10^{-10}$  a  $10^{-8}$  s, a conversão interna geralmente é completa antes da emissão. A emissão de fluorescência geralmente resulta de um estado excitado termicamente equilibrado, ou seja, o estado vibracional de menor energia de S<sub>1</sub>. [Turro, 2008]

Outra propriedade geral da fluorescência é que o mesmo espectro de emissão de fluorescência é geralmente observado independentemente do comprimento de onda de excitação. Isso é conhecido como regra de Kasha, embora Vavilov já tivesse relatado em 1926 que os rendimentos quânticos eram geralmente independentes do comprimento de onda de excitação. Ao retornar ao estado  $S_0$ , o fluoróforo pode retornar a qualquer um dos níveis vibracionais do estado fundamental, os quais têm espaçamento semelhante aos do estado  $S_1$  (Figura 39). [Lakowicz, 2006]



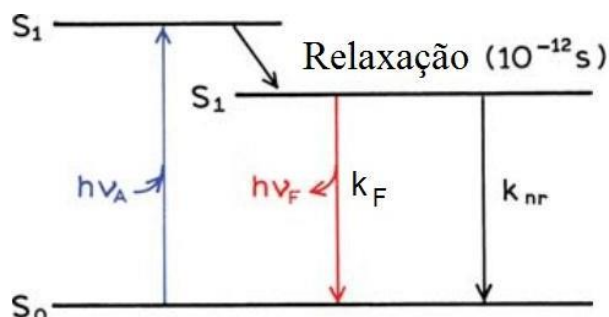
**Figura 39.** Regra da imagem especular e fatores de Franck-Condon. Os espectros de absorção e emissão para antraceno. [modificado de Lakowicz, 2006]

Moléculas no estado  $S_1$  também podem sofrer uma inversão de spin para o estado excitado tripleto, o que é chamado de cruzamento entre sistemas, sendo que, a partir do estado tripleto de menor energia  $T_1$ , pode haver novo de cruzamento entre sistemas para um estado fundamental vibracionalmente excitado ou emitir luz por um processo conhecido como fosforescência. [Turro, 2008]

#### 4.3.3.1 Tempo de vida e rendimento quântico de fluorescência

O tempo de vida da fluorescência e o rendimento quântico são talvez as características mais importantes de um fluoróforo. O rendimento quântico é o número de fótons emitidos em relação ao número de fótons absorvidos. Substâncias com os maiores rendimentos quânticos, aproximando-se da unidade, como rodaminas, exibem as emissões mais intensas. O tempo de vida também é importante, pois determina o tempo disponível para o fluoróforo interagir ou

difundir em seu ambiente. Os significados de rendimento quântico e tempo de vida são melhor representados por um diagrama de Jablonski simplificado (Figura 40). [Lakowicz, 2006]



**Figura 40.** Diagrama de Jablonski simplificado para ilustrar o significado de rendimentos quânticos e tempos de vida. [modificado de Lakowicz, 2006]

Em particular, estamos interessados nas constantes de velocidade de emissão do fluoróforo ( $k_F$ ) e do decaimento não radiativo para  $S_0$  ( $k_{nr}$ ). Ambas as constantes de velocidade,  $k_F$  e  $k_{nr}$ , despopulam o estado excitado e, sendo assim, a fração de fluoróforos que decai por emissão e, portanto, define o rendimento quântico, é dada pela equação (10). [Lakowicz, 2006]

$$Q = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}}$$

#### Equação 10

O rendimento quântico pode estar próximo da unidade se a constante de velocidade de decaimento não radiativo for muito menor que a constante de velocidade de decaimento radiativo, ou seja,  $k_{nr} < k_F$ . É importante salientar que o rendimento quântico para a emissão de fluorescência é sempre menor que a unidade devido a processos não radiativos tais como conversão interna (IC). Por conveniência, agrupamos todos os processos de decaimento não radiativos possíveis com uma única constante  $k_{nr}$ . [Lakowicz, 2006]

O tempo de vida do estado excitado é definido pelo tempo médio que a molécula passa no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. Geralmente, os tempos de vida de fluorescência são próximos de 10 ns. Para o fluoróforo ilustrado na Figura 39, o tempo de vida é obtido pela equação (11):

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{nr}}$$

### **Equação 11**

A emissão de fluorescência é um processo aleatório, e poucas moléculas emitem seus fótons precisamente em  $t = \tau$ . O tempo de vida é um valor médio do tempo gasto no estado excitado. [Lakowicz, 2006]

O tempo de vida do fluoróforo na ausência de processos não radiativos é chamado de tempo de vida intrínseco ou natural e é obtido pela equação (12),

$$\tau_n = \frac{1}{k_F}$$

### **Equação 12**

Em princípio, o tempo de vida natural  $\tau_n$  pode ser calculado a partir dos espectros de absorção, coeficiente de supressão e espectros de emissão do fluoróforo. A constante de velocidade de decaimento radiativo  $k_F$  pode ser calculada usando a equação (13):

$$k_F \simeq 2.88 \times 10^9 n^2 \frac{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu} / \bar{\nu}^3} \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu})}{\bar{\nu}} d\bar{\nu} = 2.88 \times 10^9 n^2 \langle \bar{\nu}^{-3} \rangle^{-1} \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu})}{\bar{\nu}} d\bar{\nu}$$

### **Equação 13**

Onde  $F(\nu)$  é o espectro de emissão plotado na escala do número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ),  $\varepsilon(\nu)$  é o espectro de absorção e  $n$  é o índice de refração do meio.

O tempo de vida natural pode ser calculado a partir do tempo de vida medido ( $\tau$ ) e do rendimento quântico de fluorescência ( $Q$ ) pela equação (14). [Lakowicz, 2006]

$$\tau_n = \tau / Q$$

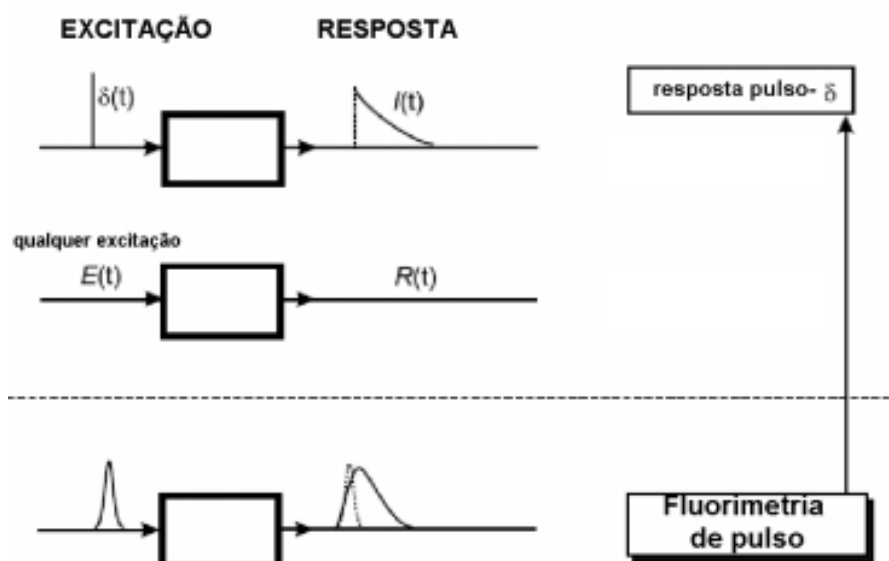
### **Equação 14**

Muitos fluoróforos bioquímicos não se comportam de forma tão previsível quanto os compostos aromáticos. Portanto, muitas vezes há pouca concordância entre o valor de  $\tau_n$  calculado a partir da equação (14) e aquela calculada a partir de seus espectros de absorção e

emissão (Equação 12). Essas discrepâncias ocorrem por uma variedade de razões, como uma fração dos fluoróforos localizados próximos a grupos supressores, o que às vezes ocorre para resíduos de triptofano em proteínas. O rendimento quântico e o tempo de vida de fluorescência podem ser modificados por fatores que afetam qualquer uma das constantes de velocidade ( $k_F$  ou  $k_{nr}$ ). Por exemplo, uma molécula pode ser não fluorescente como resultado de uma grande constante de velocidade de conversão interna ou uma baixa constante de velocidade de emissão. [Lakowicz, 2006]

#### 4.3.3.2 Fluorescência resolvida no tempo

Fluorimetria pulsada, técnica de fluorescência resolvida no tempo utilizada nesta tese, trabalha no domínio de tempo. A amostra é excitada por um pulso de luz curto (um LED ou um laser pulsado com comprimento de onda no máximo de absorção do fluoróforo) e a resposta da fluorescência é apresentada em função do tempo (Figura 41). [Valeur, 2002]



**Figura 41.** Princípios de fluorimetria resolvida no tempo. [modificado de Valeur, 2002]

Supondo, em um exemplo, que uma amostra contendo um fluoróforo seja excitada com um pulso de luz infinitamente curto, resultando na excitação de uma população inicial  $N_0$  de fluoróforos para o primeiro estado excitado singlete, o decaimento para o estado fundamental ocorre com uma constante de velocidade  $k_r + k_{nr}$  (Equação 15). [Valeur, 2002]

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_r + k_{nr}) \cdot N(t)$$

**Equação 15**

Onde:  $N(t)$  - número de moléculas excitadas no tempo  $t$ ,

$k_r$  - constante de velocidade radiativa (fluorescência ou fosforescência) e

$k_{nr}$  - constante de velocidade de decaimento não radiativo.

A emissão é um evento aleatório, onde cada fluoróforo possui igual probabilidade de emissão num dado intervalo de tempo. Ao integrar a equação 15, tem-se um decaimento exponencial da população excitada (Equação 16). [Valeur, 2002]

$$N = N_0 \cdot \exp(-t/\tau)$$

#### Equação 16

Como a intensidade radiativa ( $I$ ) é proporcional a  $N(t)$  pode ser expresso como:

$$I = \alpha \cdot \exp(-t/\tau)$$

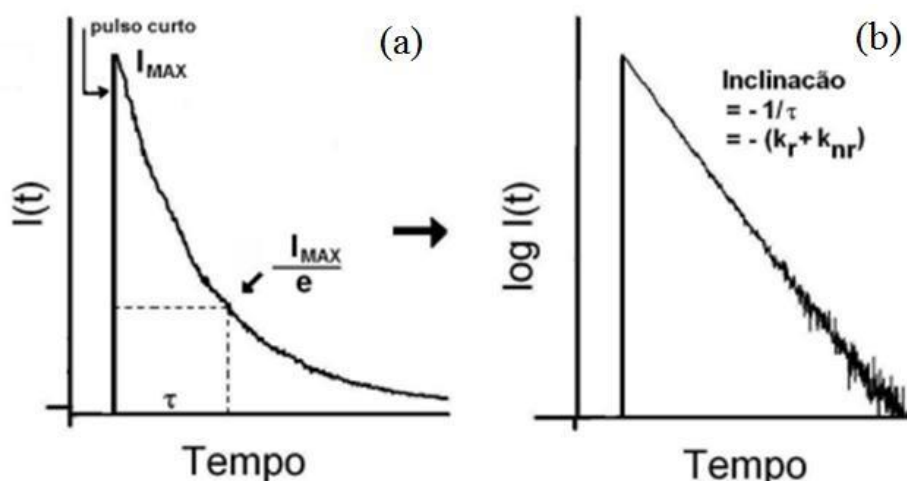
#### Equação 17

onde  $\tau$  é o tempo de vida e  $\alpha$  a intensidade no tempo zero, com  $\tau$  sendo mostrado na equação 18.

$$\tau = -\log I(t)/t$$

#### Equação 18

O tempo de vida de fluorescência, em geral, é relacionado com o tempo requerido para a intensidade decair 63.21% ( $1/e$ ) de seu valor inicial. O tempo de vida é determinado através do coeficiente angular do gráfico  $\log I(t)$  versus  $t$  (Figura 42). [Valeur, 2002]



**Figura 42.** Curva de decaimento de fluorescência: (a) segundo a equação 17; (b) segundo a equação 18. [modificado de Valeur, 2002]



#### 4.3.4 Os mecanismos de supressão de fluorescência

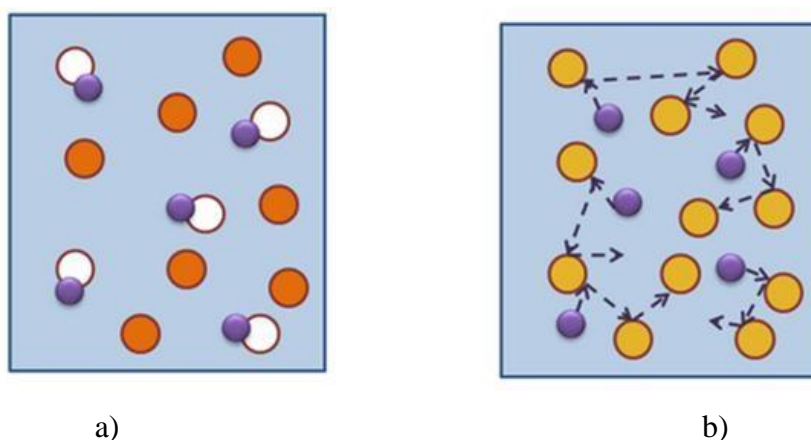
A intensidade da fluorescência pode ser diminuída por uma ampla variedade de processos. Essa diminuição de intensidade é chamada de supressão e pode ocorrer por diferentes mecanismos que podem incluir reações de estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, transferência de elétron, entre outras. Na maioria dos casos, a supressão ocorre pela formação de complexos supressor/fluoróforo no estado fundamental chamado de *Supressão Estática* (Figura 43a) ou por processos colisionais que ocorrem pelo encontro do supressor e o fluoróforo no estado excitado, o que é denominado de *Supressão Dinâmica* (Figura 43b)

A supressão estática refere-se a qualquer mecanismo que inibe a formação do estado excitado do fluoróforo [Braslavsky 2007] e, assim, extingue completamente sua fluorescência original. Como resultado, qualquer fluorescência medida é devida apenas aos fluoróforos que não estão interagindo com o supressor e, portanto, seu tempo de vida de decaimento não é afetado; a fluorescência total no estado estacionário é obviamente reduzida, uma vez que os complexos fluoróforo/supressor não são fluorescentes. Em muitos casos, esses chamados complexos de estado fundamental podem levar a alterações no espectro de absorção do fluoróforo. [Xiang, 2010; Xu, 2008; Zhang, 2009]

A supressão dinâmica refere-se a qualquer processo não radiativo no qual o supressor interage com o estado excitado do fluoróforo [Braslavsky, 2007] e, portanto, resulta em uma mudança tanto na intensidade da fluorescência no estado estacionário quanto no tempo de vida da fluorescência. [Weert, 2011] A supressão dinâmica pode ainda englobar outras formas de supressão, como os processos de transferência de energia por ressonância de Förster (FRET), que ocorre por um mecanismo doador para um aceptor através do acoplamento dipolo-dipolo não radiativo.

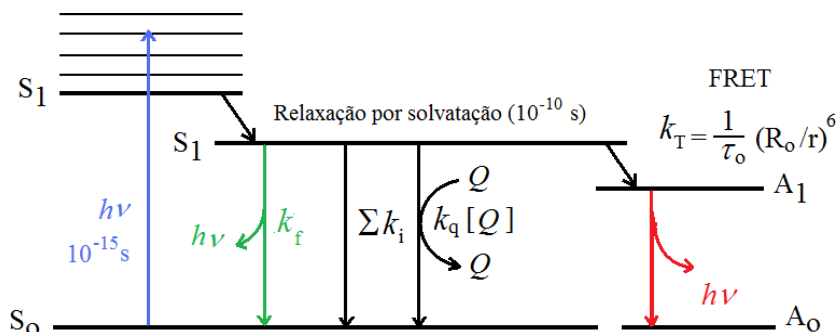
De acordo com essas definições, a supressão estática pode ser distinguida da dinâmica pela medida dos tempos de vida de fluorescência. Somente se o tempo de vida diminuir, a supressão dinâmica estará presente. [Weert, 2011] Além dos processos descritos acima, a supressão aparente pode ocorrer devido às propriedades ópticas da amostra. Altas densidades ópticas ou turbidez podem resultar na redução da intensidade de fluorescência. Também pode ocorrer supressão como resultado de mudanças estruturais em torno do (s) fluoróforo (s). Isso significa que quaisquer alterações estruturais podem levar a variações no ambiente do

fluoróforo, o que, por sua vez, pode alterar a fluorescência, sendo possível se observar tanto um aumento como uma diminuição da fluorescência. [Weert, 2011]

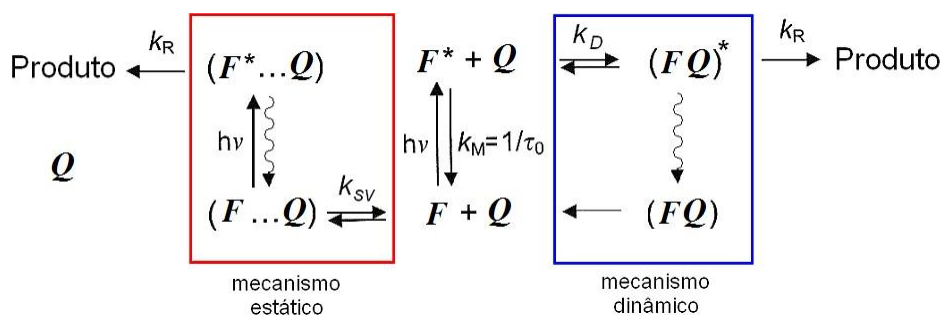


**Figura 43.** Mecanismos de supressão de fluorescência: a) mecanismo estático e b) mecanismo dinâmico. [modificado de Lakowicz, 2006]

Tanto o processo de supressão colisional como o estático podem ser ilustrados no diagrama de Jablonski modificado (Figura 44), juntamente com as respectivas equações cinéticas (Esquema 31).



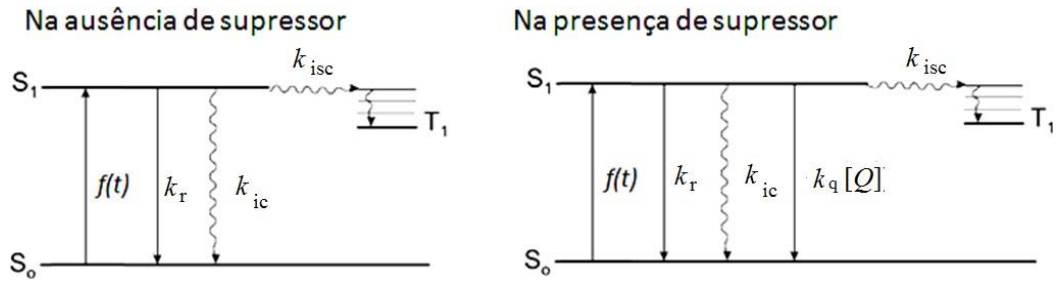
**Figura 44.** Diagrama de Jablonski (energia) para o processo de desativação do estado excitado de uma molécula por diferentes mecanismos. [modificado de Lakowicz, 2006]



**Esquema 31** [modificado de Lakowicz, 2006]

#### 4.3.4.1 O processo de supressão – A Equação de Stern Volmer

I) **Na supressão dinâmica**, o fluoróforo retorna ao estado fundamental durante um encontro difusivo com o supressor. As moléculas não são quimicamente alteradas no processo. Para a definição da equação de Stern Volmer podemos resolvê-la para um experimento realizado no estado estacionário onde  $d[F^*]/dt = 0$  (iluminação constante) na presença e na ausência do supressor (Esquema 32). [Valeur, 2002]



Esquema 32 [modificado de Valeur, 2002]

a) **Definição da equação de Stern-Volmer para um processo sob iluminação constante (estado estacionário).**

$$\frac{d[F]}{dt} = f(t) - k_M [F]_O = 0$$

Equação 19

$$\frac{d[F]}{dt} = f(t) - (k_M + k_q [Q])[F] = 0$$

Equação 20

$$k_M = k_r + k_{ic} + k_{isc} = k_r + k_{nr} = 1/\tau_o$$

$$\frac{F_o}{F} = k_M + \frac{k_q [Q]}{k_M} = 1 + k_q \tau_o [Q]$$

Equação 21

$F_o$  fluorescência na ausência de supressor  $Q$

$F$  fluorescência na presença do supressor  $Q$

$k_M$  cte de desativação intrínseca

$f(t)$  é uma função da cte de excitação

$k_r$  cte de velocidade radiativa

$k_{ic}^S$  cte de velocidade de conversão interna

$k_{isc}$  cte de velocidade de cruzamento intersistema

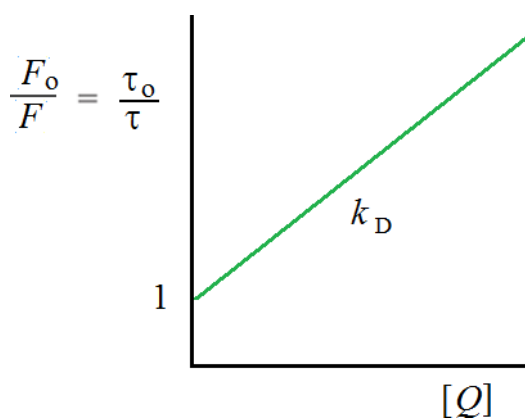
$k_{nr}$  cte de velocidade não radiativa

Para a supressão dinâmica, a diminuição da intensidade é descrita pela equação de Stern-Volmer (Equação 21).

$$\frac{F_o}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q \tau_o [Q]$$

Equação 21

Nesta expressão,  $K_{SV}$  é a constante de supressão de Stern-Volmer,  $k_q$  é a constante de velocidade de supressão bimolecular,  $\tau_0$  é o tempo de vida da espécie não suprimida (natural) e  $[Q]$  é a concentração do supressor. A inclinação de um gráfico de  $F_0/F$  versus  $[Q]$  fornece então o valor de  $K_{SV}$  (Figura 45). Como  $K_{SV}=k_q\tau_0$ , conhecendo-se  $\tau_0$  pode-se então determinar a constante de velocidade de supressão de fluorescência ( $k_q$ ). A constante de supressão de Stern-Volmer  $K_{SV}$  indica a sensibilidade do fluoróforo a um supressor. Um fluoróforo interno em uma macromolécula é geralmente inacessível aos supressores solúveis em água, de modo que o valor de  $K_{SV}$  é baixo. Valores maiores de  $K_{SV}$  são encontrados se o fluoróforo estiver livre em solução ou na superfície de uma biomolécula.

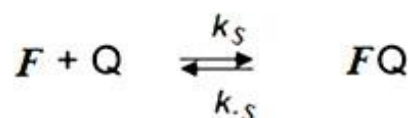


**Figura 45.** Gráfico de Stern-Volmer para o processo de supressão dinâmico. [modificado de Lakowicz, 2006]

Uma grande variedade de moléculas pode atuar como um supressor colisional. Exemplos incluem oxigênio, halogênios, aminas e moléculas deficientes em elétrons como a acrilamida. O mecanismo de supressão varia com o par fluoróforo/supressor. Por exemplo, a supressão do indol pela acrilamida é provavelmente devido à transferência de elétron do indol para a acrilamida. A supressão por halogênio e átomos pesados ocorre devido ao acoplamento spin-órbita, o qual resulta em um aumento do cruzamento entre sistemas para o estado excitado tripleto. [Valeur, 2002; Lakowicz, 2006]

**II) A supressão estática** ocorre pela formação no estado fundamental de complexos não fluorescentes do fluoróforo com supressores (Esquema 33). Quando este complexo absorve luz, ele retorna imediatamente ao estado fundamental sem emissão de fóton. No caso da supressão estática, a dependência da intensidade de fluorescência em relação à concentração

do supressor é facilmente obtida pela consideração de uma constante de associação para a formação de complexo (Equação 22). [Valeur, 2002, Lakowicz, 2006]



**Esquema 33**

$$K_s = \frac{[F - Q]}{[F][Q]}$$

**Equação 22**

onde  $[F - Q]$  é a concentração do complexo,  $[F]$  é a concentração de fluoróforo não complexado e  $[Q]$  é a concentração de supressor. Se a espécie complexada não é fluorescente, então a fração da fluorescência que permanece ( $F/F_0$ ) é dada pela fração total de fluoróforos que não são complexados:  $f = F/F_0$ . Lembrando que a concentração total de fluoróforo  $[F_0]$  é dada pela equação (23):

$$[F]_0 = [F] + [F - Q]$$

**Equação 23**

substituição na equação (22) obtemos:

$$K_s = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F_0]}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]}$$

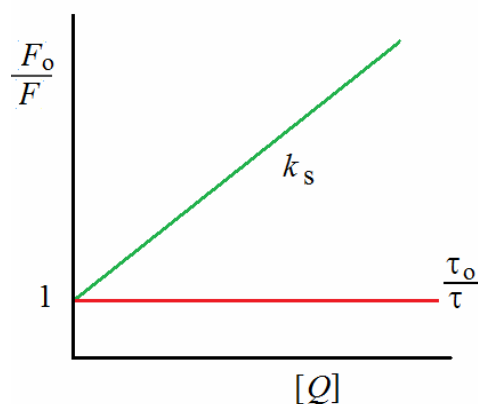
**Equação 24**

Pode-se então substituir a concentração de fluoróforo por intensidades de fluorescência e, pelo rearranjo da equação (24), obtém-se novamente a equação (21), já descrita como a equação de Stern-Volmer.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_s [Q] = 1 + k_q \tau_o [Q]$$

**Equação 21**

Observe que a dependência de  $F_0/F$  em  $[Q]$  é linear (Equação 21), o que é idêntico ao observado para a supressão dinâmica (Figura 46). [Valeur, 2002; Lakowicz, 2006]

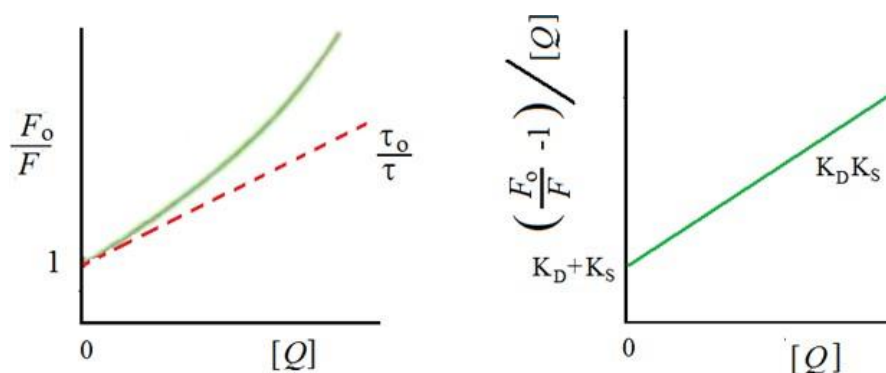


**Figura 46.** Gráfico de Stern-Volmer para o processo de supressão estático. [modificado de Lakowicz, 2006]

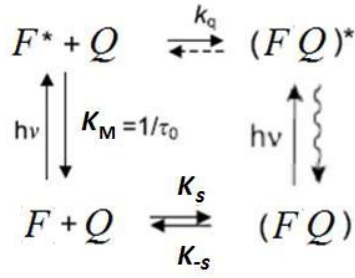
Tanto a supressão estática quanto a dinâmica requerem contato molecular entre o fluoróforo e o supressor (Esquema 31).

Do ponto de vista prático, vários processos podem interferir na linearidade dos resultados obtidos nos experimentos descritos anteriormente e entre eles podemos destacar:

**III) Um mecanismo combinado estático/dinâmico** - que quando operando em conjunto leva ao desvio da linearidade em direção ao eixo y (Figura 47) sendo este então melhor descrito pela seguinte equação química (Esquema 34):



**Figura 47.** Gráfico de Stern-Volmer para o processo de supressão estático/dinâmico para a mesma população de fluoróforo. [modificado de Lakowicz, 2006]



**Esquema 34**

Neste caso a equação de Stern Volmer (Equação 21) pode ser assim descrita:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{app}[Q]$$

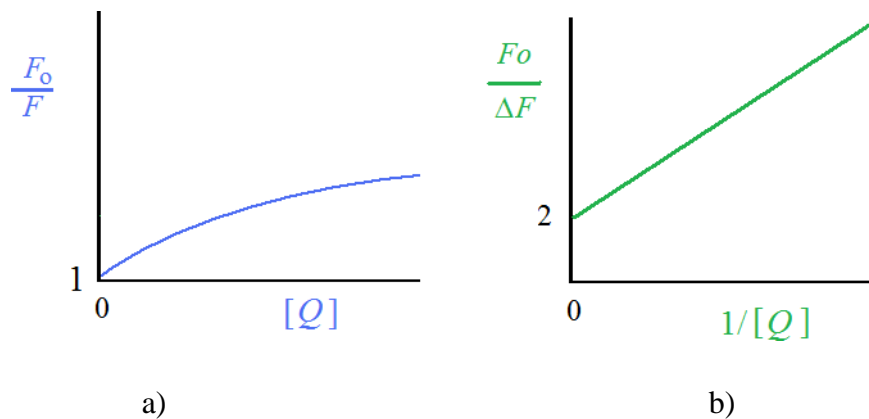
**Equação 25**

Onde  $K_{app}$ :

$$K_{app} = \left[ \frac{F_0}{F} - 1 \right] \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q]$$

**Equação 26**

**IV) Suponha existirem duas populações de fluoróforos, uma das quais é acessível (a) para o supressor e a outra sendo inacessível ou blindada (b).** Quando isso ocorre é observado o desvio da linearidade no gráfico de Stern-Volmer que se desloca em direção ao eixo X (Figura 48a) sendo que uma nova relação linear pode ser obtida (Figura 48b):



**Figura 48.** Gráfico de **a)** Stern-Volmer e **b)** Stern-Volmer modificado para a supressão de um sistema contendo mais de um fluoróforo, sendo um deles inacessível ao supressor. [modificado de Lakowicz, 2006]

Neste caso, a equação de Stern-Volmer (Equação 21) pode ser reescrita como equação de Stern-Volmer Modificada (Figura 48b) e deve englobar mais de um fluoróforo (Equação 27):

$$F_0 = F_{0a} + F_{0b}$$

**Equação 27**

Substituindo na equação 21 temos:

$$F = \frac{F_{0a}}{1 + K_a[Q]} + F_{0b}$$

**Equação 28**

Reescrevendo a equação 28 temos:

$$\Delta F = F_0 - F = F_{0a} \left( \frac{K_a[Q]}{1 + K_a[Q]} \right)$$

**Equação 29**

A qual assume a forma final definida como equação de Stern-Volmer modificada (Equação 29)

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a[Q]} + \frac{1}{f_a}$$

**Equação 30**

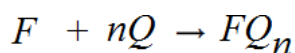
Onde  $f_a$  é definido dos fluoróforos acessíveis (Equação 31)

$$f_a = \frac{F_{0a}}{F_{0b} + F_{0a}}$$

**Equação 31**



**IV) Para um sistema contendo mais de um fluoróforo, todos igualmente acessíveis** – Para este caso em particular, onde o supressor pode atuar em um sistema contendo mais de um fluoróforo (Esquema 35), com ambos tendo a mesma capacidade de formação de uma interação com a molécula do supressor, não é observado nenhum desvio da linearidade dos resultados nos estudos de supressão (Figura 49). No entanto, os resultados obtidos segundo a nova equação de Stern-Volmer Duplo Log têm a capacidade de indicar a constante de interação  $K_b$  e o número de sítios de interação  $n$  (Equação 32). [Valeur, 2002; Lakowicz, 2006]



**Esquema 35**

onde:

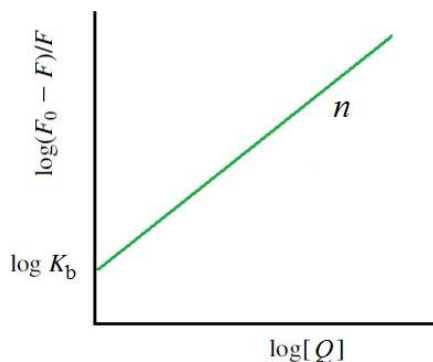
$$K_b = [Q_n F] / [Q]^n [F]$$

**Equação 32**

sendo que a equação de Stern-Volmer passa a assumir a seguinte forma:

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

**Equação 33**



**Figura 49.** Gráfico para a supressão de um sistema contendo mais de um fluoróforo, com a mesma capacidade de formação de uma interação com a molécula do supressor. [modificado de Lakowicz, 2006]

#### 4.3.4.2 Análise de caso para os experimentos de supressão de fluorescência

Muitos modelos baseados na supressão de fluorescência de proteínas têm sido usados para estudar a interação entre fármacos e proteínas, como a equação de Stern-Volmer [Gu, 2009; Rahman, 2008] e sua forma modificada [Liang, 2008; Zhang 2008], curva de regressão logarítmica dupla [He, 2009; Ladokhin, 2000; Gatto, 2006; Stella, 2004]] e sua forma modificada [Braslavsky, 2007; Valeur, 2002], curva de Lineweaver-Burk [Xiang, 2010], equação de Levine [Xu, 2008; Zhang, 2009; Callis, 2004], equação de Benesi-Hildebrand [Zhang, 2008], equação de Scatchard [Yang, 2011; Mandal, 2010], equação de Johansson [Wang, 2008] e modelo Tachiya. [Zhang, 2010] No entanto, as constantes de interação obtidas e o número de sítios de interação são diferentes quando considerados os diferentes modelos ou equações. Qual modelo baseado em supressão de fluorescência seria então adequado para estudar a interação entre fármaco e proteína? [Weert, 2011] Na Tabela 9 estão descritos as equações e um resumo das condições teóricas específicas para cada método.

As diferentes definições apresentadas para a equação de Stern-Volmer (Tabela 9) têm sido amplamente empregadas no estudo da interação de compostos bioativos com inúmeros sistemas proteicos. Entretanto, em um estudo crítico, Weert *et al.* [Weert, 2010; Weert, 2011] descreveram uma série de hipóteses que podem ser levadas em consideração para melhorar a interpretação dos resultados, tanto do ponto de vista experimental como da análise teórica, que estão diretamente ligadas aos modelos matemáticos propostos e apontam para várias armadilhas a que cada método empregado pode estar sujeito. [Weert, 2010; Weert, 2011]

**Tabela 9.** Modelos matemáticos usados para diferentes ajustes nos estudos de supressão de fluorescência para o processo de complexação hóspede/hospedeiro.

Equação	Considerações
Regressão logarítmica dupla $\frac{\lg(F_0 - F)}{F} = \lg K_a + n \lg [Q]$	Supressão estática; $k_a$ é a constante de interação; $n$ número de sítios de interação.
Lineweaver–Burk/Stern-Volmer modificado $(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_a^{-1} F_0^{-1} [Q]^{-1}$	Supressão estática $k_a$ é a constante de interação.
Lineweaver–Burk modificada $(F_0 - F)^{-1} = f^{-1} F_0^{-1} + K_a^{-1} F_0^{-1} f^{-1} [Q]^{-1}$	Supressão estática; $f$ é a fração de fluorescência acessível; $k_a$ é a constante de interação.
Stern-Volmer não linear modificada $\frac{F_0}{F} = (1 + K_{SV}[Q])(1 + K_a[Q])$	Uma única classe de fluoróforos, todos igualmente acessíveis ao extintor; $K_{SV}$ e $k_a$ são as constantes de supressão dinâmica e estática; segunda ordem em relação à $[Q]$ .
Regressão logarítmica dupla modificada $\lg \left[ \frac{F - F_0}{F_{\max} - F} \right] = n \lg K_a + n \lg \left[ \frac{[Q] - (F - F_0)[P]}{F_{\max} - F_0} \right]$	$k_a$ é a constante de interação aparente; $n$ local de interação; $F_{\max}$ é a fluorescência máxima residual.
Levine $nk_a - k_{af} = \frac{f}{(R - f)[P]}$	Complexo inibidor-proteína 1:1, $k_a$ e a capacidade de interação; ajustada pelo método dos mínimos quadrados.
Regressão de logaritmo duplamente modificada $\frac{\lg(F - F_0)}{F} = n \lg K_a + n \lg \left[ \frac{[Q] - (F - F_0)[P]}{F_0} \right]$	$k_a$ é a constante de interação aparente; $n$ é o número de sítios de interação, $[P]$ concentrações totais de proteína
Scatchard $v = \frac{nK_a[Q]}{1 + K_a[Q]}$	$v$ é o número de moles de inibidor ligado por mole de proteína; $n$ é o número de sítios de interação.
Tachiya $\frac{F_{\max}}{F_0} = \frac{1}{1 + n(R_0/r)^6}$	$F_{\max}$ é a intensidade de fluorescência saturada; $n$ é o número de locais de interação; $r$ é a distância entre proteína e o extintor e $R_0$ é à distância de Forster; $[Q]$ deve ser suficientemente alto para saturar o valor de $F/F_0$ .
Lehrer–Fasman $K_a = \frac{\beta}{1 - \beta} \frac{1}{[Q]}$	Assumindo que a interação de cada molécula de ligante causa o mesmo efeito de supressão na intensidade de fluorescência; $K_a$ é a constante de associação; $Q$ é a porcentagem corrigida de supressor; $Q_{\max}$ , a supressão máxima; $[Qt]$ é a concentração total de supressor; $[Pt]$ é a concentração total de proteína e $n$ é a estequiometria de interação; $\beta = Q/Q_{\max}$ e $[Q] = [Qt] - n[Pt]$ ,
Johansson $F_0 - F = \frac{Q_{\max}[Q]}{K_a^{-1} + [Q]}$	$Q_{\max} = F_0 - F_{\max}$ é a fluorescência máxima que pode ser extinta; $k_a$ é a constante de associação; curva é ajusta pelo método dos mínimos quadrados

Obs:  $F_0$  e  $F$  é a fluorescência na ausência e presença do supressor respectivamente e  $[Q]$  é a concentração adicionada do supressor. Curva de regressão logarítmica dupla.

### **Armadilha 1: Fluorescência residual do complexo**

I) A formação de um complexo nem sempre leva a um complexo não fluorescente. No caso de um complexo fluorescente é necessário adicionar um parâmetro à equação 20, relativo à contribuição de fluorescência pelo complexo (Equação 34):

$$\frac{F_0 - F}{F - F_c} = K_S [Q]$$

### **Equação 34**

onde  $F_c$  é a fluorescência da proteína totalmente complexada. Como  $F_c$  é o valor na concentração infinita do ligante, ele pode ser calculado ajustando a Eq. 34 aos dados experimentais. [Weert, 2010]

II) A equação de Stern-Volmer modificada (Equação 30) foi explicitamente derivada para um processo de supressão dinâmica, no qual há uma contribuição constante de fluorescência da fração não extingüível. No entanto, isso não é válido para um processo de supressão estática que resulta em um complexo fluorescente. No entanto, sob condições especiais (ver armadilha 2), o Stern-Volmer modificado produzirá valores de  $K_a$  e  $f_a$  que se aproximam dos valores verdadeiros de  $K_a$  e  $f_a$ .

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a}$$

### **Equação 30**

onde  $f_a$  é geralmente definido como a fração de fluoróforos que é acessível ao supressor. Para uma supressão estática com uma fluorescência residual do complexo, o fator  $(1/f_a)$  na verdade indica a fluorescência fracionada do complexo em comparação com a proteína não complexada. [Weert, 2010]

### **Armadilha 2: concentração de ligante livre versus concentração de ligante adicionada**

A concentração de ligante que deve ser inserida nas equações 21 e 30 não é a concentração de ligante adicionada, mas sim a concentração de ligante livre. Essa concentração de ligante livre pode ser difícil de determinar e, portanto, é necessário projetar o experimento de modo que  $[Q]_{\text{livre}} \approx [Q]_{\text{ad}}$ . O método mais fácil é assegurar que a

concentração de ligante seja pelo menos um fator 10 acima da concentração de proteína. No entanto, o valor da constante de dissociação ( $K_d=1/K_a$ ) em comparação com a concentração de proteína também é importante para poder medir em uma faixa adequada. Na prática, o método deve ser projetado de tal forma que a concentração de proteína esteja bem abaixo do valor de  $K_d$ , enquanto a concentração de ligante está próxima do valor de  $K_d$  [Epps 1995]. [Weert, 2010] O erro potencial introduzido por esta armadilha é mais importante para a equação de Stern-Volmer modificada (Equação 30). Assim, as concentrações mais baixas de ligantes, onde os desvios entre as concentrações de ligantes livres e adicionados são maiores, têm maior influência no ajuste linear. [Weert, 2010]

***Armadilha 3: Gráficos logarítmicos duplos para determinar a estequiometria e a constante de interação***

Embora este procedimento seja matematicamente correto, a regressão depende muito da *armadilha 1*: assumir que um complexo não fluorescente é formado. Mesmo uma pequena fluorescência residual afetará a inclinação da curva, que governa tanto a estequiometria (a própria inclinação) quanto a constante de associação. Como este último é a potência de 10 do intercepto, é extremamente sensível a pequenas mudanças na inclinação do procedimento de ajuste. Além disso, também na equação de Stern-Volmer *Modificada Duplo Log* a questão mencionada anteriormente  $[Q]_{\text{livre}}$  vs  $[Q]_{\text{ad}}$  tem que ser levada em consideração. Para resolver esse problema da concentração  $[Q]_{\text{livre}}$  vs  $[Q]_{\text{ad}}$  pode se usar uma derivatização da equação 33 como descrito na equação 35 [Weert, 2010]

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = n \log K_a + n \times \log \left( [Q]_{\text{ad}} - \frac{F_0 - F}{F_0} * [P_t] \right)$$

**Equação 35**

onde  $[P_t]$  é a concentração total de proteína e  $[Q]_{\text{livre}}$  é:

$$[Q]_{\text{livre}} = [Q]_{\text{ad}} - \frac{F_0 - F}{F_0} * [P_t]$$

**Equação 36**

A equação (36) pode ser usada em duas condições; primeiro, o complexo deve ser não fluorescente (*armadilha 1*). Em segundo lugar, e mais importante, a equação (36) só pode ser usada se a estequiometria de interação for 1:1. Isso desafia todo o propósito de usar a equação 33. [Weert, 2010]

No entanto, a equação (36) pode ser usada para contornar os problemas com a concentração de supressor livre desconhecida para a equação (33), mas precisará ser modificado para uso nas equações (21 e 30) de acordo com a equação (37):

$$[Q]_{livre} = [Q]_{ad} - \frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} * [P_t]$$

#### **Equação 37**

As equações 36 e 37 também mostram que para  $[Q]_{ad} \gg [P_t]$ ,  $[Q]_{ad} \approx [Q]_{livre}$ . [Weert, 2010]

#### ***Armadilha 4: o efeito do filtro interno***

O efeito do filtro interno refere-se à absorção da radiação que se dirige (excitação) ou emana (emissão) do fluoróforo. Ou seja, quando um composto absorvente é adicionado a uma solução, ele pode reduzir a quantidade de radiação de excitação que atinge o fluoróforo, ou pode absorver parte da radiação emitida pelo fluoróforo. O método de correção mais fácil é determinar a absorbância no comprimento de onda de excitação e emissão para cada concentração de ligante (incluindo a proteína sem ligante) e então multiplicar o valor de fluorescência observado usando o seguinte fator, já descrito anteriormente pela equação (1): [Weert, 2010]

$$F_{cor} = F_{obs} 10^{\left[ \frac{A_{exc} + A_{em}}{2} \right]}$$

#### **Equação 1**

Onde  $F_{corr}$  é o valor de fluorescência corrigido,  $F_{obs}$  o valor de fluorescência medido,  $A_{exc}$  o valor de absorção no comprimento de onda de excitação e  $A_{em}$  o valor de absorção no comprimento de onda de emissão. A equação 1 assume essencialmente a fluorescência de uma fonte pontual no centro da cubeta, uma situação que é improvável que seja o caso. Deve-se notar também que esta equação em particular é válida apenas para espectros de

fluorescência que são obtidos em cubetas de 1x1 cm e, concomitantemente, para valores de absorbância determinados em cubetas de 1 cm. Em outras cubetas, o termo do lado direito precisa ser alterado para corrigir as diferenças no comprimento do caminho. Assim, a melhor maneira de lidar com o efeito do filtro interno é garantir que seu efeito seja mínimo. Isso significa que as concentrações devem ser escolhidas de modo que a absorbância do ligante adicionado no comprimento de onda de excitação e emissão seja inferior a 0,1. [Weert, 2010]

O efeito do filtro interno (sobreposição dos espectros de absorção ligante emissão fluoróforo) pode causar problemas adicionais, como a produção de um deslocamento para o vermelho percebido nos espectros de emissão devido à sua absorção estar focada no lado "azul" do espectro de emissão. [Sgarbossa, 2013; Conduct, 2022]

No entanto, várias abordagens foram desenvolvidas ao longo dos anos na tentativa de minimizar seu impacto. A equação direta de Birdsall *et al.* (Equação 38) é usado para corrigir, com bons resultados, o efeito do filtro interno. [Birdsall, 1983; Conduct, 2022]

$$F_{corr} = F_{obs} / 10^{-Ad}$$

### **Equação 38**

onde,  $F_{corr}$  é a fluorescência corrigida,  $F_{obs}$  é a fluorescência medida,  $A$  é a absorbância da amostra no comprimento de onda de excitação e  $d$  é a distância percorrida na direção de excitação (geralmente 0,5 cm se for usada uma cubeta de caminho óptico de 1 cm). [Birdsall, 1983; Conduct, 2022]

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e a discussão acerca dos estudos fotofísicos e cálculo molecular da interação dos derivados de tiossemicarbazona **UTS**, **DFT** e **TFTS**, metformina **MFCI**, **MFB**r e **MFCF3**, análogo da chalcona **IC9** e metoxixantona **1MXT**, **2MXT**, **4MXT**, **23MTX** e **34MTX**, com albumina sérica humana (ASH) estão apresentados a seguir.

### **5.1 Dados espectroscópicos para a ASH**

#### **5.2 Derivados de tiossemicarbazona**

#### **5.3 Derivados de metformina**

#### **5.4 Derivado de análogo à chalcona**

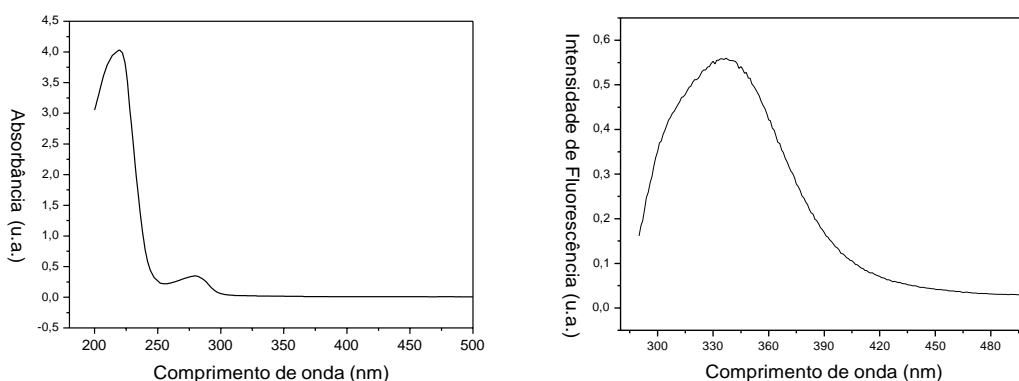
#### **5.5 Derivados de xantona**



## 5.1 Albumina sérica humana (ASH)

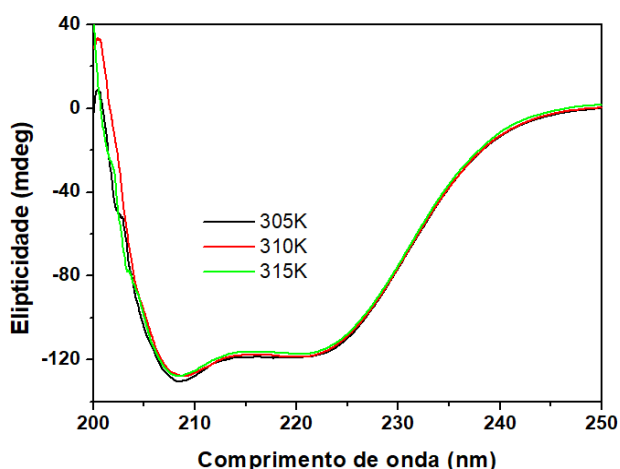
### 5.1.1 Espectroscopia na região do ultravioleta/visível (UV-Vis), dicroísmo circular (DC) e espectro de emissão de fluorescência resolvida no tempo.

A albumina sérica humana ASH apresenta uma banda em comprimento de onda em torno de 280 nm, a qual é atribuída principalmente à absorção por parte do triptofano e em menor grau pela tirosina e pela fenilalanina (Figura 50).



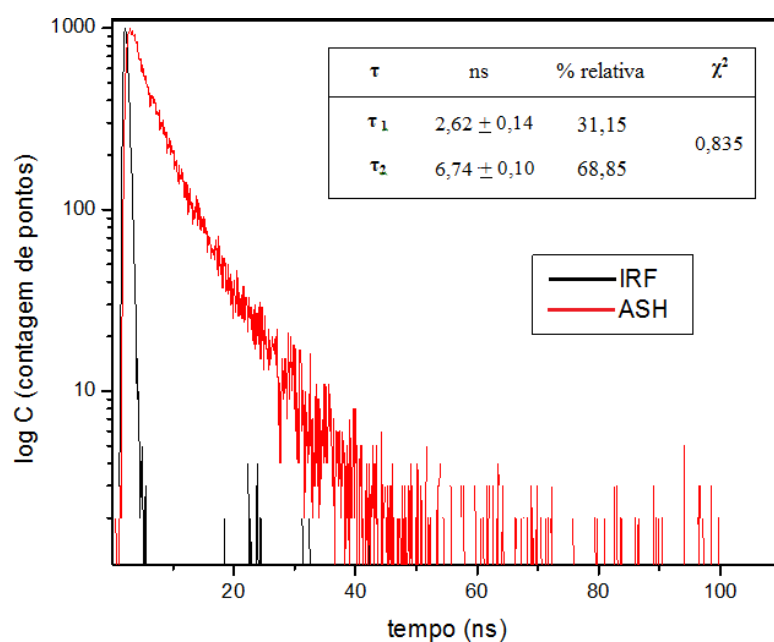
**Figura 50.** A) Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH e B) Espectro de emissão de fluorescência para solução de ASH; tamponada com PBS (pH = 7,4) na concentração de  $1,0 \times 10^{-5}$  M.

Estudos de dicroísmo circular em diferentes temperaturas (Figura 51) podem fornecer informações sobre a integridade estrutural da albumina sérica humana ASH que, em sua forma nativa, possui aproximadamente 67% de estruturas na forma de hélice- $\alpha$ . [Sugio, 1999]

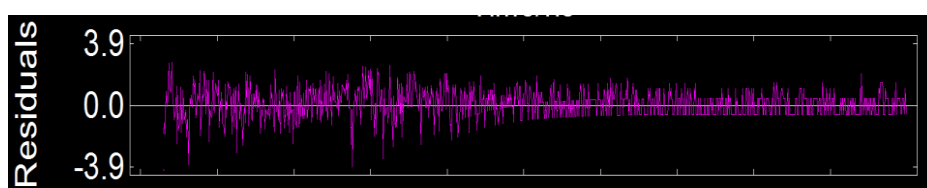


**Figura 51.** Espectros de dicroísmo circular de ASH (pH = 7,4), [ASH] =  $1,00 \times 10^{-6}$  M, a T = 305 K, 310 K e 315 K.

O espectro de emissão de fluorescência resolvida no tempo para ASH está mostrado na figura 52. Os dois tempos de vida encontrados,  $\tau_1 = 2,62$  ns e  $\tau_2 = 6,74$  ns, estão condizentes com os valores apresentados na literatura (2 a 4 ns e 6,3 ns). O tempo  $\tau_1$  está correlacionado com o tempo de vida do triptofano livre, enquanto  $\tau_2$  diz respeito ao processo de decaimento de fluorescência que está relacionado com o tempo de vida da interação do triptofano e seu meio ambiente com as transições  $^1L_a$  e  $^1L_b$  com os aminoácidos da parte hidrofóbica da interação peptídica. [Valeur, 2011; Lakowicz, 2006]



a)

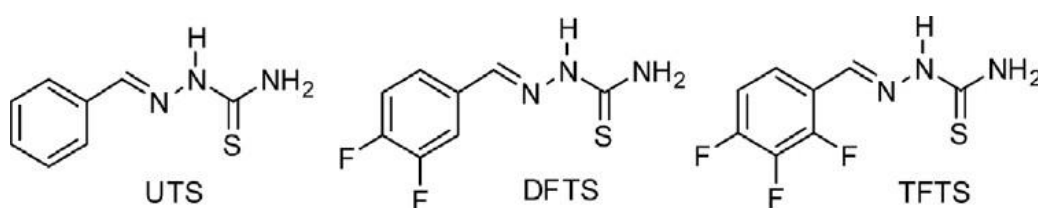


b)

**Figura 52.** a) Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ( $\lambda_{exc} = 280$  nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) ( $[ASH] = 1,00 \times 10^{-5}$  M). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento), b) Distribuição dos resíduos.

## 5.2 As Tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS

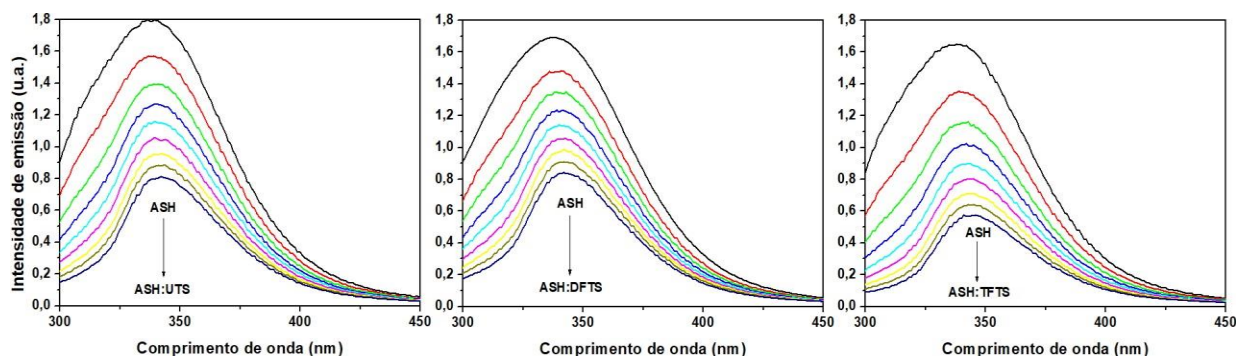
A interação entre ASH com três potenciais fármacos antitripanossômicos derivados da tiossemicarbazona, isto é, (*E*)-2-benzilideno-hidrazina-carbotioamida (**UTS**); (*E*)-2-(3,4-difluoro-benzilideno)-hidrazina-carbotioamida (**DFTS**) e (*E*)-2-(2,3,4-trifluoro-benzilideno)-hidrazina-carbotioamida (**TFTS**) (Figura 53), foi estudada em condições fisiológicas por técnicas de emissão de fluorescência no estado estacionário, nas temperaturas de 296 K, 303 K e 310 K, fluorescência com resolução temporal, fluorescência síncrona e cálculos teóricos (docagem molecular). [Chaves, 2017]



**Figura 53.** Estrutura para as tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS usadas nos estudos de interação com ASH.

### 5.2.1 Estudo de supressão de fluorescência da ASH pelas tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS

Os resultados dos estudos de supressão de fluorescência da ASH pelos compostos derivados da tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS, em solução de tampão de fosfato (pH= 7,4) na temperatura de 310 K estão apresentados na figura 54.



**Figura 54.** Espectros mostrando a supressão da emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para uma solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações das tiossemicarbazonas, [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M e [UTS] = [DFTS] = [TFTS] = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e 2,60  $\times 10^{-5}$  M, a T = 310 K.

Este processo de supressão indica que compostos derivados das tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS podem estar localizados próximos ao resíduo de triptofano. A pequena alteração no comprimento de onda do máximo de emissão de fluorescência para ASH durante o processo de supressão é uma evidência de que a presença de UTS, DFTS e TFTS exerce muito pouca influência na polaridade do microambiente dentro da cavidade onde se encontra o resíduo Trp-214. [Chaves, 2016]

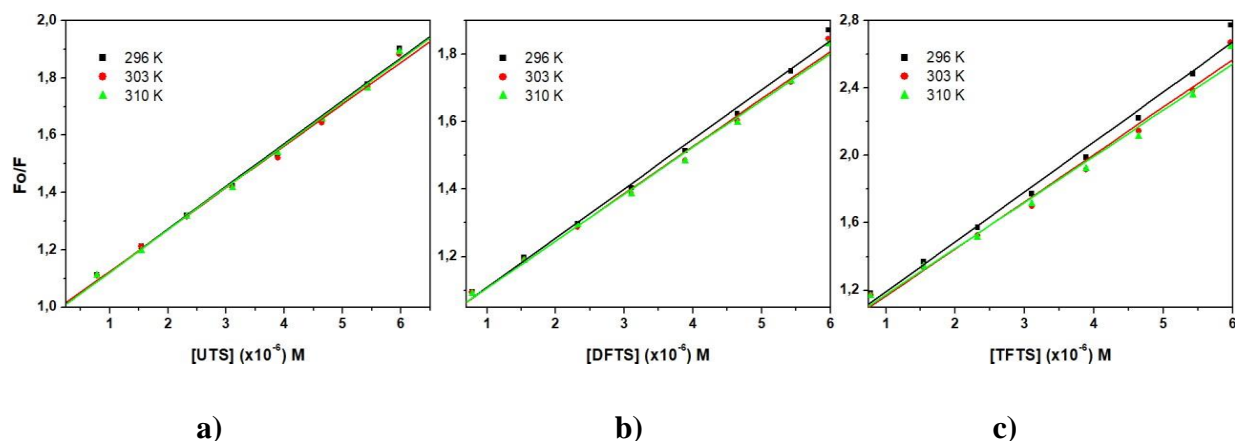
A fim de obter uma compreensão mais profunda sobre o mecanismo de supressão de fluorescência, se estático e/ou dinâmico, os dados de supressão de fluorescência de estado estacionário (Figura 55) foram analisados usando a equação de Stern-Volmer (Equação 19) [Lakowicz, 2006]. Conforme listado na tabela 10, os valores da constante de supressão bimolecular ( $k_q$ ) para os derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS ( $k_q = \times 10^{12}$  a  $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), são maiores do que a constante de velocidade de difusão limite na água ( $k_{dif} \approx 5,00 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a 298 K) [Brune, 1993], indicando que a principal supressão da fluorescência ocorre via processo estático. Este mecanismo estático provavelmente se origina da associação do estado fundamental entre a ASH e os derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS. [Barros, 2016]

Os valores da constante de supressão de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) para os derivados de tiossemicarbazona fluorados DFTS e TFTS diminuem com o aumento da temperatura, o que é um indicativo de um mecanismo de supressão de fluorescência estática, enquanto para o derivado da tiossemicarbazona UTS, não há tendência significativa com o aumento da temperatura. [Chaves, 2016]

Os valores de  $K_{SV}$  e  $k_q$  para os estudos da interação dos derivados da tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS com ASH são apresentados na tabela 10.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \qquad k_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0}$$

**Equação 21**



**Figura 55.** Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ) pelas tiossemicarbazonas **a)** UTS, **b)** DFTS e **c)** TFTS.

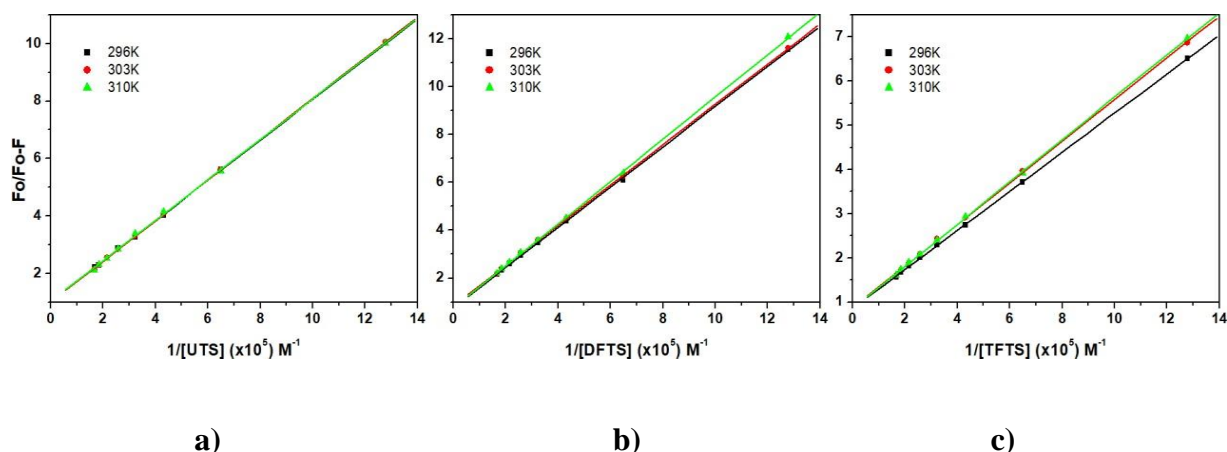
**Tabela 10.** Valores de  $K_{SV}$  e  $k_q$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ) pelas tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

T (K)	296		303		310	
	$K_{SV}$	$k_q$	$K_{SV}$	$k_q$	$K_{SV}$	$k_q$
	( $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ )	( $\times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	( $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ )	( $\times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	( $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ )	( $\times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
<b>UTS</b>	$3,49 \pm 0,07$	6,65	$3,41 \pm 0,07$	6,49	$3,48 \pm 0,06$	6,63
<b>DFTS</b>	$3,42 \pm 0,06$	6,52	$3,29 \pm 0,08$	6,27	$3,25 \pm 0,06$	6,20
<b>TFTS</b>	$6,94 \pm 0,23$	13,2	$6,55 \pm 0,25$	12,5	$5,41 \pm 0,23$	10,3

As constantes de supressão efetivas da fluorescência de ASH pelos derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS, ou constantes de interação de Stern-Volmer modificadas ( $K_a$ ) foram obtidas a partir da equação de Stern-Volmer modificada (Equação 29), conforme mostrado na figura 56. [Lakowicz, 2006]

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

**Equação 30**



**Figura 56.** Gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ) pelas tiossemicarbazonas a) UTS, b) DFTS e c) TFTS.

Os valores de  $K_a$  encontrados para a interação dos derivados da tiossemicarbazona/ASH (Tabela 11) estão todos na faixa entre ( $K_a \cong 10^4$  a  $10^5 \text{ M}^{-1}$ ) em todos os casos apresentando boa correlação linear (Tabela 11). Esses resultados indicam que os derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS interagem com uma força moderada a ASH, pois os valores de  $K_a$  foram semelhantes ao da literatura para outras moléculas que apresentam interação moderada entre moléculas bioativas e albumina ( $K_a \cong 10^4$  a  $10^5 \text{ M}^{-1}$ ). [He, 2005; Tang, 2006; Li, 2007; Zhang, 2008; Li, 2009]

**Tabela 11.** Valores para  $K_a$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ) pelas tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS nas temperaturas de 296, 303 e 310 K.

T (K)	296	303	310
Composto	$K_a$ ( $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ )	$K_a$ ( $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ )	$K_a$ ( $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ )
UTS	$3,44 \pm 0,10$	$2,78 \pm 0,10$	$1,90 \pm 0,10$
DFTS	$2,34 \pm 0,10$	$2,12 \pm 0,10$	$1,94 \pm 0,10$
TFTS	$4,55 \pm 0,10$	$4,32 \pm 0,10$	$4,15 \pm 0,10$

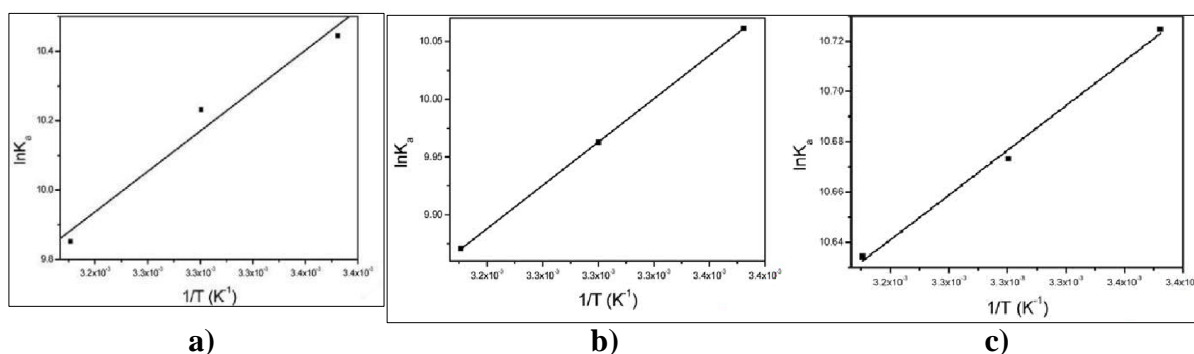
**Tabela 12.** Valores estatísticos obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados pela supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS.

Composto	Temperatura (K)	$R^2$	$SD$	$N$	$P$
UTS	296	0,9995	0,0769	8	<0.0001
	303	0,9996	0,0720	8	<0.0001
	310	0,9975	0,1871	8	<0.0001
DFTS	296	0,9999	0,0546	8	<0.0001
	303	0,9999	0,0418	8	<0.0001
	310	0,9999	0,0968	8	<0.0001
TFTS	296	0,9996	0,0187	8	<0.0001
	303	0,9999	0,0391	8	<0.0001
	310	0,9998	0,0285	8	<0.0001

Através dos valores de  $K_a$  encontrados para a supressão de ASH pelos derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS foram construídos gráficos de van't Hoff (Figura 57) empregando-se a equação 39. [Valeur, 2002; Lakowicz, 2006] A partir destes gráficos foram obtidos os parâmetros termodinâmicos de variação de entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) e de entropia ( $\Delta S^\circ$ ) envolvidos no processo de supressão da fluorescência da ASH, os quais permitiram o cálculo do valor da variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) (Tabela 13). Foram escolhidas as temperaturas de 296 K, 303 K e 310 K, pois a albumina sérica humana (ASH) não apresenta qualquer degradação estrutural nestas condições.

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

**Equação 39**



**Figura 57.** Gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas tiossemicarbazonas a) UTS, b) DFTS e c) TFTS.

**Tabela 13.** Valores dos parâmetros termodinâmicos  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  e  $\Delta G^\circ$  obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) pelas tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS.

Composto	(K)	$\Delta H^\circ$ kJ/mol	$\Delta S^\circ$ J/mol.K	$\Delta G^\circ$ kJ/mol	$R^2$
UTS	296			-38,8	
	303	-32,3	0,022	-39,0	0,9848
	310			-39,1	
DFTS	296			-24,8	
	303	-10,4	0,048	-25,1	
	310			-25,5	0,9999
TFTS	296			-26,4	
	303	-4,9	0,072	-26,9	0,9904
	310			-27,4	

As principais forças de interação entre moléculas e proteínas podem incluir interações eletrostáticas, interações de hidrogênio, efeito de empilhamento  $\pi$  e empilhamento T, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, forças dispersivas de London e interações hidrofóbicas. [Ross, 1981] Os valores de  $\Delta H^\circ$  negativos encontrados em todos os casos estudados para os derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS, mostraram que o processo de interação dos derivados da tiossemicarbazona/ASH foi exotérmico (Tabela 13). Os valores de  $\Delta S^\circ$  positivos evidenciaram que o tipo de interação entre os derivados da tiossemicarbazonas/ASH possuem certo caráter hidrofóbico, e os valores de  $\Delta G^\circ$  negativos ( $\Delta G^\circ \cong -39$  a  $-24 \text{ kJ/mol}$ ) demonstraram a espontaneidade da interação dos derivados da tiossemicarbazona/ASH (Tabela 13). [Wang, 2014; Chaves, 2017]

Para o processo de interação dos derivados da tiossemicarbazona/ASH baseado simplesmente em um modelo de força intermolecular, podemos inferir que ela pode envolver uma razoável interação hidrofóbica, evidenciada pelos valores positivos de  $\Delta S^\circ$ , o que pode ser explicado pela baixa solubilidade em água dos derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS.

A partir da análise termodinâmica, a interação entre ASH e os derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS é conduzida tanto entropicamente como



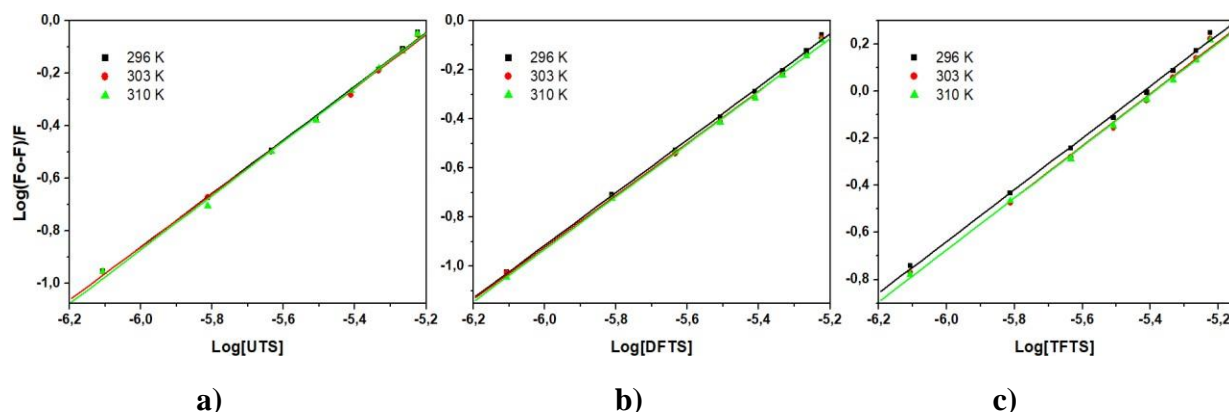
entalpicamente, uma vez que ambos os valores de variação de entalpia e entropia contribuem para a espontaneidade do processo de interação. De acordo com a teoria de Ross e Subramanian [Ross, 1981], o processo de complexação global dos derivados da tiossemicarbazonas/ASH é favorecido entropicamente em uma etapa inicial com a formação de um complexo hidrofobicamente associado que é descrito por valores de  $\Delta S > 0$  (onde as moléculas de solvente não são consideradas envolvidas em qualquer extensão apreciável), o qual é seguido de uma etapa de interações intermoleculares entre a proteína e os compostos ligantes, sugerindo que nessa etapa pode estar ocorrendo as interações hidrofílicas tais como ligação de hidrogênio, interações dipolares e interações do tipo  $\pi$ , o que é expresso pelos valores de  $\Delta H < 0$  (Tabela 13).

Além disso, com o aumento do número de átomos de flúor como substituinte na porção aromática das tiossemicarbazonas, observa-se uma menor contribuição dos fatores entálpicos (maiores valores de  $\Delta H^\circ$ ) para a espontaneidade da interação ( $\Delta G^\circ$ ), provocado principalmente pela redistribuição da densidade eletrônica do sistema conjugado  $\pi$  dos derivados da tiossemicarbazona e, conseqüentemente, acarretando a diminuição de possíveis interações hidrofílicas. [Ross, 1981]

Para uma supressão estática, os sítios de interação são independentes dos sítios equivalentes na macromolécula. Valores de constantes de interação ( $K_b$ ) e de números de sítios de interação ( $n$ ) foram obtidos a partir da construção de gráficos de *Stern Volmer modificado de duplo log* (Equação 33), [Valeur, 2002; Lakowicz, 2006] como mostrados na figura 58 para UTS, DFTS e TFTS. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 14, o número de sítios de interação entre a ASH e os derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS é aproximadamente igual a 1 (um). Isso indica que existe somente uma interação molecular entre os derivados das tiossemicarbazonas estudadas UTS, DFTS e TFTS e uma molécula de ASH.

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

**Equação 33**



**Figura 58.** Gráficos de Stern Volmer modificado de duplo log ( $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$ ) para a supressão de fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) pelas tiossemicarbazonas **a)** UTS, **b)** DFTS e **c)** TFTS.

Os resultados encontrados para os valores de  $K_b$  e  $n$  (Tabela 14) mostraram, mais uma vez, pouquíssima dependência com a temperatura. De uma maneira geral, os valores de  $K_b$  e  $n$  indicam que o provável mecanismo de supressão de fluorescência de ASH pelos derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS é estático, pois não houve grandes mudanças com o aumento da temperatura.

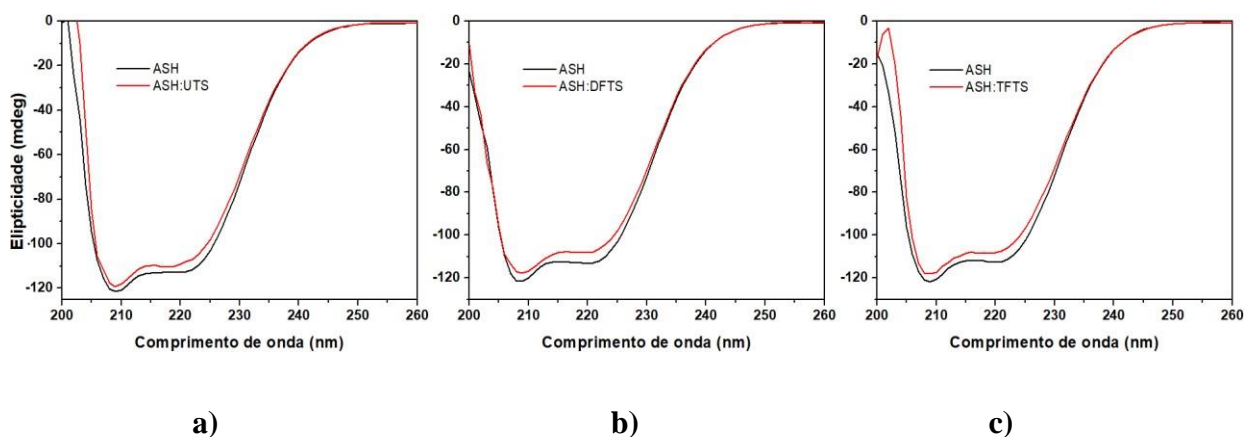
**Tabela 14.** Valores de número e ordem de interação ( $n$  e  $K_b$ ) obtidos a partir dos gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) pelas tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

Composto	T (K)	$n$	$K_b(\times 10^5 \text{ M}^{-1})$	$R^2$	SD
UTS	296	$1,02 \pm 0,02$	$1,75 \pm 0,11$	0,9989	0,015
	303	$1,01 \pm 0,02$	$1,55 \pm 0,10$	0,9998	0,015
	310	$1,03 \pm 0,02$	$1,97 \pm 0,13$	0,9983	0,019
DFTS	296	$1,07 \pm 0,01$	$3,41 \pm 0,08$	0,9995	0,011
	303	$1,06 \pm 0,02$	$2,72 \pm 0,10$	0,9991	0,015
	310	$1,07 \pm 0,01$	$3,10 \pm 0,08$	0,9994	0,012
TFTS	296	$1,09 \pm 0,02$	$9,05 \pm 0,12$	0,9988	0,018
	303	$1,10 \pm 0,03$	$8,94 \pm 0,16$	0,9980	0,023
	310	$1,09 \pm 0,02$	$8,31 \pm 0,13$	0,9985	0,019

### 5.2.2 Dicroísmo circular (DC) para as tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS

Os estudos de dicroísmo circular (DC) foram obtidos para avaliar a mudança estrutural de ASH promovida pela adição dos derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS. Os espectros de dicroísmo circular obtidos para ASH na ausência e na presença dos derivados da

tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS na temperatura de ( $T = 310\text{ K}$ ), estão apresentados na figura 59. Para todos os derivados da tiossemicarbazona estudada, isto é, UTS, DFTS e TFTS, os espectros de DC foram semelhantes quanto ao formato, somente apresentando variações de intensidade das bandas, o que significa que a estrutura de ASH foi mantida. [Yue, 2008] Nestes estudos foi observado que a adição de alíquotas dos derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS à albumina sérica humana ASH influenciou na sua elipticidade, sendo que a interação dos derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS com a ASH resultou na diminuição de ambas as bandas (208 e 222 nm), sugerindo a ocorrência de pequenas mudanças na estrutura secundária da proteína, o que pode ser indicativo da formação de complexos entre ASH e os derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS.



**Figura 59.** Espectros de dicroísmo circular para ASH livre e complexada com: **a)** ASH:UTS, **b)** ASH:DFTS e **c)** ASH:TFTS em ( $\text{pH} = 7,4$ ) a  $310\text{ K}$ .  $[\text{ASH}] = 1,00 \times 10^{-6}\text{ M}$  e  $[\text{UTS}] = [\text{DFTS}] = [\text{TFTS}] = 2,60 \times 10^{-5}\text{ M}$ .

Estimativas acerca da % de hélice- $\alpha$  para a estrutura secundária de ASH na ausência e na presença dos derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS foram feitas usando as equações (8 e 9). [Chen, 1972] Os valores experimentais de elipticidade ( $\theta$ ) foram lidos nos comprimentos de onda de (208 e 222 nm), e foram utilizados para calcular a elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual ( $MRE$ ), especificamente  $MRE_{208}$  e  $MRE_{222}$  (Equação 8). Posteriormente, os valores de  $MRE_{208}$  e  $MRE_{222}$  foram substituídos na equação (9) para calcular os valores de percentual de hélice- $\alpha$  (% hélice- $\alpha$ ) na estrutura secundária da ASH (Tabelas 18).

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

**Equação 8**

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

### Equação 9

**Tabela 15.** Porcentagem de hélice- $\alpha$  calculada a 208 e 222 nm para ASH livre (pH = 7,4) e na presença das tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS na temperatura de 310 K. Nas proporções 1:0, e 1:26 de ASH:tiossemicarbazona, [ASH] =  $1,00 \times 10^{-6}$  M e [UTS] = [DFTS] = [TFTS] = 0 e  $26,0 \times 10^{-6}$  M.

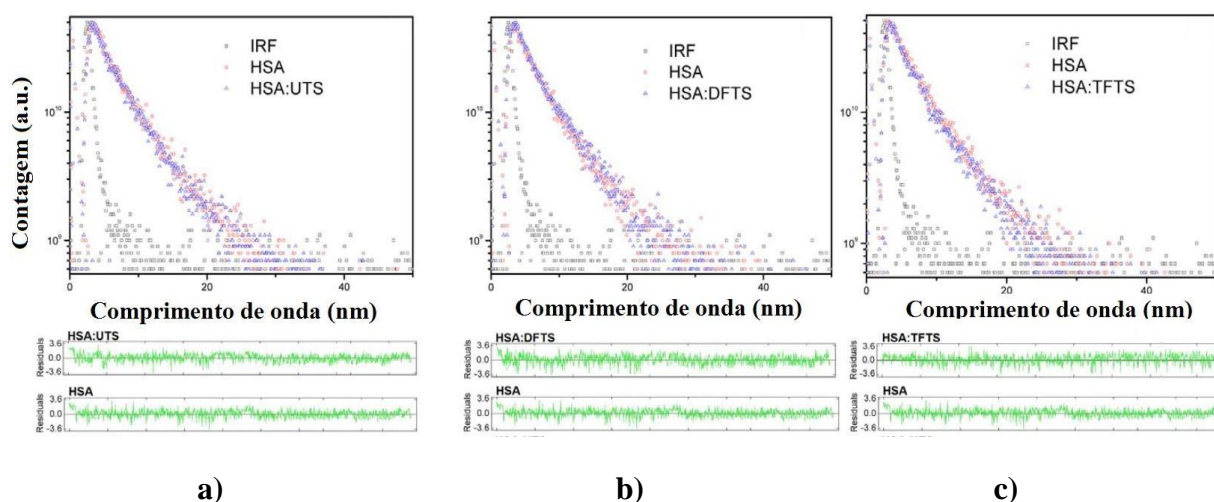
Composto	ASH:Q	(% hélice- $\alpha$ )	(% hélice- $\alpha$ )
		208 nm	222 nm
UTS	1:0	57,0	55,2
	1:26	55,4	52,6
DFTS	1:0	57,8	55,4
	1:26	55,2	52,3
TSTS	1:0	57,5	55,2
	1:26	55,5	52,1

Os resultados obtidos para a variação da % hélice- $\alpha$  da estrutura secundária da proteína ASH, mostrados na Tabela 15, apresentam uma diminuição com a presença dos derivados da tiossemicarbazonas (na razão molar de ASH/tiossemicarbazona de 1:26), quando comparados com os resultados na ausência dos derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS (ASH/tiossemicarbazonas na proporção 1:0), indicando que houve interação dos derivados da tiossemicarbazonas com os resíduos de aminoácidos da cadeia principal polipeptídica de ASH e que houve uma diminuição da rede de ligações hidrogênio [Kang, 2004; Shaikh, 2007; Yue, 2008; Cheng, 2009]. Esta justificativa é compatível com as mudanças espectrais obtidas pela observação dos espectros de emissão de fluorescência.

### 5.2.3 Estudos da supressão de fluorescência resolvida no tempo para ASH em presença das tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS

Para confirmar ainda mais o mecanismo de supressão de fluorescência envolvido nas interações ASH/derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS, medições de espectroscopia de emissão de fluorescência resolvidas no tempo foram realizadas (Figura 60). O tempo de vida de fluorescência de ASH livres e ASH/derivados de tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS (Tabela 16) na concentração máxima de moléculas de supressão usadas nos estudos de fluorescência em estado estacionário não variam significativamente, sendo de  $5,25 \pm 0,10$  ns ( $\chi^2 = 1,114$ ) para ASH;  $5,18 \pm 0,10$  ns ( $\chi^2 = 1,110$ ) para ASH:UTS;  $5,20 \pm 0,10$  ns

( $\chi^2 = 1,099$ ) para ASH:DFTS e  $5,22 \pm 0,10$  ns ( $\chi^2 = 1,117$ ) para ASH:TFTS. Uma vez que o tempo de vida da fluorescência do ASH livre não é afetado pela presença dos derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS, pode-se concluir que o mecanismo de supressão da fluorescência é estático, o que implica uma associação do estado fundamental entre os derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS e ASH [Chaves, 2016].



**Figura 60.** Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ( $\lambda_{exc} = 280$  nm), para uma solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na ausência e na presença das tiossemicarbazonas: **a)** UTS, **b)** DFTS e **c)** TFTS, [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M e [UTS] = [DFTS] = [TFTS] = 0 e  $2,6 \times 10^{-5}$  M, a T = 310 K. O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento)

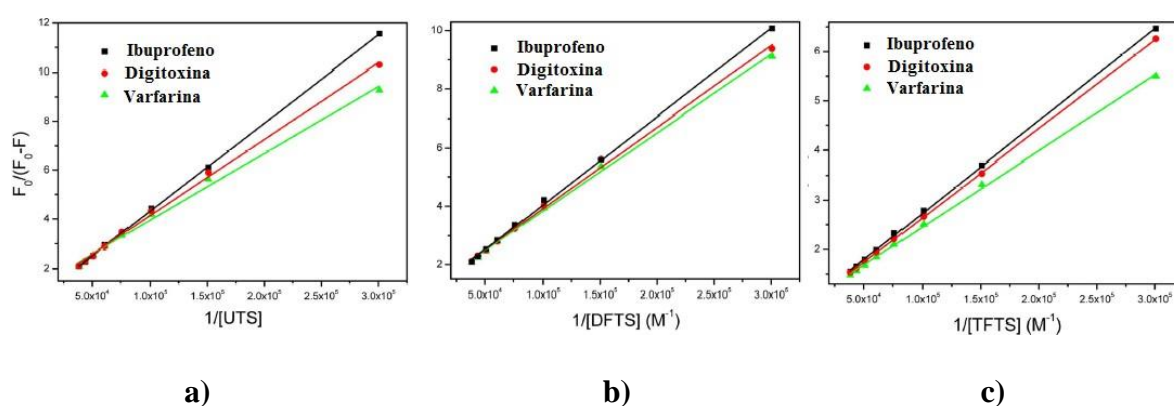
**Tabela 16.** Valores de tempo de vida  $\tau_1$  e  $\tau_2$  (em ns) para [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M, com a adição de alíquota das tiossemicarbazonas [UTS] = [DFTS] = [TFTS] =  $2,6 \times 10^{-5}$  M

Composto	$\tau_1$ (ns)	% relativa	$\tau_2$ (ns)	% relativa	$\chi^2$
ASH	$1,75 \pm 0,14$	30,2	$5,25 \pm 0,10$	69,8	1,114
ASH:UTS	$1,80 \pm 0,15$	30,0	$5,18 \pm 0,10$	71,0	1,110
ASH:DFTS	$1,82 \pm 0,13$	29,5	$5,20 \pm 0,10$	70,5	1,099
ASH:TFTS	$1,84 \pm 0,15$	29,9	$5,22 \pm 0,10$	72,1	1,117

#### 5.2.4 Estudos de interação competitiva para as tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS

A fim de identificar os sítios de interação dos derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS com ASH, foram realizados experimentos competitivos com marcadores de sítio. Existem três sítios de interação principais na albumina e, conforme descrito na literatura, varfarina, ibuprofeno e digitoxina, ligam-se especificamente no sítio SI (subdomínio IIA), sítio SII (subdomínio IIIA) e sítio III (subdomínio IB), respectivamente. [Caruso, 2016; Sun, 2016] A constante de interação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ), na presença de cada

marcador de sítio (Figura 61), foi calculada a 310 K (Tabela 17). Na presença de varfarina, os valores de  $K_a$  mudaram significativamente: 57,9% para UTS, 61,3% para DFTS e 49,4% para TFTS – enquanto a influência de ibuprofeno e digitoxina nos parâmetros de interação não é tão significativa. Esses resultados indicam uma competição entre a varfarina e os derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS para o mesmo sítio de interação na ASH [Chaves, 2017]. Portanto, UTS, DFTS e TFTS interagem preferencialmente no sítio I (subdomínio IIA) da ASH, onde o resíduo Trp-214 pode ser encontrado. [Sun, 2016] Este sítio de interação foi previamente descrito como o principal sítio de interação para alguns derivados de tiossemicarbazona [Basken, 2009; Yu, 2013].



**Figura 61.** Gráficos de Stern–Volmer modificado para as interações: **a)** ASH:UTS, **b)** ASH:DFTS e **c)** ASH:TFTS na presença de marcadores de sítio varfarina, digitoxina e ibuprofeno a 310 K em (pH = 7,4).  $[ASH] = 1,00 \times 10^{-5}$  M,  $[UTS] = [DFTS] = [TFTS] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$  e  $2,60 \times 10^{-5}$  M.

**Tabela 17.** Valores para a constante de interação a partir do Stern-Volmer modificado ( $K_a$ ) para a interação das tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS com ASH na presença de três marcadores de sítio diferentes a temperatura de 310 K.

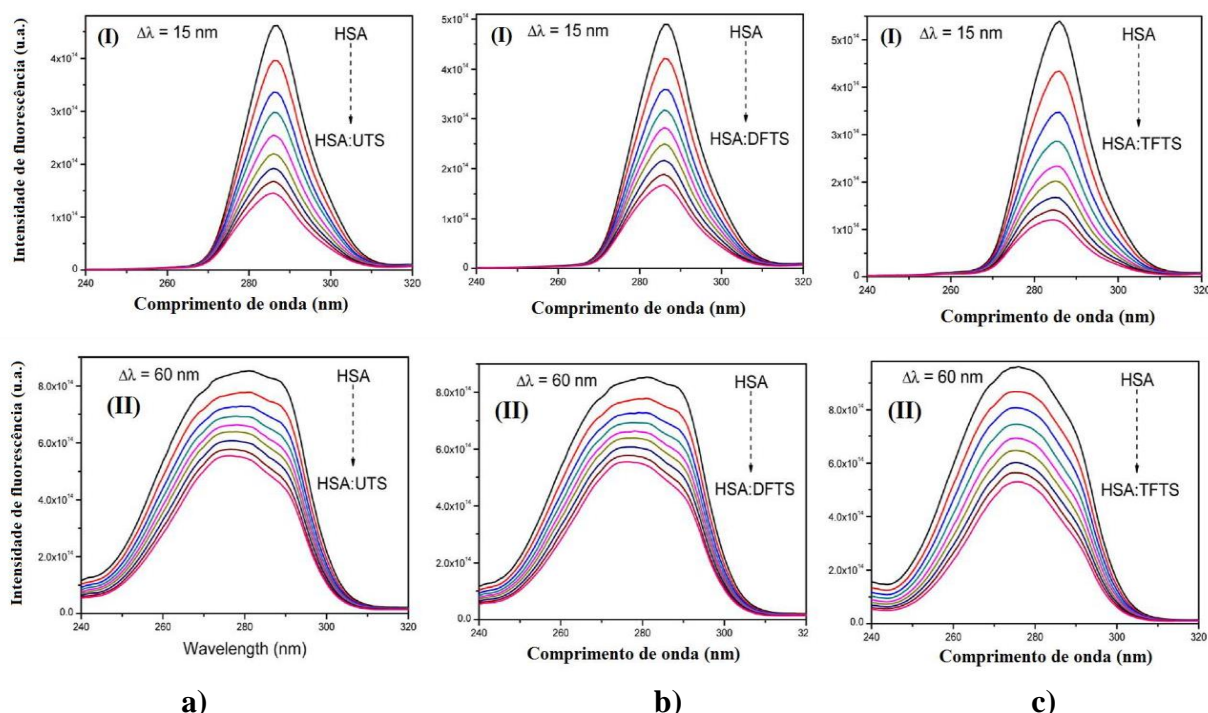
Composto	Marcador	Sítio	$K_a(\times 10^4 \text{ M}^{-1})$	% mudança	$R^2$
UTS	Varfarina	I	$0,80 \pm 0,10$	57,9	0,9999
	Ibuprofeno	II	$1,88 \pm 0,12$	1,05	0,9943
	Digitoxina	III	$1,70 \pm 0,11$	10,5	0,9978
DFTS	Varfarina	I	$0,75 \pm 0,11$	61,3	0,9977
	Ibuprofeno	II	$1,80 \pm 0,12$	7,23	0,9966
	Digitoxina	III	$1,75 \pm 0,10$	9,79	0,9991
TFTS	Varfarina	I	$2,10 \pm 0,10$	49,4	0,9990
	Ibuprofeno	II	$4,00 \pm 0,10$	3,61	0,9996
	Digitoxina	III	$3097 \pm 0,10$	4,34	0,9999

#### 5.2.5 Estudo de supressão de fluorescência síncrona para ASH em presença das tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS

Os espectros de fluorescência síncrona (SFS) podem fornecer informações sobre o ambiente molecular na vizinhança de cromóforos internos de proteínas, por meio da varredura simultânea dos monocromadores de excitação e emissão, mantendo um intervalo de comprimento de onda constante ( $\Delta\lambda$ ) entre eles. [Sun, 2016] É bem conhecido que quando  $\Delta\lambda$  é fixado em 15 nm ou 60 nm, o SFS fornecerá informações características sobre os resíduos de tirosina e triptofano, respectivamente. [Chaves, 2017] Conforme observado (Figura 62), o comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência para os resíduos Tyr não mostra mudanças significativas com adições sucessivas dos derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS, indicando que o microambiente próximo a resíduos Tyr não é perturbado pelos ligantes. [Chaves, 2017] Por outro lado, uma variação significativa no máximo de emissão quando  $\Delta\lambda=60$  nm, pelo menos para UTS e DFTS, indica que o microambiente no entorno do resíduo Trp214 está sendo de alguma forma afetado pela presença da tiossemicarbazona.

[Sun, 2016]





**Figura 62.** Espectros de fluorescência síncrona para ASH na ausência e na presença de **a)** UTS, **b)** DFTS e **c)** TFTS com **(I)**  $\Delta\lambda = 15$  nm para Tyr (A) e **(II)**  $\Delta\lambda = 60$  nm para Trp (A').  $[\text{ASH}] = 1,00 \times 10^{-5}$  M,  $[\text{UTS}] = [\text{DFTS}] = [\text{TFTS}] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$  e  $2,60 \times 10^{-5}$  M em solução PBS (pH= 7,4) a temperatura ambiente.

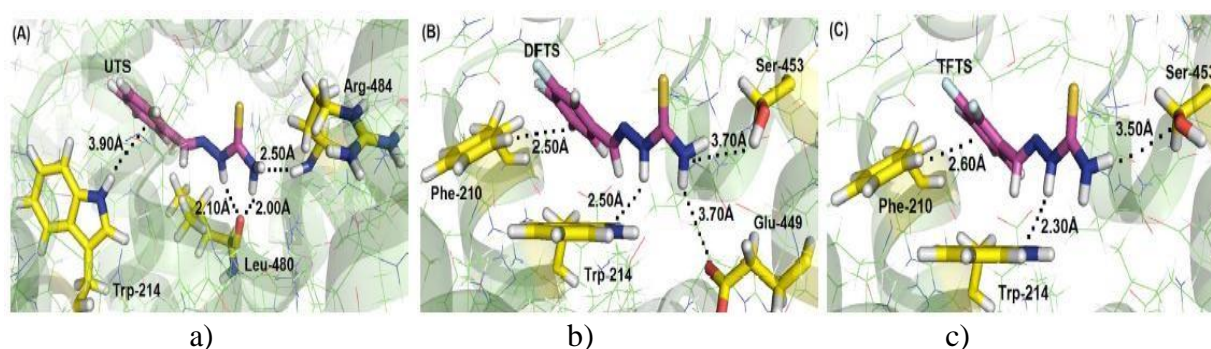
### 5.2.6 Estudos de docagem molecular para as tiossemicarbazonas UTS, DFTS e TFTS

A partir de estudos de supressão de fluorescência e interação competitiva, sabe-se que a interação dos derivados da tiossemicarbazona UTS, DFTS e TFTS ocorre no Sítio I (também conhecido como Sítio I de Sudlow), onde o resíduo Trp-214 pode ser encontrado. [Chaves, 2015] Para sugerir os principais resíduos de aminoácidos capazes de interagir com cada ligante estudado nos complexos ASH/UTS, ASH/DFTS e ASH/TFTS, foram realizados cálculos de docagem molecular. Os resultados obtidos (Figura. 62) mostram a docagem para cada ligante. De acordo com os cálculos, para o derivado da tiossemicarbazona UTS interage por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Leu-480 e Arg-484, (Figura 63a), o oxigênio peptídico O=C do resíduo Leu-480 interage com os dois grupos amino como aceptor potencial para ligação de hidrogênio, com distâncias de 2,00 e 2,10 Å. Além disso, existe uma ligação de hidrogênio entre o hidrogênio NH peptídico do resíduo Arg-484 com o nitrogênio do grupo amina, separados por 2,50 Å. O resíduo do fluoróforo Trp-214 interage via empilhamento-T com o anel aromático do ligante, com uma distância de 3,90 Å. Enquanto o UTS interage conforme descrito, o derivado difluorado de tiossemicarbazona DFTS interage com diferentes resíduos de aminoácidos dentro da cavidade da proteína; no entanto, interações de hidrogênio e interações hidrofóbicas ainda são as principais forças de



interação neste sistema, envolvendo ASH e o derivado de tiossemicarbazona (Figura 62b). Um dos átomos de hidrogênio do grupo tiossemicarbazida na estrutura do DFTS está ligado ao grupo indol do resíduo fluoróforo Trp-214 com uma distância de 2,50 Å. Os resíduos Glu-449 e Ser-453 são receptores e doadores potenciais para interações de hidrogênio, respectivamente. O grupo carboxila do resíduo Glu-449 interage com um dos átomos de hidrogênio do grupo ligante amina a uma distância de 3,70 Å e o átomo de hidrogênio do grupo hidroxila Ser-453 interage com um dos átomos de nitrogênio do grupo tiossemicarbazida a uma distância de 3,70 Å. Finalmente, uma interação hidrofóbica via empilhamento- $\pi$  também é sugerida pelos resultados de docagem molecular, entre o resíduo Phe-210 com o anel aromático da estrutura DFTS. O derivado da tiossemicarbazona trifluorada (TFTS) interage de maneira muito semelhante ao DFTS, exceto pelo resíduo Glu-449 (Figura 63c). O átomo de hidrogênio de dois grupos amina diferentes da tiossemicarbazona é um doador potencial para ligação de hidrogênio com o resíduo Trp-214 e Ser-453, com distâncias de 2,30 e 3,50 Å, respectivamente. O resíduo Phe-210 interage via empilhamento- $\pi$  com o anel aromático do ligante em uma distância de 2,60 Å.

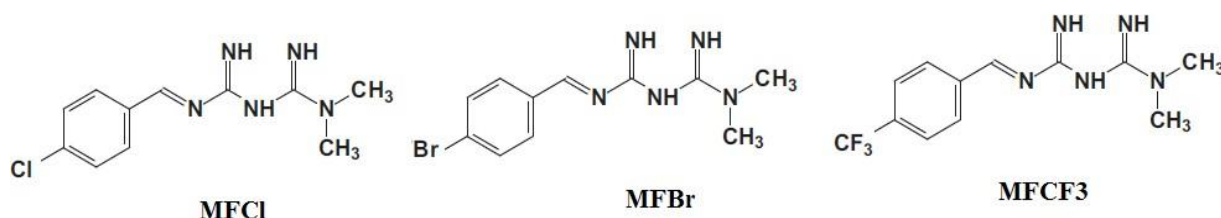
Em resumo, para as interações ASH/UTS; ASH/DFTS e ASH/TFTS, as forças intermoleculares que atuam nestes sistemas, descritas por docagem molecular, estão de acordo com as apontadas pelos parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ ). Derivados di e trifluorados interagem com (quase) os mesmos resíduos de aminoácidos, apesar da interação UTS com diferentes aminoácidos, sugerindo uma explicação plausível para a maior diferença nos valores de  $\Delta H^\circ$  entre derivados não fluorados e fluorados, em comparação com a menor diferença nos valores de  $\Delta H^\circ$  entre DFTS e TFTS.



**Figura 63.** Superposição da melhor pose de docagem para a) ASH/UTS, b) ASH/DFTS e c) ASH/TFTS no sítio I de Sudlow, obtido pelo programa GOLD 5.2 (função ChemPLP). A estrutura dos ligantes está representada em rosa, a cor verde é a estrutura ASH (PDB: 1N5U), os resíduos de aminoácidos selecionados estão em amarelo, o hidrogênio: branco; oxigênio: vermelho; nitrogênio: azul e enxofre: amarelo mostarda.

### 5.3 Os derivados de Metformina MFC, MFBr e MFCF3

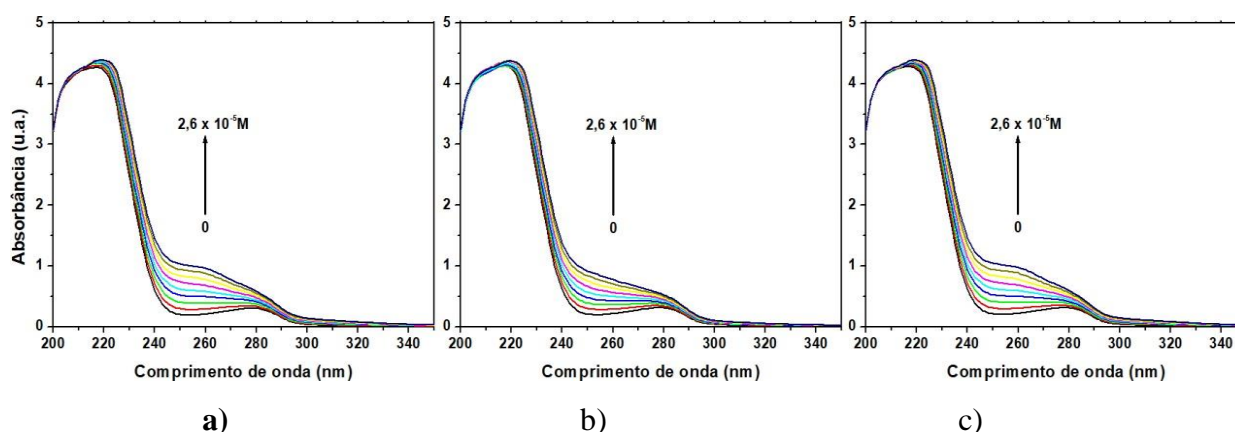
Neste tópico estão apresentados estudos acerca da interação-entre ASH com os três potenciais compostos bioativos derivados da metformina N'-[(E)-(4-clorofenil)metileno]-N,N-dimetiltriimido-dicarbônico diamida (**MFCI**), N'-[(E)-(4-bromofenil)metileno]-N,N-dimetiltriimidodicarbônico diamida (**MFBr**) e N'-[(E)-(4-(trifluorometilfenil)metileno)-N,N-dimetiltriimidodicarbônico diamida (**MFCF3**) (Figura 64) em condições fisiológicas pelas técnicas espectroscópicas UV-Vis, dicroísmo circular, fluorescência no estado estacionário (nas temperaturas de 305, 310 e 315 K) e com resolução temporal, fluorescência síncrona e cálculos teóricos (docagem molecular). [Chaves 2019]



**Figura 64.** Estrutura para os compostos derivados da metformina MFCI, MFBr e MFCF3 usados nos estudos de interação com ASH.

#### 5.3.1 Estudos de espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis) para ASH em presença dos derivados da metformina

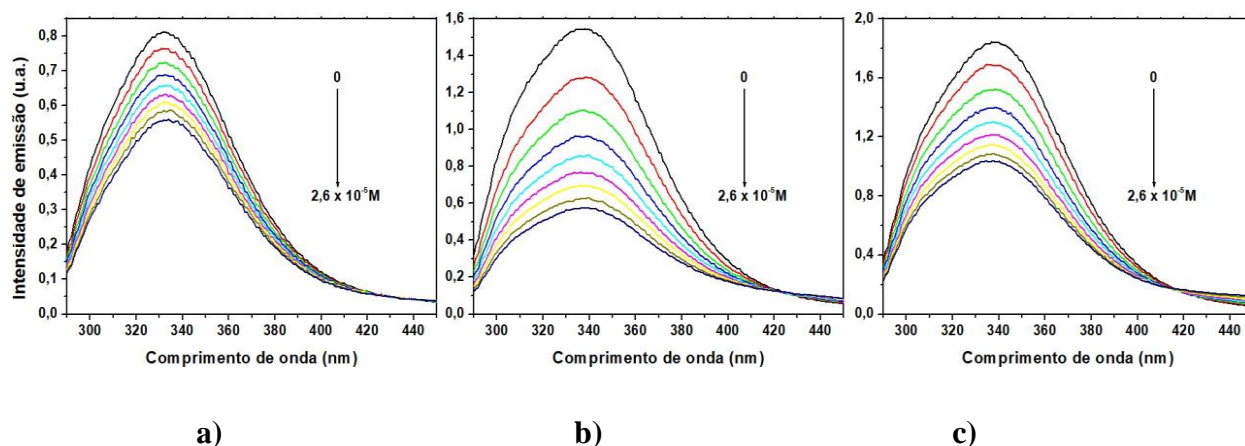
O processo de interação no estado fundamental entre os derivados da metformina MFCI, MFBr e MFCF3 com a ASH foi investigado empregando-se espectros de absorção na região do UV-Vis (200 nm a 350 nm). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 65.



**Figura 65.** Espectros de absorção no UV-Vis para uma solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de derivados da metformina: **a)** MFCI, **b)** MFBr e **c)** MFCF3.  $[\text{ASH}] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$  e  $[\text{MFCI}] = [\text{MFBr}] = [\text{MFCF}_3] = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 \text{ e } 2,60 \times 10^{-5} \text{ M}$  a  $T = 310 \text{ K}$ .

### 5.3.2 Estudo de supressão de fluorescência para ASH em presença dos derivados da metformina

Os resultados dos estudos de supressão de fluorescência da ASH pelos compostos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFClF3, em solução de tampão de fosfato (pH= 7,4) na temperatura de 310 K estão apresentados na Figura 66.

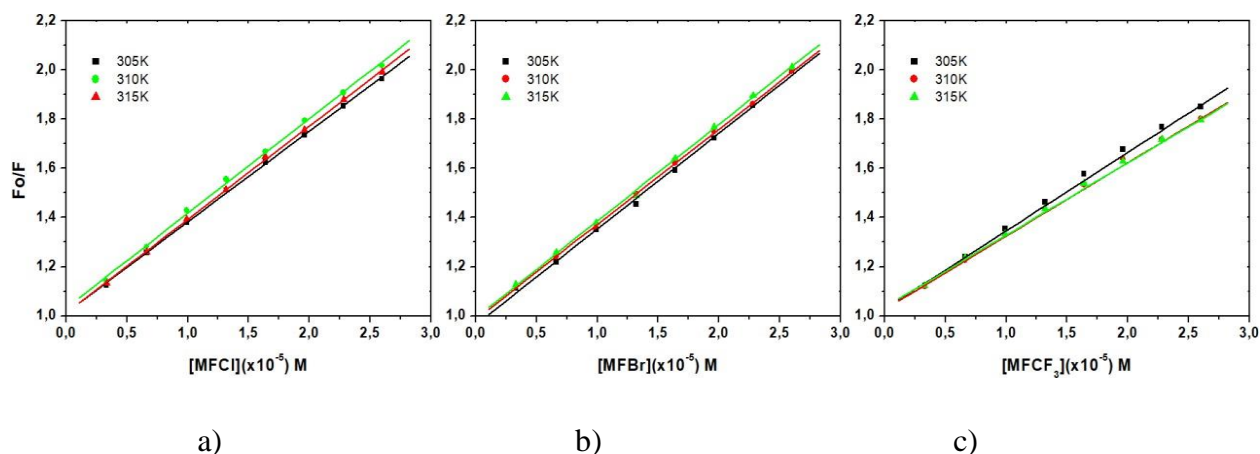


**Figura 66.** Espectros de supressão da emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para uma solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações das metforminas **a)** MFCl, **b)** MFBr e **c)** MFClF3. [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M e [MFCl] = [MFBr] = [MFClF3] = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e  $2,60 \times 10^{-5}$  M, a T = 310 K

Nesses estudos, observou-se que a emissão de fluorescência da ASH foi suprimida pela adição de alíquotas sucessivas dos derivados da metformina. A partir de adições sucessivas dos compostos MFCl, MFBr e MFClF3 ocorreram diminuição gradativa na intensidade de emissão de fluorescência de ASH (Figura 66), fato este que sugere uma interação entre os compostos MFCl, MFBr e MFClF3 e a ASH, e que os derivados da metformina MFCl, MFBr e MFClF3, estão localizadas em um sítio de interação que está próximo ao resíduo de triptofano contido na estrutura da albumina [Wei, 2006; Cheng, 2009]. Com o aumento das concentrações de MFCl, MFBr e MFClF3 na solução de ASH não foi observado um deslocamento na banda de emissão de fluorescência da ASH, sugerindo que o fluoróforo presente na ASH (Trp214), após a adição dos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFClF3 encontra-se em um ambiente semelhante daquele anterior à adição dos supressores, ou seja, na ASH pura (livre) [He, 2006; Cui, 2007; Zhang, 2008; Yue, 2008; Li, 2008, 2009].

Os gráficos de Stern-Volmer correspondentes à supressão de fluorescência do resíduo de triptofano da ASH pelos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFClF3, a diferentes

temperaturas (305 K, 310 K e 315 K), estão mostrados na Figura 67. Os valores de  $K_{SV}$  e  $k_q$  para os estudos da interação dos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFClF3 com ASH vão apresentados na Tabela 18. Os valores para  $k_q$  obtidos demonstram que o mecanismo mais provável para o processo de supressão da fluorescência de ASH pela interação com os derivados da metformina MFCl, MFBr e MFClF3 é estático, em função dos altos valores encontrados para as constantes de velocidade de supressão pelas metforminas ( $k_q = x 10^{12}$  a  $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), e sua pouca dependência com a temperatura (Tabela 18). Os valores para  $k_q$  encontrados nesse estudo são três ordens de grandeza mais altos do que a constante de velocidade de difusão ( $k_{diff} \approx 5,00 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a 298 K) [Brune, 1993], indicando a formação de uma pré-associação entre os derivados da metformina/ASH. Os valores obtidos para  $K_{SV}$  ( $10^4$  a  $10^5 \text{ M}^{-1}$ ) e para  $k_q$  ( $10^{12}$  a  $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) foram semelhantes aos descritos na literatura para outras moléculas. [He, 2005; Xie, 2005; Kandagal, 2006; Li, 2007, 2009; Cui, 2008; Zhang, 2008]

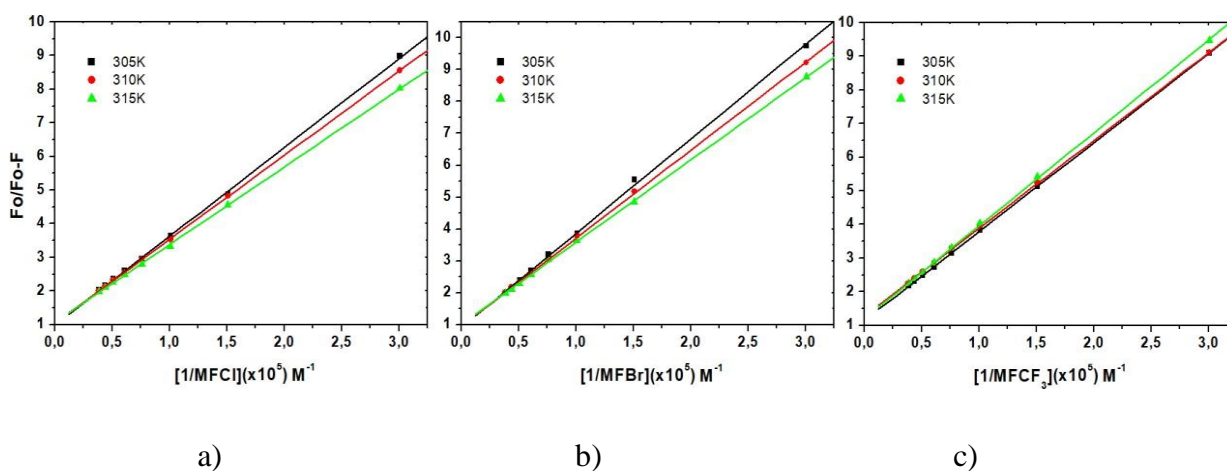


**Figura 67.** Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados da metformina: **a)** MFCl, **b)** MFBr e **c)** MFClF3.

**Tabela 18.** Valores para  $K_{SV}$  e  $k_q$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados da metformina MFCl, MFBr e MF3CF em diferentes temperaturas (305 K, 310 K e 315 K).

T (K)	305		310		315	
composto	$K_{SV}$ ( $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ )	$k_q$ ( $\times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$K_{SV}$ ( $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ )	$k_q$ ( $\times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$K_{SV}$ ( $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ )	$k_q$ ( $\times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
MFCl	$3,69 \pm 0,04$	$6,00 \pm 0,10$	$3,80 \pm 0,07$	$6,18 \pm 0,09$	$3,85 \pm 0,03$	$6,26 \pm 0,05$
MFBr	$3,90 \pm 0,08$	$6,34 \pm 0,08$	$3,90 \pm 0,05$	$6,34 \pm 0,07$	$3,93 \pm 0,06$	$6,39 \pm 0,05$
MF3CF	$3,19 \pm 0,04$	$5,19 \pm 0,06$	$3,00 \pm 0,03$	$4,88 \pm 0,05$	$2,94 \pm 0,04$	$4,78 \pm 0,02$

As constantes de supressão efetivas para as metforminas, ou constantes de interação de Stern-Volmer modificadas ( $K_a$ ), foram obtidas a partir da construção de gráficos de Stern-Volmer modificados (Equação 30), [Lakowicz, 2006] conforme mostrado na Figura 68 para os derivados da metformina MFCl, MFBr e MF3CF.



**Figura 68.** Gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados da metformina: **a)** MFCl, **b)** MFBr e **c)** MF3CF.

Os valores de  $K_a$  encontrados para a interação metformina/ASH estão todos na faixa entre ( $K_a \cong 10^5$  a  $10^6 \text{ M}^{-1}$ ) (Tabela 19), apresentando em todos os casos boas correlações lineares (Tabela 20), o que deixa claro que os derivados da metformina MFCl, MFBr e MF3CF interagem fortemente a ASH, pois os valores de  $K_a$  foram semelhantes ao da literatura para outras moléculas que apresentam interação moderada entre as moléculas bioativas e albumina ( $K_a \cong 10^4$  a  $10^5 \text{ M}^{-1}$ ). [He, 2005; Tang, 2006; Li, 2007, 2009; Zhang, 2008]

**Tabela 19.** Valores para  $K_a$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados da metformina MFCl, MFBr e MF3CF nas temperaturas de 305, 310 e 315 K.

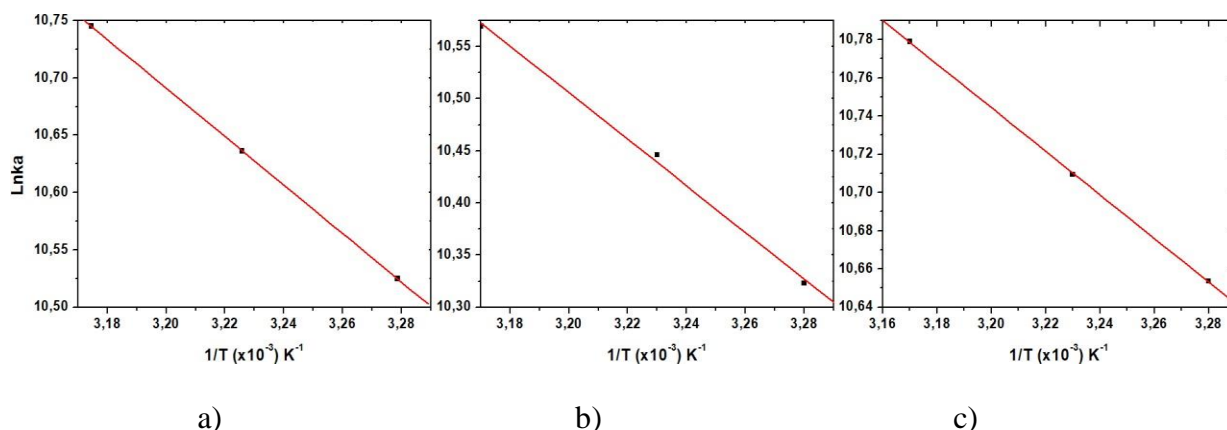
T (K)	305	310	315
Composto	$K_a$ ( $\times 10^5$ M <sup>-1</sup> )	$K_a$ ( $\times 10^5$ M <sup>-1</sup> )	$K_a$ ( $\times 10^5$ M <sup>-1</sup> )
MFCl	$3,72 \pm 0,05$	$4,16 \pm 0,02$	$4,64 \pm 0,03$
MFBr	$6,62 \pm 0,01$	$4,95 \pm 0,01$	$3,94 \pm 0,01$
MF3CF	$1,47 \pm 0,02$	$1,16 \pm 0,03$	$1,82 \pm 0,04$

**Tabela 20.** Valores estatísticos obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados pela supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados da metformina MFCl, MFBr e MF3CF

Valores estatísticos					
Composto	Temperatura (K)	<i>R</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>P</i>
MFCl	305	0,9998	0,8590	8	<0.0001
	310	0,9981	0,2126	8	<0.0001
	315	0,9983	0,1497	8	<0.0001
MFBr	305	0,9996	0,0818	8	<0.0001
	310	0,9997	0,0512	8	<0.0001
	315	0,9938	0,2435	8	<0.0001
MF3CF	305	0,9999	0,0179	8	<0.0001
	310	0,9998	0,0508	8	<0.0001
	315	0,9998	0,0387	8	<0.0001

Através dos valores de  $K_a$  encontrados para a supressão de ASH foram construídos gráficos de van't Hoff empregando-se a equação 39, [Lakowicz, 2006] os quais estão apresentados na figura 69 para os derivados da metformina: MFCl, MFBr e MF3CF. A partir destes gráficos foram obtidos os parâmetros termodinâmicos de variação de entalpia  $\Delta H^\circ$  e de entropia  $\Delta S^\circ$  envolvidos no processo de supressão da fluorescência da ASH, os quais permitiram o cálculo do valor da variação de energia livre de Gibbs  $\Delta G^\circ$  (Tabela 21).





**Figura 69.** Gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) pelos derivados da metformina: a) MFCl, b) MFBr e c) MFCF3.

**Tabela 21.** Valores para os parâmetros termodinâmicos  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  e  $\Delta G^\circ$  obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) pelos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFCF3.

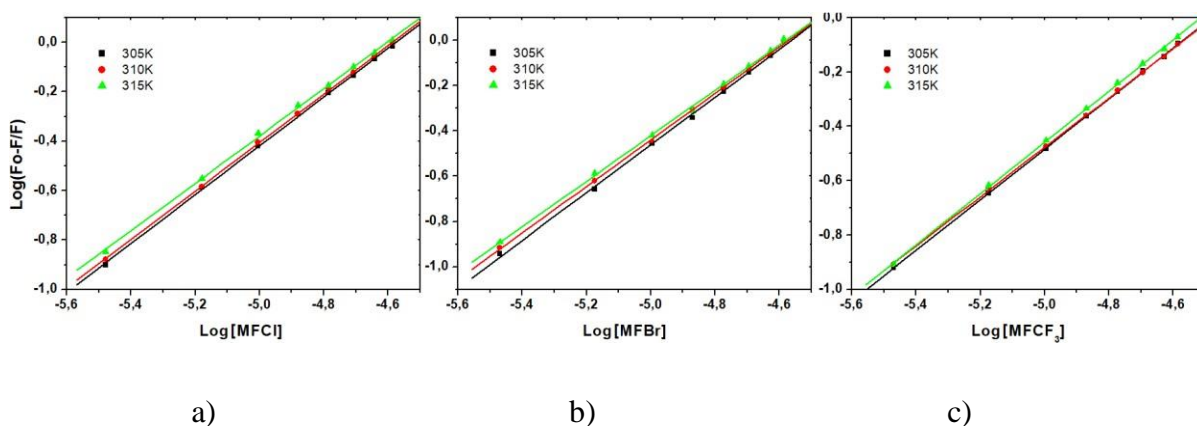
Composto	T (K)	$\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta S^\circ$ (J/mol.K)	$\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	$R^2$
MFCl	305	$17,58 \pm 0,05$	$0,145 \pm 0,010$	-26,7	0,9999
	310			-27,4	
	315			-28,1	
MFBr	305	$18,56 \pm 0,09$	$0,147 \pm 0,005$	-26,2	0,9986
	310			-26,9	
	315			-27,7	
MFCF3	305	$9,48 \pm 0,04$	$0,120 \pm 0,004$	-27,0	0,9999
	310			-27,6	
	310			-28,2	

Os valores de  $\Delta H^\circ$  positivos encontrados em todos os casos estudados para as metforminas, indicam que o processo de interação metforminas/ASH foi endotérmico (Tabela 21). Os valores de  $\Delta S^\circ$  positivos evidenciaram que o tipo de interação entre as metforminas/ASH possui caráter hidrofóbico, e os valores de  $\Delta G^\circ$  negativos ( $\Delta G^\circ = -28$  a  $-26 \text{ kJ/mol}$ ) demonstraram a espontaneidade da interação dos derivados da metforminas/ASH (Tabela 21).

De acordo com a teoria de Ross e Subramanian [Ross, 1981],  $\Delta H^\circ > 0$  e  $\Delta S^\circ > 0$  podem refletir associação predominantemente hidrofóbica, mas neste caso referindo-se à retirada parcial do grupo apolar da água e não a qualquer outra interação entre os próprios grupos apolares. (Tabela 21)

Os resultados dos estudos de supressão da fluorescência no estado estacionário descritos acima mostram claramente que a formação de uma espécie hidrofobicamente associada entre os derivados da metformina/ASH pode afetar o ambiente químico em torno do resíduo de triptofano (Trp-214) presente na estrutura da albumina.

Para uma supressão estática, os sítios de interação são independentes dos sítios equivalentes na macromolécula. Valores de constantes de interação ( $K_b$ ) e de números de sítios de interação ( $n$ ) foram obtidos a partir da construção de gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  (Equação 33), como mostrados na figura 70. [Lakowicz, 2006] De acordo com os resultados mostrados na Tabela 22, o número de sítios de interação entre a ASH e os derivados da metformina MFCl, MFBr e MFCF<sub>3</sub> é aproximadamente igual a 1 (um). Isso indica que existe somente uma interação molecular entre os derivados da metformina MFCl, MFBr e MFCF<sub>3</sub> e uma molécula de ASH.



**Figura 70.** Gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados da metformina: **a)** MFCl, **b)** MFBr e **c)** MFCF<sub>3</sub>.

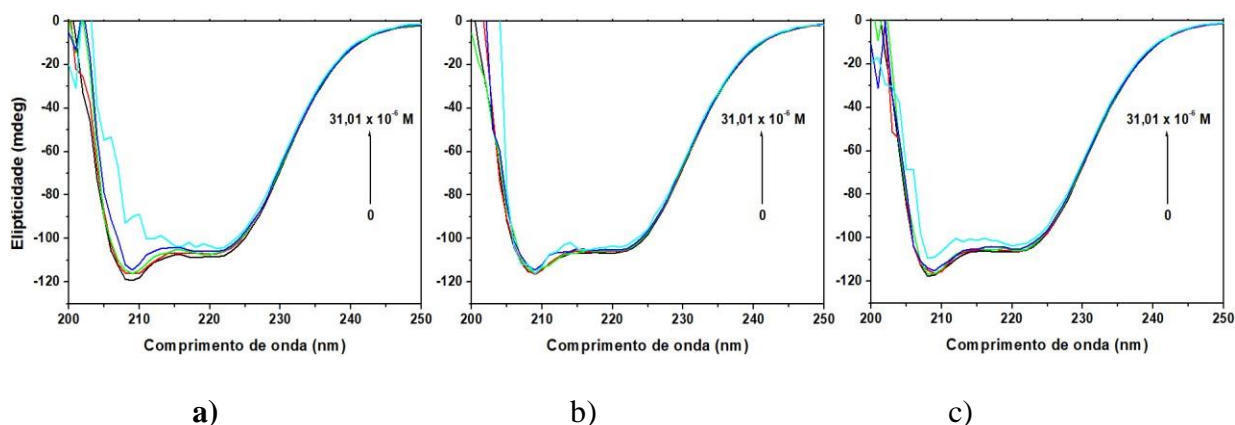


**Tabela 22.** Valores de número constante de interação ( $n$  e  $K_b$ ) obtidos a partir dos gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFCF3.

Composto	T (K)	$n$	$K_b(\times 10^4 M^{-1})$	$R^2$	SD
MFCl	305	$0,99 \pm 0,10$	$3,34 \pm 0,05$	0,9972	0,0076
	310	$0,98 \pm 0,09$	$3,16 \pm 0,02$	0,9999	0,0046
	315	$0,96 \pm 0,05$	$2,53 \pm 0,02$	0,9995	0,0096
MFBr	305	$1,06 \pm 0,08$	$3,04 \pm 0,08$	0,9991	0,0146
	310	$1,03 \pm 0,07$	$3,44 \pm 0,04$	0,9997	0,0076
	315	$1,00 \pm 0,05$	$3,89 \pm 0,04$	0,9995	0,0106
MFCF3	305	$0,93 \pm 0,06$	$4,23 \pm 0,02$	0,9996	0,0039
	310	$0,91 \pm 0,05$	$4,48 \pm 0,05$	0,9999	0,0051
	315	$0,94 \pm 0,02$	$4,90 \pm 0,04$	0,9998	0,0059

### 5.3.3 Estudos de espectroscopia de dicroísmo circular (DC) para ASH em presença dos derivados da metformina

Os estudos de dicroísmo circular (DC) foram obtidos para avaliar a mudança estrutural de ASH promovida pela adição dos derivados da metformina: MFCl, MFBr e MFCF3. Os espectros de dicroísmo circular obtidos para ASH na ausência e na presença dos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFCF3, na temperatura de  $T = 310$  K, estão apresentados na figura 71. Os espectros de DC para ASH e dos derivados da metforminas/ASH (Figuras 70) foram semelhantes quanto ao formato, somente apresentando variações de intensidade das bandas, o que significa que a estrutura de ASH foi muito pouco afetada. [Yue, 2008] Nestes estudos, foi observado que a adição de alíquotas dos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFCF3 à albumina sérica humana influenciou na sua elipticidade, sendo que esta interação resultou na diminuição da intensidade de ambas as bandas (208 e 222 nm), sugerindo a ocorrência de pequenas mudanças na estrutura secundária da proteína, o que pode ser indicativo da formação de complexos entre ASH e os derivados da metformina MFCl, MFBr e MFCF3.



**Figura 71.** Espectros de dicroísmo circular para ASH em solução tampão de PBS (pH = 7,4) e ASH/derivados de metformina: **a)** MFCl, **b)** MFBr e **c)** MF<sub>3</sub>, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:MFCl, ASH:MFBr e ASH:MF<sub>3</sub>. [ASH] =  $1,00 \times 10^{-6} \text{ M}$  e [MFCl] = [MFBr] = [MF<sub>3</sub>] = 0; 3,98; 7,94; 15,75 e  $31,01 \times 10^{-6} \text{ M}$ , a T = 310 K.

Estimativas acerca da % de hélice- $\alpha$  para a estrutura secundária de ASH na ausência e na presença dos derivados da metformina MFCl, MFBr e MF<sub>3</sub> foram feitas usando as equações 8 e 9. [Chen, 1972] Os valores experimentais de elipticidade ( $\theta$ ) foram lidos nos comprimentos de onda de (208 e 222 nm), e foram utilizados para calcular a elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual (*MRE*), especificamente *MRE*<sub>208</sub> e *MRE*<sub>222</sub> (Equação 8). Posteriormente, os valores de *MRE*<sub>208</sub> e *MRE*<sub>222</sub> foram substituídos na equação 9 para calcular os valores de percentual de hélice- $\alpha$  na estrutura secundária da ASH (Tabela 23).

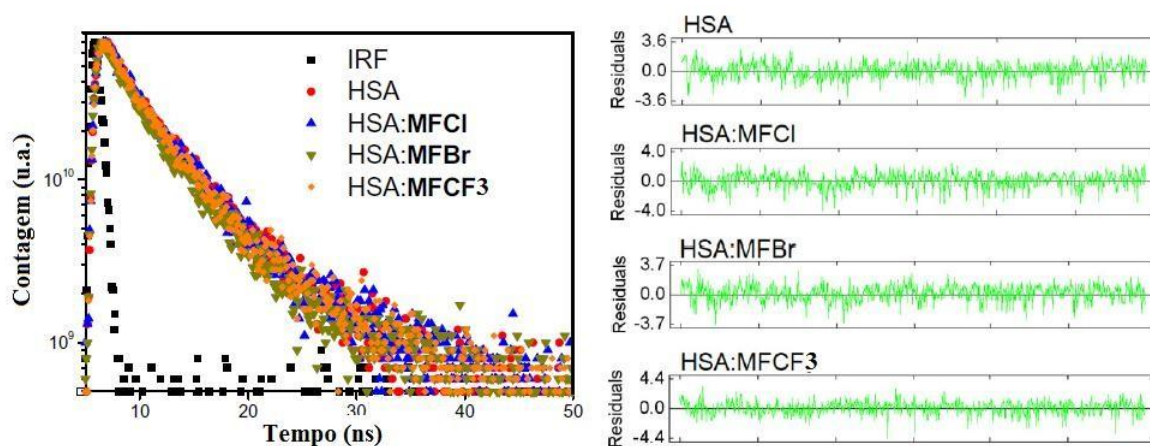
**Tabela 23.** Porcentagem de hélice- $\alpha$  calculada a 208 nm e em 222 nm para ASH em solução tampão de PBS (pH = 7,4) na presença dos derivados de metformina MFCl, MFBr e MF3CF na temperatura de 310 K. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:MFCl, ASH:MFBr e ASH:MF3CF. [ASH] =  $1,00 \times 10^{-6}$  M e [MFCl] = [MFBr] = [MF3CF] = 0; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01  $\times 10^{-6}$  M.

Composto	ASH:Q	(% hélice- $\alpha$ )	(% hélice- $\alpha$ )
		208 nm	222 nm
MFCl	1:0	56,5	53,9
	1:4	56,3	53,3
	1:8	54,1	53,3
	1:16	49,9	52,6
	1:32	41,6	51,9
MFBr	1:0	54,1	51,9
	1:4	53,9	51,6
	1:8	53,3	51,5
	1:16	52,6	51,4
	1:32	52,2	50,4
MF3CF	1:0	55,5	51,9
	1:4	54,1	51,7
	1:8	55,0	51,6
	1:16	53,3	51,1
	1:32	50,7	50,1

Os resultados obtidos para a variação do % hélice- $\alpha$  da estrutura secundária da proteína ASH mostrados na Tabela 23 apresentam uma diminuição com a adição dos derivados da metformina: MFCl, MFBr e MF3CF (nas razões molares de ASH/metforminas de 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), quando comparados com os resultados na sua ausência (ASH/metforminas na proporção 1:0), indicando que houve interação dos derivados da metformina MFCl, MFBr e MF3CF com os resíduos de aminoácidos da cadeia principal polipeptídica de ASH e que houve uma diminuição da rede de ligações hidrogênio. [Kang, 2004; Shaikh, 2007; Yue, 2008; Cheng, 2009] Esta justificativa é compatível com as possíveis mudanças espectrais obtidas pela observação dos espectros de UV-Vis e de emissão de fluorescência.

### 5.3.4 Estudos da supressão de fluorescência resolvida no tempo para ASH em presença dos derivados da metformina

Os resultados dos estudos de decaimento de emissão de fluorescência com resolução temporal para ASH livre e complexada com os derivados de metformina MFCl, MFBr e MFClF3 estão mostrados na figura 72. Os valores de  $\tau_1$  e  $\tau_2$  (Tabela 24) encontrados para ASH na presença dos compostos MFCl, MFBr e MFClF3 apresentaram uma variação dentro do erro experimental quando comparados àqueles para ASH pura, o que leva a considerar um processo estático para a supressão de fluorescência da proteína pelas espécies supressoras MFCl, MFBr e MFClF3.



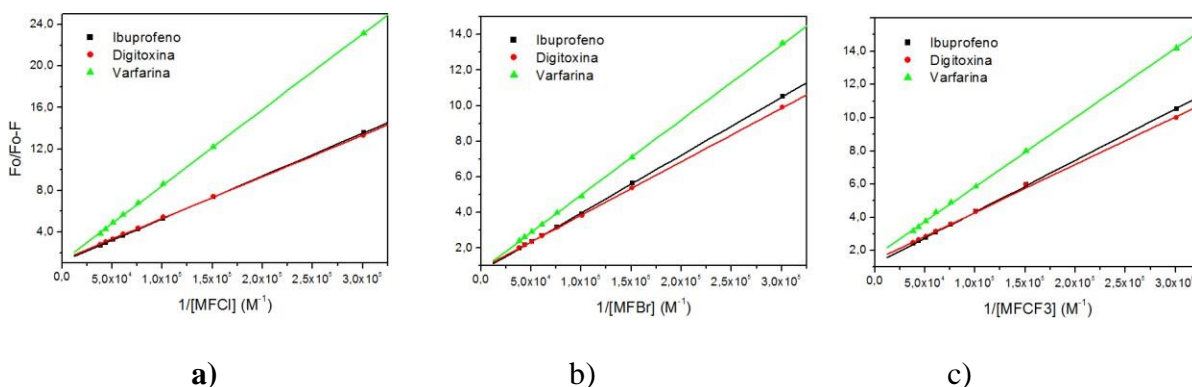
**Figura 72.** Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações dos derivados da metformina: MFCl, MFBr e MFClF3 ( $[\text{ASH}] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$  e  $[\text{MFCl}] = [\text{MFBr}] = [\text{MFClF}_3] = 2,6 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) a  $T = 310 \text{ K}$ . O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento).

**Tabela 24.** Valores de tempo de vida  $\tau_1$  e  $\tau_2$  (em ns) para ASH ( $[ASH] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), com a adição de alíquotas dos derivados da metformina MFCl, MFBr e MFClF3 ( $[MFCl] = [MFBr] = [MFClF3] = 2,6 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) na temperatura de 310 K.

[Q]	$\tau_1$ (ns)	% relativa	$\tau_2$ (ns)	% relativa	$\chi^2$
ASH	$1.80 \pm 0.19$	26,5	$6.15 \pm 0.20$	73,5	1.085
ASH:MFCl	$1.74 \pm 0.15$	26,1	$6.11 \pm 0.18$	73,9	1.090
ASH:MFBr	$1.71 \pm 0.17$	26,0	$6.09 \pm 0.15$	74,0	1.058
ASH:MFClF3	$1.68 \pm 0.15$	25,9	$6.08 \pm 0.16$	74,1	1.065

### 5.3.5 Estudos de interação competitiva para ASH em presença dos derivados da metformina

A fim de identificar os sítios de interação de MFCl, MFBr e MFClF3 em ASH, foram realizados experimentos competitivos com os marcadores de sítio varfarina, ibuprofeno e digitoxina. A constante de interação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ), na presença da sonda para cada sítio, foi calculada na temperatura de 310 K e os resultados estão listados na Tabela 25 e representados na figura 73 para os derivados da metformina MFCl, MFBr e MFClF3. Na presença de varfarina, os valores de  $K_a$  mudaram significativamente, isto é,  $\sim 49,1\%$  para MFCl,  $48,6\%$  para MFBr e  $47,7\%$  para MFClF3 enquanto a influência de ibuprofeno e digitoxina nos parâmetros de interação é menos significativa. Esses resultados indicam uma competição entre a varfarina e os derivados da metformina MFCl, MFBr e MFClF3 para o mesmo sítio de interação na ASH, indicando que os três compostos estudados interagem preferencialmente no sítio I (subdomínio IIA) da ASH, onde o resíduo Trp-214 pode ser encontrado.



**Figura 73.** Gráficos de Stern-Volmer modificado para as interações: **a)** ASH:MFCl, **b)** ASH:MFBr e **c)** ASH:MFClF3 na presença de marcadores de sítio varfarina, digitoxina e ibuprofeno a 310 K e solução tampão de PBS (pH = 7,4).  $[ASH] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[MFCl] = [MFBr] = [MFClF3] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$  e  $2,60 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

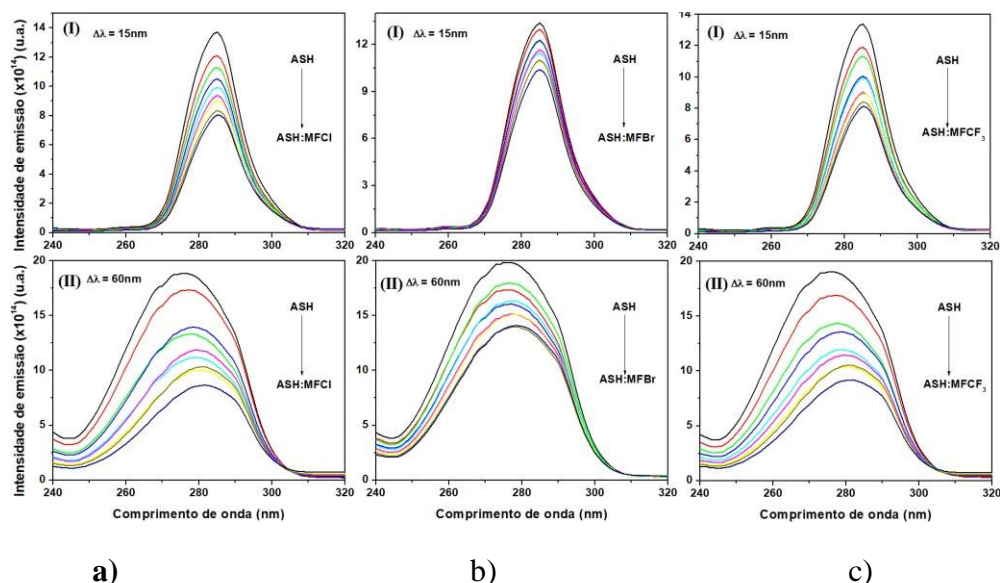
**Tabela 25.** Valores para a constante de interação a partir do Stern-Volmer modificado ( $K_a$ ) para a interação de MFCl, MFBr e MF3CF com ASH na presença de três marcadores de sítio diferentes: varfarina, digitoxina e ibuprofeno, na temperatura de 310 K.

Composto.	Marcador	Sítio	$K_a(\times 10^4 \text{ M}^{-1})$	% mudança	$R^2$
<b>MFCl</b>	Varfarina	I	$1,61 \pm 0,08$	49,1	0,9998
	Ibuprofeno	II	$2,79 \pm 0,03$	4,5	0,9985
	Digitoxina	III	$3,01 \pm 0,01$	11,7	0,9987
<b>MFBr</b>	Varfarina	I	$2,30 \pm 0,03$	48,6	0,9986
	Ibuprofeno	II	$3,01 \pm 0,02$	27,4	0,9975
	Digitoxina	III	$3,25 \pm 0,02$	32,8	0,9991
<b>MF3CF</b>	Varfarina	I	$2,34 \pm 0,04$	47,7	0,9991
	Ibuprofeno	II	$3,81 \pm 0,01$	8,9	0,9986
	Digitoxina	III	$4,08 \pm 0,04$	14,9	0,9992

### 5.3.6 Estudo de supressão de fluorescência síncrona para ASH em presença dos derivados da metformina

Os espectros de fluorescência síncrona (**SFS**) podem fornecer informações sobre o ambiente molecular na vizinhança de cromóforos internos de proteínas por meio da varredura simultânea dos monocromadores de excitação e emissão, mantendo um intervalo de comprimento de onda constante ( $\Delta\lambda$ ) entre eles. [Sun, 2016] É bem conhecido que quando  $\Delta\lambda$  é fixado em 15 nm ou 60 nm, o SFS fornecerá informações características sobre os resíduos de tirosina e triptofano, respectivamente [Chaves, 2017].

Os resultados para os estudos da adição dos derivados da metformina MFCl, MFBr ou MF3CF a uma solução de ASH não altera o máximo de emissão de fluorescência, correspondente ao resíduo Tyr ( $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ ) (Figuras 74a-c (I)). Por outro lado, um claro desvio para o vermelho de cerca de 5 nm pode ser observado nos espectros de fluorescência síncrona para  $\Delta\lambda = 60\text{nm}$  em todos os derivados da metformina MFCl, MFBr ou MF3CF (Figuras 74a-c (II)). Esses dados estão de acordo com os espectros de UV para a interação derivados de metformina/ASH (Figura 65), fornecendo a confirmação adicional de que a associação dos derivados de metformina/ASH resulta em uma alteração na hidrofobicidade em torno do resíduo Trp-214 desta proteína.



**Figura 74.** Espectros de fluorescência síncrona para ASH na ausência e na presença de **a)** MFC1, **b)** MFBr e **c)** MFCF3 com **(I)**  $\Delta\lambda = 15$  nm para Tyr e **(II)**  $\Delta\lambda = 60$  nm para Trp.  $[ASH] = 1,00 \times 10^{-5}$  M,  $[MFC1] = [MFBr] = [MFCF3] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$  e  $2,60 \times 10^{-5}$  M e pH= 7,4 a temperatura ambiente.

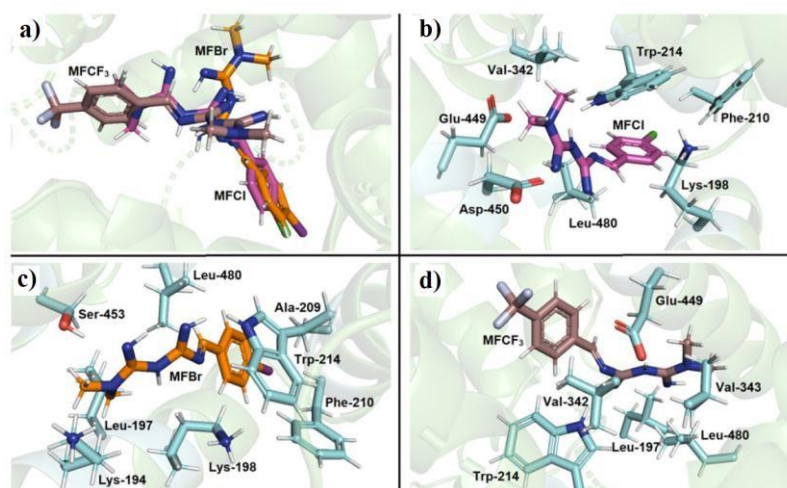
### 5.3.7 Estudos teórico de docagem molecular para ASH em presença dos derivados dametformina

Essencialmente, o objetivo da docagem molecular é fornecer uma previsão do complexo ligante-receptor usando métodos de computação. Pode ser obtida por meio de duas etapas inter-relacionadas: primeiro, por amostragem de conformações do ligante no sítio ativo da proteína; em seguida, classificando essas conformações por meio de algoritmos de amostragem (função de pontuação). [Pathak, 2017; Sharma, 2017] Para oferecer uma visão atômica da interação entre ASH/MFC1, ASH/MFBr e ASH/MFCF3, bem como explorar os principais resíduos de aminoácidos e as forças moleculares envolvidas neste processo, foram realizados cálculos de docagem molecular. De acordo com os dados experimentais descritos acima, o sítio I é o principal sítio de interação para cada composto em estudo. Assim, os cálculos de docagem molecular foram realizados apenas para o sítio I. A figura 75a mostra a superposição do melhor resultado de docagem, enquanto que as figuras 75b-d mostram os compostos MFC1, MFBr e MFCF3 interagindo individualmente com ASH. Os compostos MFC1 e MFBr apresentaram pose de docagem similar para a porção aromática, o que poderia explicar os valores termodinâmicos experimentais bastante semelhantes entre elas.

Diferentemente dos dados experimentais, os resultados da docagem molecular sugeriram, além das forças hidrofóbicas, interações de hidrogênio e interações de van der

Waals como as principais forças de interação envolvidas na capacidade de interação de cada derivado da metformina e ASH. Essa diferença pode ser explicada devido ao uso de diferentes aproximações: os dados experimentais usaram a teoria de Ross e Subramanian, [Ross 1981] que se baseia na termodinâmica da interação proteína-ligante, observando a influência das moléculas de água na associação hidrofóbica. Por outro lado, o cálculo da docagem molecular não utilizou moléculas de hidratação em sua aproximação.

A Tabela 26 mostra os principais resíduos de aminoácidos envolvidos na interação proteína-ligante. Como exemplo, o átomo de nitrogênio do grupo amino do MFCl é um aceptor potencial para ligação de hidrogênio com o resíduo do fluoróforo Trp-214, a uma distância de 2,50 Å, enquanto o oxigênio do resíduo Asp-450 é um aceptor potencial para ligação de hidrogênio com o átomo de hidrogênio do grupo amino do MFCl, a uma distância de 2,10 Å. Por outro lado, interações via forças hidrofóbicas foram detectadas entre o anel aromático do MFCl com os resíduos Phe-210 e Leu-480 em uma distância de 2,10 e 2,90 Å, respectivamente. Adicionalmente, o grupo metila presente na estrutura do ligante pode interagir via forças hidrofóbicas com o resíduo Val-342, em uma distância de 2,00 Å. Finalmente, as interações de van der Waals também são as principais forças de interação entre o MFCl e os resíduos de aminoácidos Lys-198 e Glu-449, a uma distância de 1,60 e 3,40 Å, respectivamente.



**Figura 75.** a) Superposição da melhor pose de docagem para cada amostra dentro do sítio I. (b, c e d) Melhor pose de docagem para ASH:MFCl, ASH:MFBr e ASH:MFCF3(função ChemPLP), respectivamente. (Lys198, Phe 210, Trp214, Val342, Glu442, Arg450, Ser453 e Leu480), MFCl, MFBr e MFCF3 são representados como bastões em ciano, rosa, laranja e marrom, respectivamente. Cor dos elementos: hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, flúor, cloro e bromo em branco, azul escuro, vermelho, azul claro, verde e roxo, respectivamente.



**Tabela 26.** Resíduos de aminoácidos que participam da interação ASH/derivados de metformin MFCl, MFBr e MF3CF no sítio I.

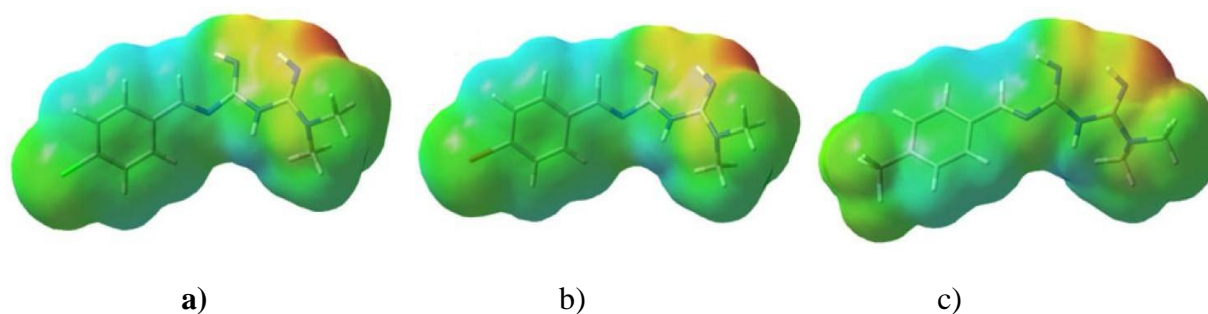
Composto	Am. ácido	Interação	Distância (Å)
<b>MFCl</b>	Lys-198	Van der Waals	1,60
	Phe-210	Hidrofóbica	2,10
	Trp-214	Interação hidrogênio	2,50
	Val-342	Hidrofóbica	2,00
	Glu-449	Van der Waals	3,40
	Asp-450	Interação hidrogênio	2,10
	Leu-480	Hidrofóbica	2,90
<b>MFBr</b>	Lys-194	Van der Waals	2,10
	Leu-197	Hidrofóbica	1,00
	Lys-198	Van der Waals	1,50
	Ala-209	Van der Waals	2,70
	Phe-210	Hidrofóbica	2,60
	Trp-214	Interação hidrogênio	2,10
	Ser-453	Interação hidrogênio	2,10
	Leu-480	Hidrofóbica	2,50
<b>MF3CF</b>	Leu-197	Van der Waals	3,40
	Trp-214	Interação hidrogênio	2,60
	Val-342	Hidrofóbica	3,00
	Val-343	Hidrofóbica	2,90
	Glu-449	Interação hidrogênio	2,30
	Leu-480	Van der Waals	2,80

### 5.3.8 Estudo teórico de cálculo químico quântico

O perfil de atividade desses compostos foi posteriormente investigado empregando cálculos de química quântica. O método de estrutura eletrônica (DFT) foi utilizado para calcular as especificidades geométricas das moléculas com especial ênfase para o mapeamento do potencial eletrostático molecular (Figura 76) e cálculos de orbitais moleculares de fronteira. Ambos os cálculos computacionais foram realizados usando a teoria do funcional da densidade com um modelo químico B3LYP/6-31G(d'). A ausência de frequência imaginária nas estruturas otimizadas é confirmada a partir de cálculos de frequência para garantir que as geometrias otimizadas estejam no mínimo local. Os potenciais eletrostáticos positivos e negativos são representados pelas cores: azul e vermelho

respectivamente, e a escala sobe na ordem de vermelho < laranja < amarelo < verde < azul (Figura 76).

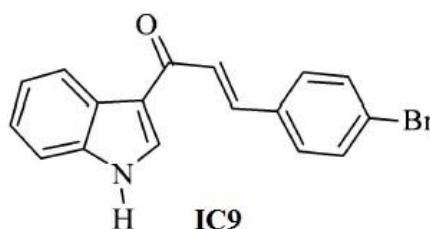
Os potenciais eletrostáticos negativos mais intensos estão localizados nos grupos imino para todos os três compostos, enquanto o potencial eletrostático positivo está localizado nos átomos de hidrogênio em N,N-dimetil e os sistemas fenil que podem ajudar nas interações hidrofóbicas. Qualitativamente, a natureza rica e deficiente de elétrons desses grupos funcionais pode criar um gradiente eletrônico que pode facilitar interações não covalentes que incluem diferentes tipos: interações por interações de hidrogênio, interações de van der Waals e contatos de empilhamento  $\pi$ - $\pi$ , tornando os compostos mais adequados para os sítios da ASH. A conjugação extensa do sistema fenila para a extremidade imino os tornará bons candidatos na interação e uma tendência semelhante foi observada na literatura. [Mathew, 2017] Os valores de entropia e momento de dipolo também sugerem a capacidade dessas moléculas em construir interações não covalentes (entropia: 138,57, 135,97 e 149,98, cal.mol<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup> para derivados MFBr, MFCl e MFCF3, respectivamente). A estabilidade dessas moléculas foi posteriormente confirmada por orbitais moleculares de fronteira. Assim, o intervalo de energia HOMO-LUMO para os derivados halogenados MFCl e MFBr é o mesmo (3,60 eV), enquanto para o derivado trifluorometil MFCF3 é ligeiramente reduzido (3,46 eV), porém todas os três derivados de metformina MFCl, MFBr e MFCF3 são razoavelmente estáveis.



**Figura 76.** Mapeamento do potencial eletrostático molecular para os derivados da metformina a) MFCl, b) MFBr e c) MFCF3.

## 5.4 O Derivado de Chalcona 4-bromoindolilchalcona (IC9)

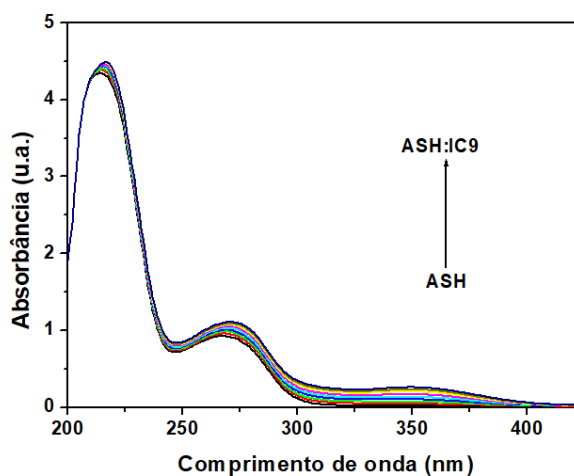
Neste tópico, foi estudada a interação entre ASH com um derivado análogo de chalcona, (2*E*)-3-(4-bromofenil)-1-(1*H*-indol-3-il) prop-2-en-1-ona (IC9) (Figura 77), um potente inibidor da monoamina oxidase B humana (MAO-B), em condições fisiológicas, por técnicas espectroscópicas UV-Vis, dicroísmo circular, fluorescência no estado estacionário e com resolução temporal, e-fluorescência síncrona nas temperaturas de (296 K, 303 K, 310 K e 317 K) e por cálculos teóricos (docagem molecular).



**Figura 77.** Estrutura para o derivado de chalcona 4-bromoindolilchalcona (IC9) usado no estudo da interação com ASH.

### 5.4.1 Estudos de espectroscopia na região do ultravioleta/visível (UV-Vis) para ASH em presença da 4-bromoindolilchalcona (IC9)

O processo de interação no estado fundamental entre a 4-bromoindolilchalcona e a ASH foi investigado empregando-se espectros de absorção na região do UV-Vis (200 nm a 450 nm). Os resultados obtidos estão apresentados na figura 78 para a 4-bromoindolilchalcona IC9.

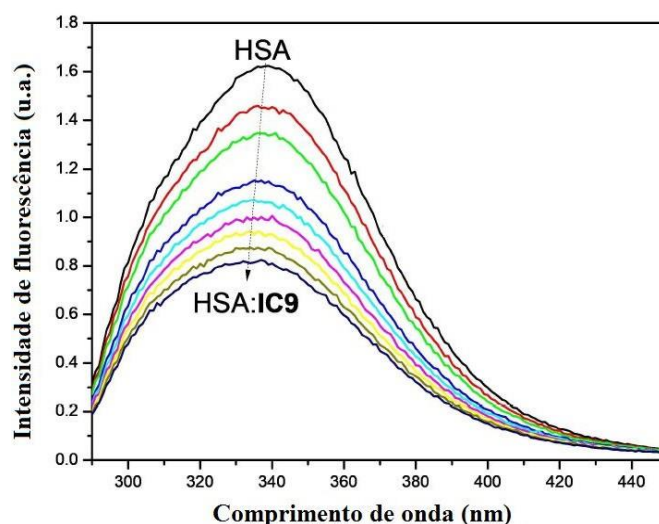


**Figura 78.** Espectros de absorção no UV-Vis para uma solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações da 4-bromoindolilchalcona (IC9) com [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M e [IC9] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e  $1,32 \times 10^{-5}$  M.

Os resultados destes estudos (Figura 78) mostram um aumento das bandas de absorção com o aumento da concentração de 4-bromoindolilchalcona, indicando a possível formação de uma associação no estado fundamental ASH/IC9. Esse efeito é acompanhado do deslocamento batocromico da banda de absorção em 280 nm referente à transição eletrônica ( $\pi\pi^*$ ) pertencente principalmente ao resíduo de triptofano, indicando que este se encontra em ambiente químico mais hidrofílico daquele que se encontrava antes da interação IC9/HSA. A absorção entre 300 e 400 nm (Figura 78) se deve à transição eletrônica do IC9.

#### 5.4.2 Estudo de supressão de fluorescência para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)

Os resultados dos estudos de supressão de fluorescência da ASH pela 4-bromoindolilchalcona IC9, em solução de tampão de fosfato (pH= 7,4) na temperatura de 310 K estão apresentados na figura 79.

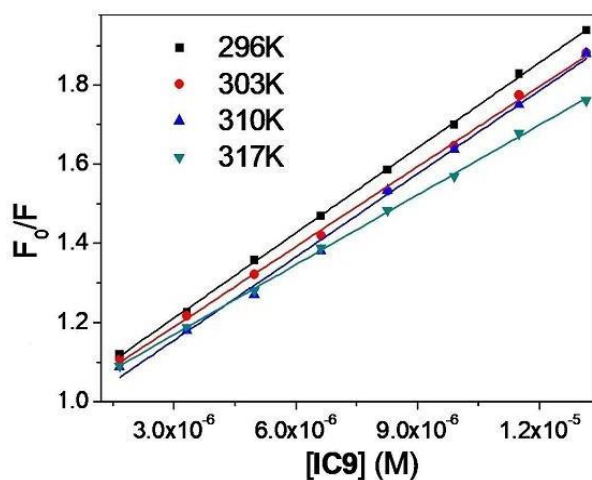


**Figura 79.** Espectros de supressão da emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para uma solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diferentes concentrações de 4-bromoindolilchalconas (IC9), [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M e [IC9] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e  $1,32 \times 10^{-5}$  M, a T = 310 K

A emissão de fluorescência em estado estacionário de ASH na ausência e presença de quantidades crescentes da 4-bromoindolilchalcona IC9 mostra uma supressão significativa após adição do ligante (Figura 79). Esses resultados indicam que o 4-bromoindolilchalcona IC9 provavelmente está ligado próximo ao resíduo Trp-214, localizado no subdomínio IIA da estrutura ASH. [Wang, 2008] Além disso, comprimento de onda da emissão máxima de

fluorescência mostra um deslocamento para o azul (de 340 a 335 nm) após a interação com o ligante, o que indica alguma perturbação tanto na polaridade do microambiente em torno do resíduo Trp-214 quanto na conformação da proteína. [Cheng, 2013]

Os gráficos de Stern-Volmer correspondentes à supressão de fluorescência do resíduo de triptofano da ASH pelo derivado análogo de chalcona IC9, a diferentes temperaturas (296 K, 303 K, 310 K e 317 K), estão mostrados na figura 80. Os valores de  $K_{SV}$  e  $k_q$  para os estudos da interação do derivado análogo de chalcona IC9 com ASH vão apresentados na Tabela 27. Os valores para  $k_q$  obtidos demonstram que o mecanismo mais provável para o processo de supressão da fluorescência de ASH pela interação com o derivado análogo de chalcona IC9 é estático, em função dos altos valores encontrados para as constantes de velocidade de supressão polo IC9 ( $k_q \cong 10^{12}$  a  $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), e sua pouca dependência com a temperatura (Tabela 27). Os valores para  $k_q$  encontrados nesse estudo são muito mais altos do que a constante de velocidade de difusão em água ( $k_{diff} \cong 5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [Brune, 1993], indicando a formação inicial de uma pré-associação do derivado análogo da chalcona IC9/ASH. Os valores obtidos para  $K_{SV}$  na orden de ( $10^4 \text{ M}^{-1}$ ) e para  $k_q$  ( $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) foram semelhantes aos descritos na literatura para outras moléculas. [He, 2005; Xie, 2005; Kandagal, 2006; Li, 2007, 2009; Cui, 2008; Zhang, 2008]

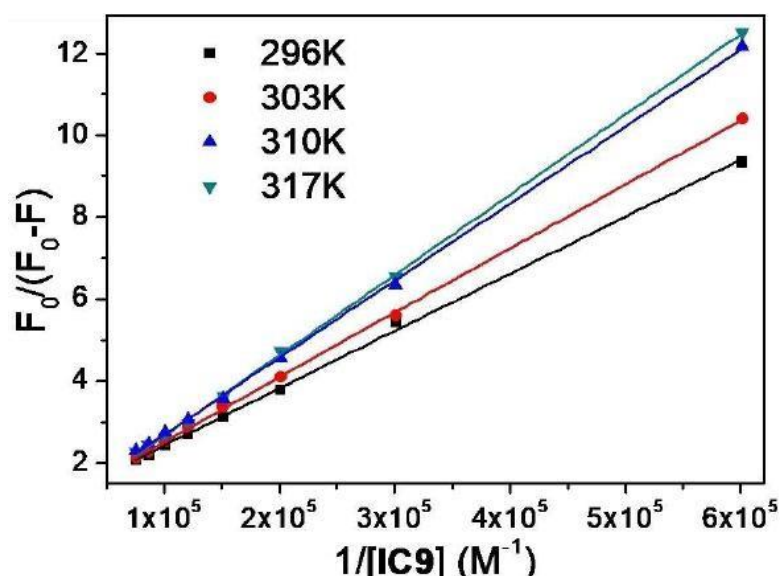


**Figura 80.** Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ) por 4-bromoindolilchalcona (IC9).

**Tabela 27.** Valores para  $K_{SV}$  e  $k_q$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela 4-bromoindolilchalcona (IC9) nas temperaturas de 296 K, 303 K, 310 K e 317 K.

T (K)	$K_{sv}$ ( $\times 10^4$ M <sup>-1</sup> )	$k_q$ ( $\times 10^{13}$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
296	$7,18 \pm 0,06$	1,20	0,9996
303	$7,01 \pm 0,10$	1,17	0,9984
310	$6,75 \pm 0,18$	1,13	0,9995
317	$5,89 \pm 0,06$	0,98	0,9993

As constantes de supressão efetivas para 4-bromoindolilchalcona IC9, ou constantes de interação de Stern-Volmer modificadas ( $K_a$ ), foram obtidas a partir da construção de gráficos de Stern-Volmer modificados (Figura 81) nas temperaturas de 296 K, 303 K, 310 K e 317 K, utilizando a equação 30. [Lakowicz, 2006]



**Figura 81.** Gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) por 4-bromoindolilchalcona (IC9).

Os valores de  $K_a$  encontrados para a interação da 4-bromoindolilchalcona IC9/ASH estão todos na faixa entre ( $K_a \cong 10^4$  a  $10^5$  M<sup>-1</sup>) (Tabela 28) sendo que em todos os casos apresentam boa correlação linear (Tabela 29), o que deixa claro que o derivado análogo a chalcona IC9 se liga com força moderada a ASH, pois os valores de  $K_a$  foram semelhantes ao da literatura para outras moléculas bioativas que apresentam interação moderada e com albumina ( $K_a \cong 10^4$  a  $10^5$  M<sup>-1</sup>). [He, 2005; Tang, 2006; Li, 2007, 2009; Zhang, 2008]

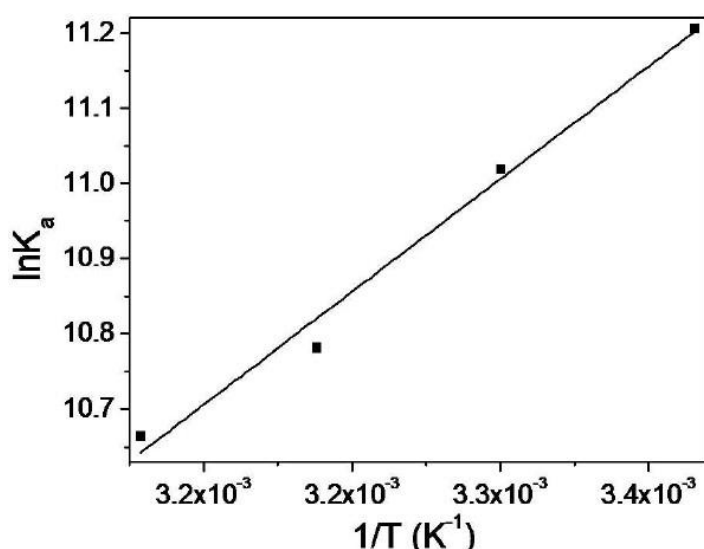
**Tabela 28.** Valores para  $K_a$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela 4-bromoindolilchalcona IC9 nas temperaturas de 296 K, 303 K, 310 K e 317 K.

4-bromoindolilchalcona IC9	
T(K)	$K_a$ (x $10^4$ M <sup>-1</sup> )
296	7,36 ± 0,26
303	6,10 ± 0,26
310	4,81 ± 0,26
317	4,28 ± 0,23

**Tabela 29.** Valores estatísticos obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados pela supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para o derivado análogo a chalcona IC9.

Temperatura (K)	R <sup>2</sup>	SD	N	P
296	0.9988	0,1334	8	<0.0001
303	0.9998	0,0778	8	<0.0001
310	0.9996	0,1976	8	<0.0001
317	0.9995	0,2891	8	<0.0001

Através dos valores de  $K_a$  encontrados para a supressão de ASH foram construídos gráficos de van't Hoff empregando-se a equação 39, [Lakowicz, 2006] os quais estão apresentados na figura 82 para o derivado análogo à chalcona IC9. A partir destes gráficos foram obtidos os parâmetros termodinâmicos de variação de entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) e de entropia ( $\Delta S^\circ$ ) envolvidos no processo de supressão da fluorescência da ASH, os quais permitiram o cálculo do valor da variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) (Tabela 30).



**Figura 82.** Gráfico de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela 4-bromoindolilchalcona (IC9).

**Tabela 30.** Valores para os parâmetros termodinâmicos  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  e  $\Delta G^\circ$  obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela 4-bromoindolilchalcona IC9.

T (K)	$\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta S^\circ$ (J/mol.K)	$\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	R2
296	$-20,8 \pm 1,7$	$0,023 \pm 0,0054$	-27,6	0.9812
303			-27,7	
310			-27,9	
317			28,1	

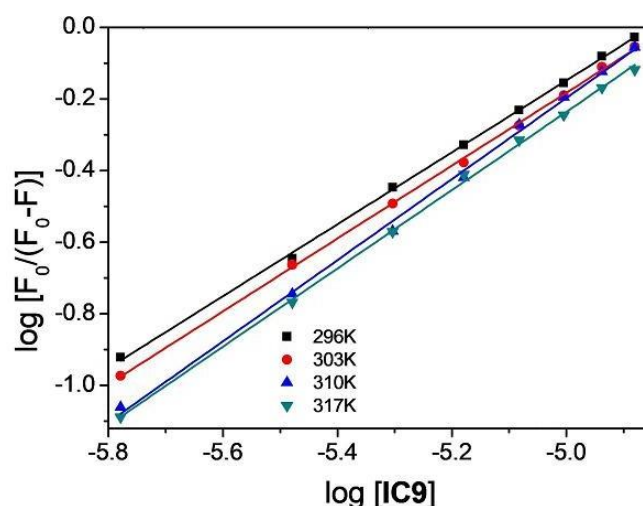
O valor de  $\Delta H^\circ$  negativo encontrado para a 4-bromoindolilchalcona IC9, mostrou que o processo de interação IC9/ASH foi exotérmico (Tabela 30). O valor de  $\Delta S^\circ$  positivo evidenciou que o tipo de interação entre as IC9/ASH possui um certo caráter hidrofóbico, e os valores de  $\Delta G^\circ$  negativos ( $\Delta G^\circ \cong -28$  a  $-27$  kJ/mol) demonstraram a espontaneidade da interação IC9/ASH (Tabela 30).

Para a interação IC9/ASH baseada simplesmente em um modelo de força intermolecular podemos inferir que ela pode envolver uma razoável interação hidrofóbica, evidenciada pelo valor positivo de  $\Delta S^\circ$ , levando inicialmente à formação de uma espécie hidrofobicamente associada, o que pode ser explicado pela baixa solubilidade em água da 4-bromoindolilchalcona IC9 estudada. Já o valor de  $\Delta H^\circ < 0$  indica que o composto em um segundo momento, deve estabelecer interações intermoleculares do tipo ligação de



hidrogênio, interações dipolares e interações do tipo  $\pi$  pela presença em sua estrutura de um sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado ligado a sistemas aromáticos, bem com a possibilidade da interação do nitrogênio pirrólico do próprio grupo indólico presente na 4-bromoindolilchalcona IC9.

Para uma supressão estática, os sítios de interação são independentes dos sítios equivalentes na macromolécula. Valores de constantes de interação ( $K_b$ ) e de números de sítios de interação ( $n$ ) foram obtidos a partir da construção de gráficos de Stern-Volmer (modificado de duplo log)  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  (Equação 33). [Lakowicz, 2006] De acordo com os resultados mostrados na figura 83 e Tabela 31, o número de sítios de interação entre a ASH o derivado análogo da chalcona IC9 é aproximadamente igual a 1 (um). Isso indica que existe somente uma interação-molecular entre IC9 e a molécula de ASH.



**Figura 83.** Gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelo derivado da chalcona (IC9).

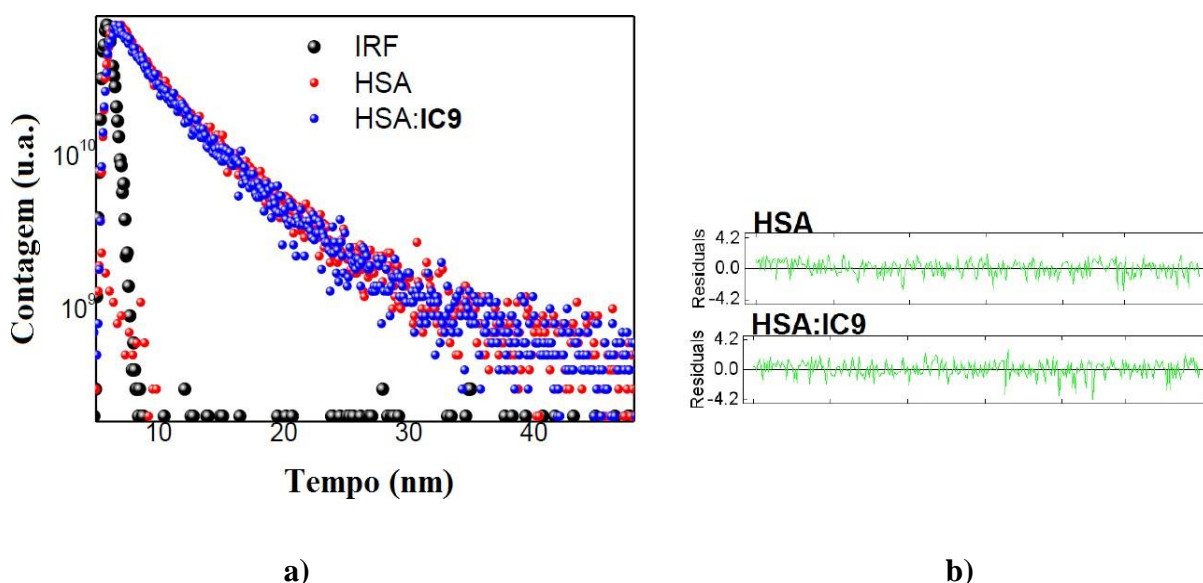
Os resultados encontrados para os valores da constante de interação  $K_b$  e do número de interação  $n$  (Tabela 31) mostraram, pouquíssima dependência com a temperatura. De uma maneira geral, os valores de  $K_b$  e  $n$  indicam que o provável mecanismo de supressão de fluorescência de ASH pela 4-bromoindolilchalcona IC9 é estático. [Chaves 2017; Chaves 2016]

**Tabela 31.** Valores de número e ordem de interação ( $n$  e  $K_b$ ) obtidos a partir dos gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela 4-bromoindolilchalcona (IC9)

T (K)	$n$	$K_b$ ( $\times 10^4 M^{-1}$ )	$R^2$
296	$1,00 \pm 0,01$	$8,33 \pm 0,01$	0,9998
303	$1,02 \pm 0,01$	$9,06 \pm 0,01$	0,9996
310	$1,13 \pm 0,02$	$14,01 \pm 0,02$	0,9998
317	$1,09 \pm 0,01$	$34,81 \pm 0,03$	0,9984

#### 5.4.3 Estudos da supressão de fluorescência resolvida no tempo para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)

Os resultados dos estudos de decaimento de emissão de fluorescência com resolução temporal para a 4-bromoindolilchalcona IC9 estão mostrados na figura 84. Os valores de  $\tau_1$  e  $\tau_2$  (Tabela 32) encontrados para ASH quando em presença do composto IC9 apresentaram uma variação dentro do erro experimental. Uma vez que o tempo de vida da fluorescência do ASH livre não é afetado pela presença do derivado análogo da chalcona IC9, pode-se concluir que o mecanismo de supressão da fluorescência é estático, o que implica uma associação do estado fundamental entre IC9/ASH. [Chaves, 2016]



**Figura 84.** a) Decaimento para a fluorescência resolvida no tempo para uma solução ASH contendo IC9, onde  $[ASH] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$  e  $[IC9] = 1,32 \times 10^{-5} \text{ M}$ , a temperatura ambiente. O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento). b) Distribuição dos resíduos.

**Tabela 32.** Resultados de fluorescência resolvidos no tempo para a interação ASH:IC9, em pH = 7,4 a temperatura ambiente.

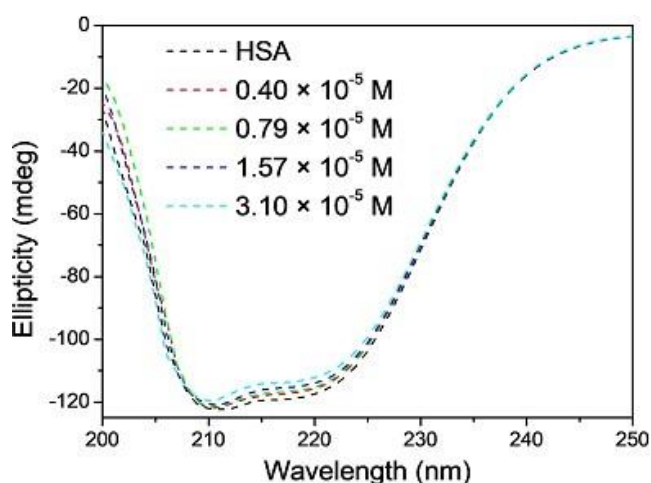
Composto	$\tau_1(\text{ns})$	% relativa	$\tau_2(\text{ns})$	% relativa	$\chi^2$
ASH	$1,98 \pm 0,14$	28,2	$5,98 \pm 0,1$	71,8	1,168
ASH/IC9	$1,76 \pm 0,14$	29,0	$5,82 \pm 0,1$	71,0	1,061

#### 5.4.4 Estudo espectroscópico de dicroísmo circular (DC) para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)

O dicroísmo circular (DC) é uma técnica espectroscópica eficiente para avaliar as mudanças conformacionais de uma proteína em solução. Após a adição da 4-bromoindolilchalcona IC9 ( $1,32 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) à solução de albumina, foi observada uma pequena alteração na intensidade do pico de absorção correspondente às transições  $\pi-\pi^*$  (208 nm) e  $n-\pi^*$  (222 nm) da estrutura  $\alpha$ -helicoidal em proteínas (Figura 85). [Yasmeen, 2017] Esses resultados indicam uma alteração fraca na estrutura secundária da ASH. [Matei, 2010]

Os espectros de DC de ASH e de IC9/ASH (Figuras 84) foram semelhantes quanto ao formato, somente apresentando variações de intensidade das bandas, o que significa que a estrutura de ASH foi mantida. [Yue, 2008] Neste estudo foi observado que a adição de

alíquotas de IC9 à albumina sérica humana influenciou na sua elipticidade, sendo que a interação de IC9 com a ASH resultou na diminuição de ambas as bandas (208 e 222 nm).



**Figura 85.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) e para o complexo ASH/IC9, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de IC9/ASH, [ASH] =  $1,00 \times 10^{-6}$  M e [IC9] = 0; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01 ( $\times 10^{-6}$ ) M, a T = 310 K.

Estimativas acerca da % de hélice- $\alpha$  para a estrutura secundária de ASH na ausência e na presença do derivado análogo da chalcona IC9 foram feitas usando as equações 7 e 8. [Chen, 1972; Khan, 2002; Gao, 2004; He, 2005, 2006; Kandagal, 2006; Yue, 2008; Cheng, 2009; Stan, 2009] Os valores experimentais de elipticidade ( $\theta$ ) foram lidos nos comprimentos de onda de (208 e 222 nm), e foram utilizados para calcular a elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual ( $MRE$ ), especificamente  $MRE_{208}$  e  $MRE_{222}$  (Equação 8). Posteriormente, os valores de  $MRE_{208}$  e  $MRE_{222}$  foram substituídos na equação 9 para calcular os valores de percentual de hélice- $\alpha$  na estrutura secundária da ASH (Tabela 33).

**Tabela 33.** Porcentagem de hélice- $\alpha$  calculado a 208 nm e em 222 nm para ASH (pH = 7,4) e para IC9/ASH nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, [ASH] =  $1,00 \times 10^{-6}$  M e [IC9] = 0; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01  $\times 10^{-6}$  M, na temperatura de 310 K.

ASH/IC9	% Hélice- $\alpha$ 208 nm	% Hélice- $\alpha$ 222 nm
1:0	58,3	56,7
1:4	57,9	55,8
1:8	57,6	55,4
1:16	57,5	54,9
1:32	56,4	52,9

Os resultados obtidos para a variação do % hélice- $\alpha$  da estrutura secundária da proteína (ASH) mostrados na Tabela 33 apresentam uma diminuição com a presença da 4-

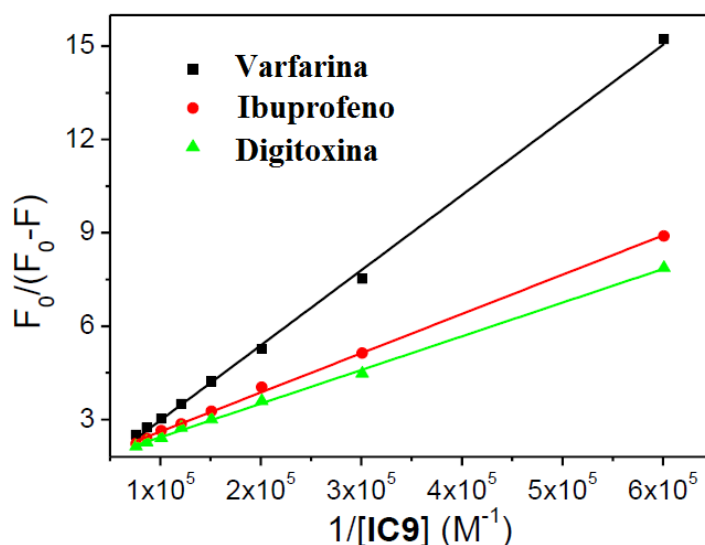
bromoindolilchalcona IC9 (nas razões molares de ASH/IC9 de 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), quando comparados com os resultados na ausência de IC9 (ASH/IC9 na proporção 1:0), indicando que houve interação do derivado análogo da chalcona IC9 com os resíduos de aminoácidos da cadeia principal polipeptídica de ASH e que houve uma diminuição da rede de ligações hidrogênio. [Kang, 2004; Shaikh, 2007; Yue, 2008; Cheng, 2009] Esta justificativa é compatível com as possíveis mudanças espectrais obtidas pela observação dos espectros de UV-Vis e de emissão de fluorescência (Figura 78 e 79, respectivamente).

#### **5.4.5 Estudos de interação competitiva para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)**

Conforme descrito anteriormente por Sudlow e colaboradores, existem dois locais de interação principais na estrutura da ASH, ou seja, o sítio de Sudlow I presente no subdomínio IIA, chamado de sítio de interação da varfarina e o sítio de Sudlow II presente no subdomínio IIIA, chamado de sítio de interação do ibuprofeno. [Sudlow, 1976] Além disso, é reconhecido também o sítio III subdomínio IB, denominado de sítio de interação da digitoxina. [Sun, 2016]

Para determinar o principal sítio de interação de IC9 em ASH, as sondas de sítio varfarina, ibuprofeno e digitoxina foram empregadas em experimentos competitivos. A figura 86 descreve os gráficos de Stern-Volmer modificados para a interação ASH/IC9 na presença de cada sonda de sítio a 310 K.

Os valores da constante de interação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ) determinadas para ASH:IC9 na presença de varfarina, ibuprofeno e digitoxina foram reduzidos em 78,0%, 31,4% e 22,0%, respectivamente, quando comparado com ASH:IC9 onde nenhum marcador de local foi usado (Tabela 34). Esses resultados indicam que a 4-bromoindolilchalcona IC9 compete preferencialmente com a varfarina pelo mesmo sítio de interação na ASH, isto é, o subdomínio IIA, onde o resíduo Trp-214 pode ser encontrado. Observe que os locais II e III (onde o resíduo Trp-214 não está localizado) também podem acomodar o ligante, mas com menos probabilidade. [Chaves, 2018]



**Figura 86.** Gráficos de Stern-Volmer modificados para a associação ASHIC9 na presença de varfarina, ibuprofeno e digitoxina, em pH=7,4 e 310K. [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M e [IC9] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e  $1,32 \times 10^{-5}$  M.

**Tabela 34.** Valores para a constante de interação de Stern-Volmer modificado  $K_a$  para a interação da ASH/IC9 na presença dos três marcadores de sítio diferentes varfarina, digitoxina e ibuprofeno na temperatura de 310 K.

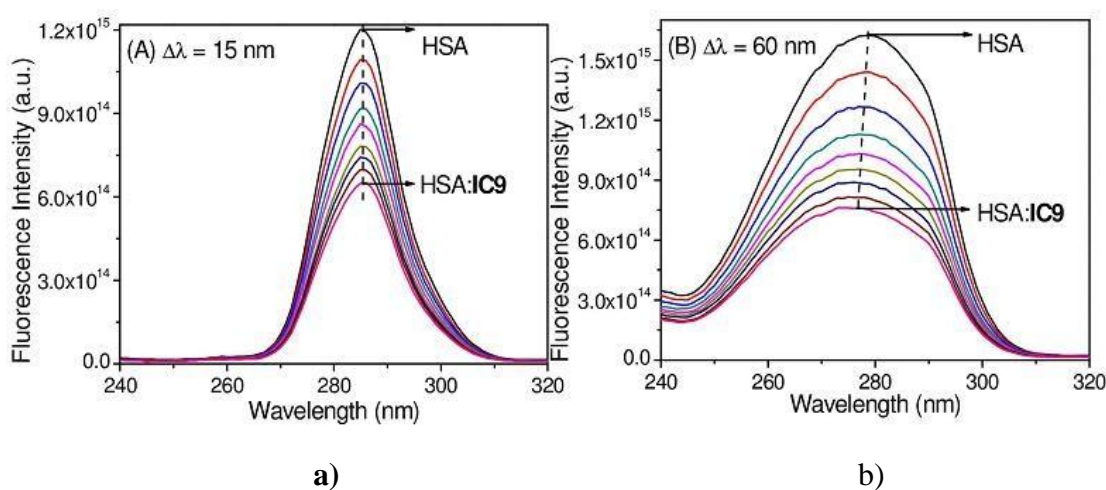
Marcador	Sítio	$K_a(\times 10^4 M^{-1})$	% mudança	R <sup>2</sup> )
Varfarina	I	$1,06 \pm 0,26$	78,0	0,9994
Ibuprofeno	II	$3,30 \pm 0,26$	31,4	0,9994
Digitoxina	III	$3,75 \pm 0,26$	22,1"	0,9995

#### 5.4.6 Estudo de supressão de fluorescência síncrona para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)

Para estudar a perturbação no microambiente em torno dos resíduos de aminoácidos tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) em proteínas, a espectroscopia de fluorescência síncrona (SFS) tem sido usada nos intervalos de comprimento de onda  $\Delta\lambda = \Delta\lambda_{ex} - \Delta\lambda_{em} = 15$  nm e 60 nm, respectivamente. [Yu, 2011]

O espectro de SFS para resíduos de tirosina ou triptofano (Figura 87) presentes no ASH mostra claramente uma redução significativa na intensidade de fluorescência após adições sucessivas de IC9 (de 0,17 para  $1,32 \times 10^{-5}$  M), o que está totalmente de acordo com o padrão de supressão de fluorescência descrito anteriormente.

No entanto, nenhuma evidência de um desvio para o azul ou para o vermelho da emissão de fluorescência do resíduo de Tyr pode ser observada quando a fluorescência de ASH foi registrada na presença de IC9 a  $\Delta\lambda=15$  nm. Esta é uma indicação clara de que o ligante não altera o microambiente ao redor do resíduo Tyr (Figura 87a). Por outro lado, um leve desvio para o azul pode ser detectado para o resíduo Trp (de 279 nm para 277 nm) quando na presença de IC9, o que implica que o resíduo de aminoácido Trp-214 está em um ambiente menos polar na presença de IC9 (Figura 87b). Este resultado está totalmente de acordo com o efeito hidrofóbico previamente detectado pelos parâmetros termodinâmicos com  $\Delta S^0 > 0$ . [Chaves, 2018]

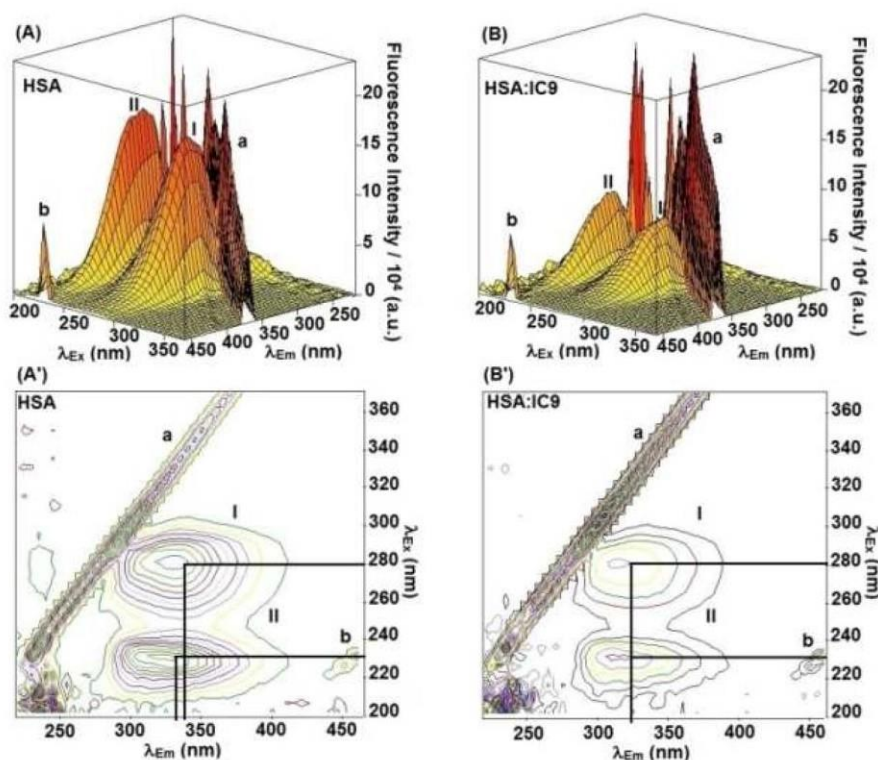


**Figura 87.** Espectros de fluorescência síncrona para ASH na ausência e na presença de IC9, com: **a)**  $\Delta\lambda = 15$  nm para Tyr e **b)**  $\Delta\lambda = 60$  nm para Trp.  $[ASH] = 1,00 \times 10^{-5}$  M,  $[MFCI] = [MFCBr] = [MFCF_3] = 0.17; 0.33; 0.50; 0.66; 0.83; 0.99; 1.15$  e  $1.32 \times 10^{-5}$  M e pH= 7,4 a temperatura ambiente.

#### 5.4.7 Estudo de supressão de fluorescência tridimensional para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)

Nos últimos anos, a espectroscopia de fluorescência tridimensional (EF3D) tornou-se uma técnica analítica útil, pois pode fornecer informações mais detalhadas sobre a possível alteração conformacional da proteína, bem como sobre o microambiente em torno dela. Os picos a e b são referidos como Rayleigh e picos de espalhamento de segunda ordem, respectivamente, enquanto os picos I ( $\lambda_{ex} = 280$ ,  $\lambda_{em} = 340$  nm) e II ( $\lambda_{ex} = 225$ ,  $\lambda_{em} = 345$  nm) correspondem ao comportamento de fluorescência dos resíduos Tyr/Trp e à estrutura principal do polipeptídeo, respectivamente. [Chaves, 2018] Esse estudo mostra (Figura 88) claramente que a intensidade de fluorescência dos picos I e II diminui com a adição de IC9 ( $1,32 \times 10^{-5}$

M). O deslocamento para o azul observado para os picos I (de 340 a 325 nm) e II (de 330 a 325 nm) é mais uma confirmação dos dados de SFS e CD já discutidos anteriormente isto é, possíveis perturbações no microambiente ao redor do fluoróforo bem como no esqueleto polipeptídico podem estar presentes como resultado da formação de um complexo de associação entre IC9/ASH. [Chaves, 2018]



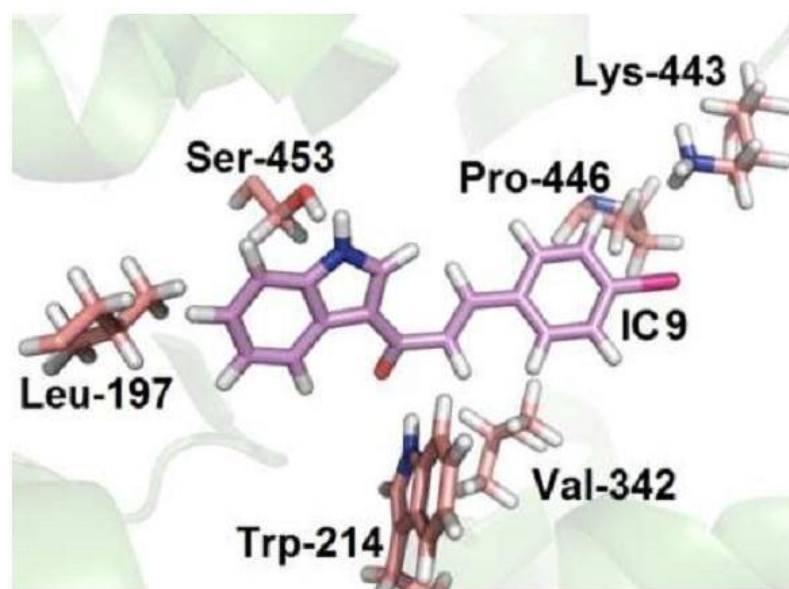
**Figura 88.** Projeções espectrais de fluorescência F3D (A e B) e seus correspondentes mapas de contorno (A' e B') para ASH (A e A') e ASH:IC9 (B e B'), a temperatura ambiente e em solução de PBS. [ASH]= $1,00 \times 10^{-6}$  M e [IC9]= $1,32 \times 10^{-5}$  M

#### 5.4.8 Estudos teóricos de docagem molecular para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)

Para oferecer uma descrição molecular da interação entre ASH e IC9, foram realizados cálculos teóricos via docagem molecular. A figura 89 mostra a melhor pose de encaixe para o maior valor de pontuação de docagem. Os resultados da docagem molecular sugerem que interações de hidrogênio, forças eletrostáticas e hidrofóbicas estão envolvidas no processo de interação. O átomo de hidrogênio dos resíduos dos aminoácidos Trp-214 e Ser-453 é um doador para ligação de hidrogênio com os grupos polares do ligante (grupos carbonila e amino) com distâncias de 1,80 Å e 2,10 Å, respectivamente. Por outro lado, os resíduos de aminoácidos Leu-197, Val-342 e Pro-446 interagem por meio de forças



hidrofóbicas com os grupos apolares do ligante, como o anel aromático. Além disso, os resultados da docagem molecular também sugeriram uma interação eletrostática entre o resíduo de aminoácido carregado positivamente Lys-443 com o átomo de bromo, em uma distância de 3,40 Å. No geral, os resultados da docagem molecular estão de acordo com as interações intermoleculares experimentais sugeridas pelos parâmetros termodinâmicos.



**Figura 89.** Superposição da melhor pose de docagem para (a) ASH:IC9 no sítio I de Sudlow, obtido pelo programa GOLD 5.2 (função ChemPLP). A estrutura dos ligantes está representada em rosa, a cor verde é a estrutura ASH (PDB: 1N5U), os resíduos de aminoácidos selecionados estão em amarelo; o hidrogênio: branco; oxigênio: vermelho; nitrogênio: azul e enxofre: amarelo mostarda.

#### 5.4.9 Estudo teórico de cálculo químico quântico para ASH em presença de 4-bromoindolilchalcona (IC9)

A superfície do potencial eletrostático molecular (Figura 90) da 4-bromoindolilchalcona IC9 e a análise do orbital de interação natural (NBO) foram realizadas em sua geometria otimizada tridimensional utilizando a teoria funcional da densidade (DFT) com B3PW91/6-31+g(d,p), com a água sendo utilizada como Modelo Contínuo Polarizável (PCM). A escala de potencial eletrostático aumenta na ordem de vermelho < laranja < amarelo < verde < azul, onde o azul escuro indica a região positiva e o vermelho mostra a região negativa. [Joy, 2016] O tratamento NBO propõe uma plataforma para investigar a transferência de carga e/ou interações hiperconjugativas associadas à molécula e para

entender as características de interação e interações orbitais. [Mathew, 2017a, 2017b] Quanto maior a energia de estabilização, mais intensa é a interação entre doadores e receptores de elétrons, e maior abrangência da conjugação de todo o sistema. As análises da matriz Fock de segunda ordem foram realizadas e levam em consideração as interações doador-aceptor, e para cada doador (*i*) e receptor (*j*) e a energia de estabilização, de tal forma que  $E(2)$  está associada à deslocalização da densidade eletrônica de *i* para *j*, conforme apresentado na Equação 40.

$$E(2) = \Delta E_{ij} = q_i \frac{(F_{ij}^2)}{E_j - E_i}$$

#### Equação 40

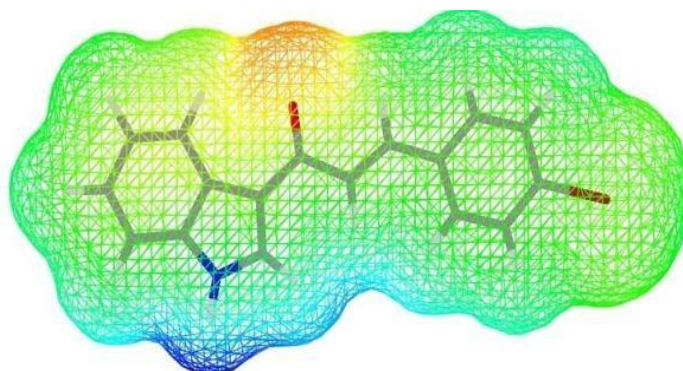
onde  $q_i$  é a ocupação orbital doadora,  $E_i$  e  $E_j$  são os elementos diagonais, e  $(F_{ij}^2)$  é o elemento da matriz Fock para o orbital de interação natural (NBO) fora da diagonal. [Mathew, 2017c] Se a magnitude da energia de estabilização  $E(2)$  for maior, maior será a deslocalização nos respectivos átomos.

A eficácia da interação da 4-bromoindoilchalcona IC9 para ASH é ainda inferida por cálculos químicos quânticos, como o potencial eletrostático molecular (MESP) e análise de orbital de interação natural (NBO). A superfície MESP pode sugerir um acúmulo de densidade eletrônica negativa no grupo carbonila, tornando o átomo de oxigênio um bom aceptor de ligação de hidrogênio. O perfil NBO também suporta este cenário através da interação de  $\pi(C_7-C_8)$  com  $\pi^*(C_{10}-O_{11})$  com uma energia de estabilização de 34,62 kcal/mol. O grupo carbonila está retirando ainda mais densidade eletrônica do grupo vizinho ( $C_{12}-H_{20}$ ) e estabilizado por um fator de 6,76 kcal/mol. Novamente, o orbital  $\sigma$  da porção carbono-bromo e o par de elétrons não ligantes do átomo de bromo doam sua densidade eletrônica para os orbitais  $\sigma$  e  $\pi$  do grupo carbonila. Além disso, a porção carbonila é estabilizada pela doação reversa a vários outros orbitais ligantes e antiligantes da molécula.

O maior potencial eletrostático positivo está localizado no grupo amino, podendo atuar como doador de ligação de hidrogênio; no entanto, o átomo de nitrogênio pode manter sua capacidade de se comportar como um aceptor de ligação de hidrogênio. Isso é validado pela interação dos orbitais  $\sigma$  de  $C_1-C_2$  e  $C_7-C_8$  com o orbital  $\sigma$  antiligante do grupo amino ( $N_9-H_{27}$ ) com energia de 3,58 e 3,42 kcal/mol, respectivamente. Da superfície do MESP, o restante das moléculas cobertas com uma coloração verde propõe uma distribuição unificada de densidade

eletrônica devido à extensa deslocalização dentro da estrutura molecular qualitativamente. O efeito de ressonância da molécula inteira pode ser racionalizado através de várias interações NBO, onde o grupo carbonila e a insaturação olefínica fazem a ponte desse fenômeno para duas regiões aromáticas e podem ser capazes de suportar interações hidrofóbicas com fragmentos apolares de ASH.

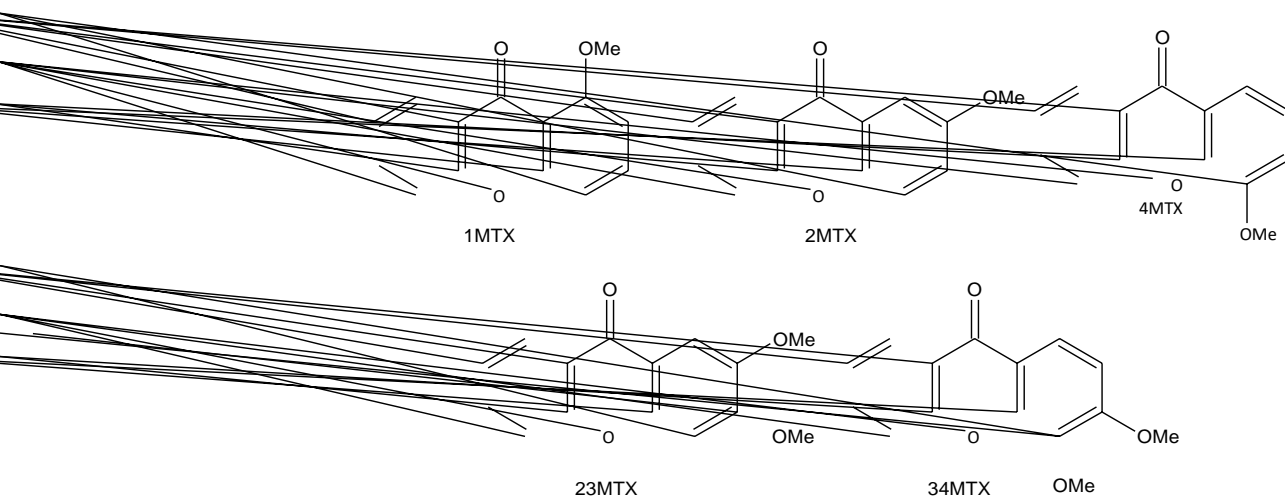
A presença do átomo de bromo está novamente apoiando a capacidade de interação de IC9 a ASH por um mecanismo eletrostático. Uma menor densidade eletrônica sobre o átomo de bromo é suportado por várias interações de hiperconjugação, onde a própria interação C-Br doa sua densidade de elétrons ao átomo de bromo. Além disso, o sistema fenila vizinho também suporta este cenário; entretanto, sua extensão é limitada:  $\sigma(\text{C}_{16}\text{-C}_{18})$  para  $\sigma^*(\text{C}_{15}\text{-Br}_{32})$  e  $\sigma(\text{C}_{17}\text{-C}_{19})$  para  $\sigma^*(\text{C}_{15}\text{-Br}_{32})$  com estabilização de 5,28 e 5,02 kcal/mol, respectivamente. Isso pode ser confirmado pela superfície do MESP, pois sua cor não é próxima do vermelho. Em resumo, IC9 tem uma possibilidade de interação ideal, estabelecido por meio de várias interações estruturais confirmadas por evidências estruturais químicas obtidas através dos cálculos quânticos tanto qualitativa como quantitativamente.



**Figura 90.** Superfície do potencial eletrostático molecular para o composto IC9.

## 5.5 Xantonas

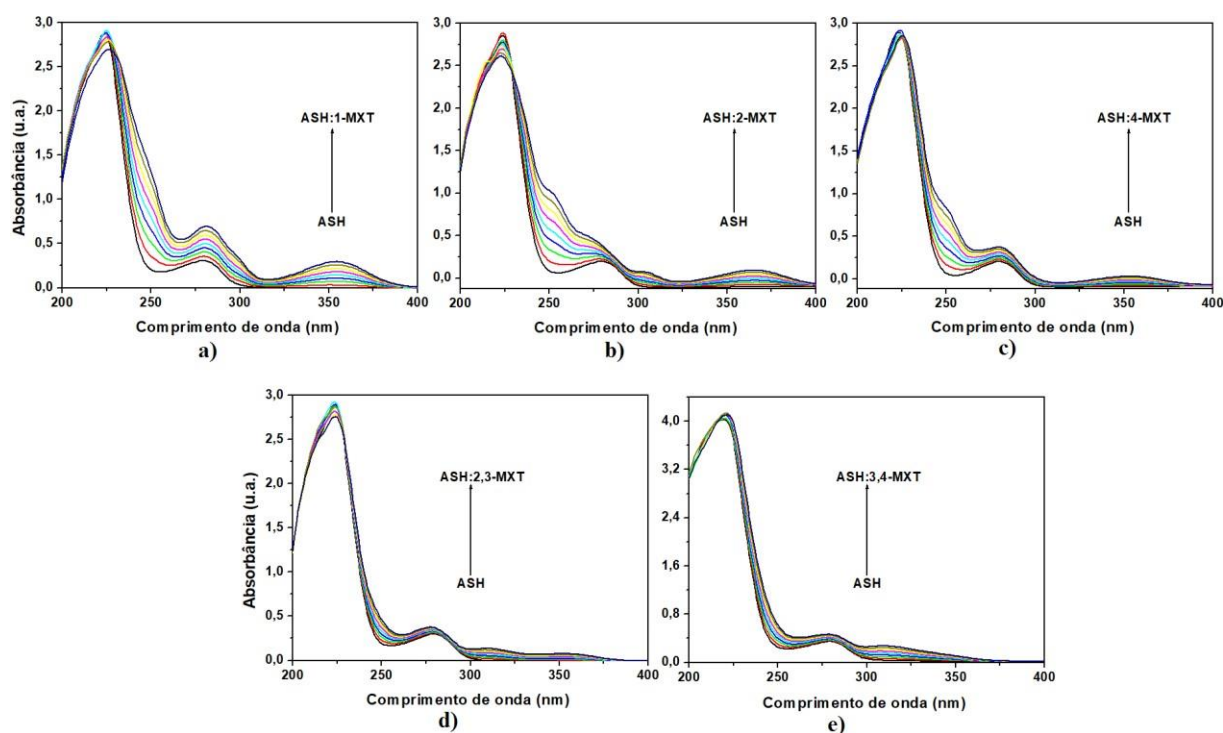
A interação de ASH com cinco potenciais fármacos derivados da xantona, isto é, 1-metoxi-9H-xanten-9-ona (1MXT), 2-metoxi-9H-xanten-9-ona (2MXT), 4-metoxi-9H-xanten-9-ona (4MXT), 2,3-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (23MXT) e 3,4-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (34MXT) (Figura 91) foram estudadas em condições fisiológicas pelas técnicas espectroscópicas UV-Vis, dicroísmo circular, fluorescência no estado estacionário a 305 K, 310 K e 315 K, e cálculos teóricos (docagem molecular).



**Figura 91.** Estrutura para os derivados metoxilados da xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT usados nos estudos de interação com ASH.

### 5.5.1 Estudos de espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis) para ASH em presença dos derivados da xantona

O processo de interação no estado fundamental entre os derivados da xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT com a ASH foi investigado empregando-se espectros de absorção na região do UV-Vis (200 nm a 400 nm), cujos resultados obtidos estão apresentados na figura 92 para os derivados de xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT, respectivamente a temperatura de (310K).

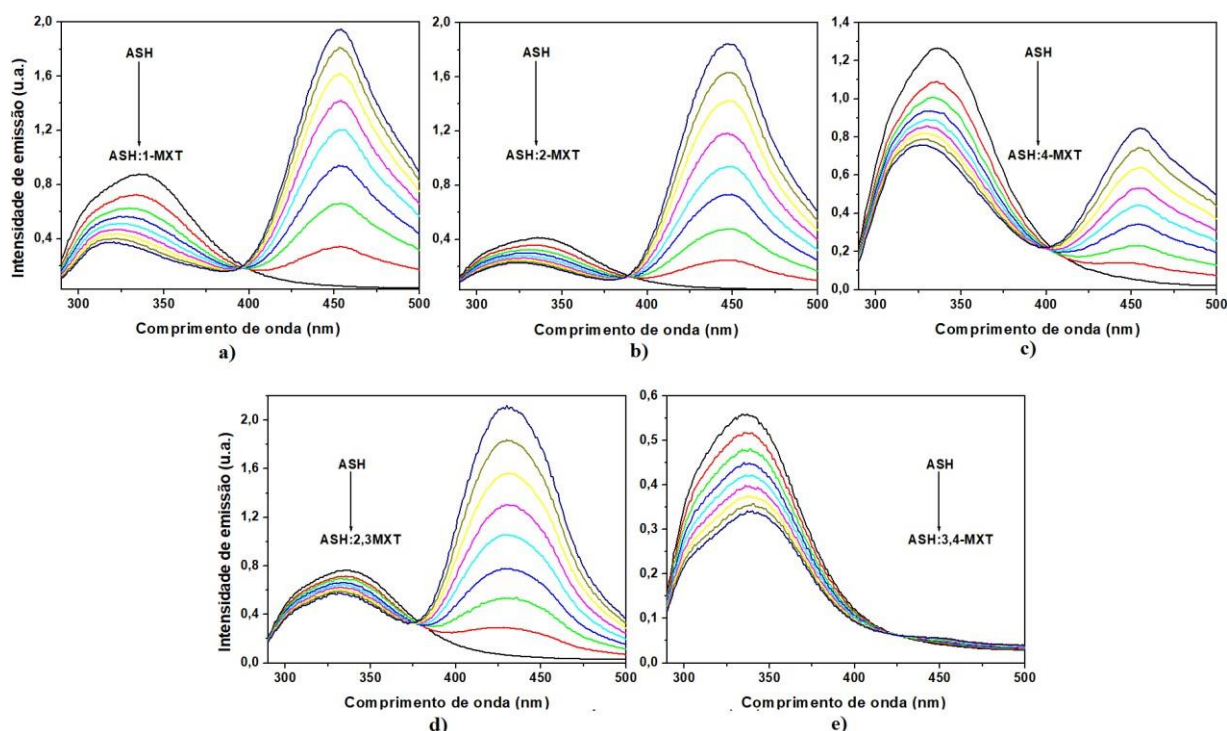


**Figura 92.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações dos derivados de xantona **a)** 1MXT, **b)** 2MXT, **c)** 4MXT, **d)** 23MXT e **e)** 34MXT; [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M e [1MXT] = [2MXT] = [4MXT] = 0,49; 0,99; 1,47; 1,96; 2,46; 2,91; 3,38 e  $3,84 \times 10^{-5}$  M e [23MXT] = [34MXT] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e  $2,60 \times 10^{-5}$  M a temperatura de 310 K.

Os resultados destes estudos (Figura 92) mostram um aumento das bandas de absorção com o aumento da concentração dos derivados de xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT, indicando uma possível formação de uma associação entre os derivados de xantona e ASH, no estado fundamental.

### 5.5.2 Estudo de supressão de fluorescência para ASH em presença dos derivados da xantonas

Os resultados dos estudos de supressão de fluorescência da ASH pelos compostos derivados da xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT, em solução de tampão de fosfato (pH= 7,4) na temperatura de 310 K, estão apresentados na figura 93.



**Figura 93.** Espectros de supressão da emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações dos derivados de xantonas **a)** 1MXT, **b)** 2MXT, **c)** 4MXT, **d)** 23MXT e **e)** 34MXT). [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M, [1MXT] = [2MXT] = [4MXT] = [23MXT] = [34MXT] = 0,49; 0,99; 1,47; 1,96; 2,46; 2,91; 3,38 e  $3,84 \times 10^{-5}$  M e [23MXT] = [34MXT] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e  $2,60 \times 10^{-5}$  M na temperatura de 310 K.

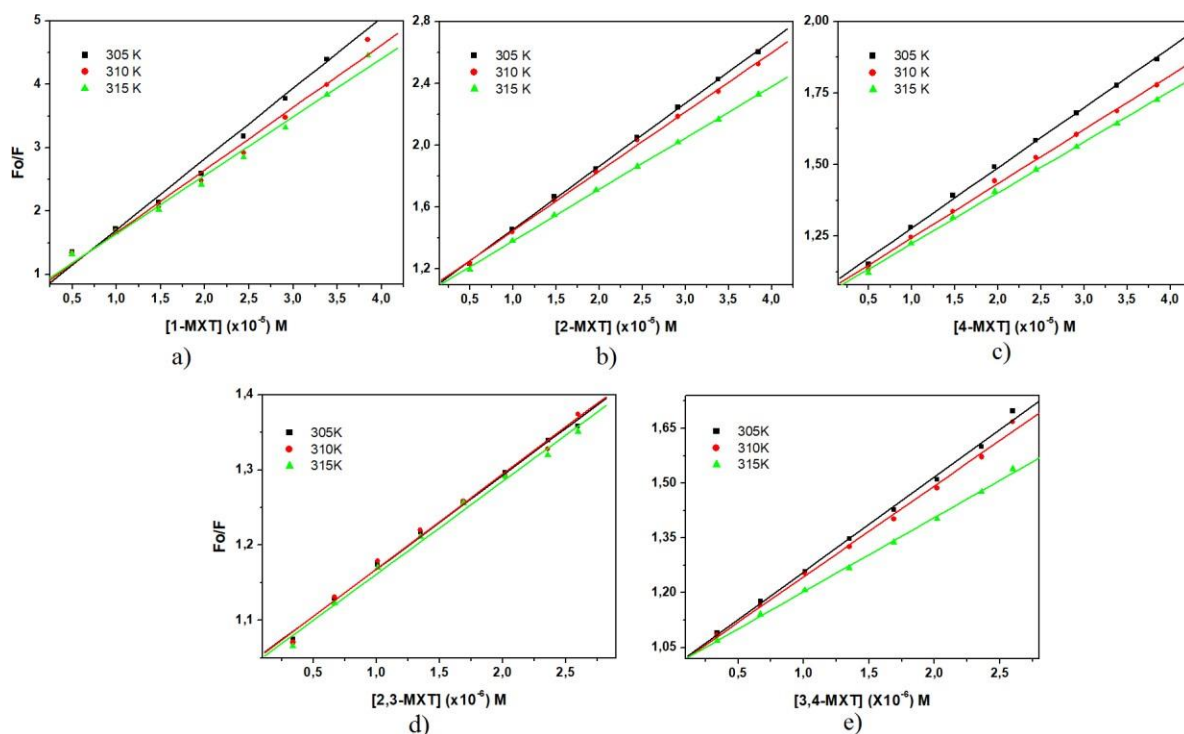
Nesses estudos, observou-se que a emissão de fluorescência da ASH foi suprimida pela adição de alíquotas sucessivas dos derivados de xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT (Figura 93), fato este que sugere uma possível interação entre os derivados de xantona e a ASH. [He, 2006; Cui, 2007; Zhang, 2008; Yue, 2008; Li, 2008, 2009] A literatura sugere que os derivados de xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT estão localizados em um sítio de interação que está próxima ao resíduo de triptofano contido na estrutura da albumina. [Wei, 2006; Cheng, 2009] Com o aumento da concentração dos derivados de xantona, nas soluções de ASH, foram observados deslocamentos no máximo da banda de emissão de fluorescência da ASH em torno de 340 nm para o azul, para os

compostos 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT (Figuras 93a-d), com valores de ( $\Delta\lambda = 28, 18, 16$  e  $12$  nm respectivamente), sugerindo a formação de um complexo ASH/xantona que tem grande contribuição hidrofóbica próximo ao resíduo Trp214. Já para o composto 34MXT (Figura 93e) pode ser observado um leve deslocamento para o vermelho ( $\Delta\lambda = 5$  nm), e consequentemente é possível atribuir um aumento de interações hidrofílicas no processo de complexação ASH/34MXT. [Ross, 1981]

Os gráficos de Stern-Volmer correspondentes à supressão de fluorescência dos resíduos de triptofano da ASH pelos derivados da xantona: 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT, em diferentes temperaturas (305 K, 310 K e 315 K), obtidos empregando a equação 21 estão mostrados na Figura 94.

Os valores de  $K_{SV}$  e  $k_q$  para os estudos da interação dos derivados da xantona (1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT) com ASH são apresentados na Tabela 35. Os valores para  $k_q$  obtidos demonstram que o mecanismo mais provável para o processo de supressão da fluorescência de ASH pela interação com os derivados de xantona é estático, em função dos altos valores encontrados para as constantes de velocidade de supressão pelos derivados de xantona ( $k_q \cong 10^{12}$  a  $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (Tabela 35). Os valores para  $k_q$  encontrados nesse estudo são muito mais altos do que a constante de velocidade de difusão em água ( $k_{diff} \cong 5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), indicando a formação inicial de um complexo de pré-associação ASH/1-MXT, ASH/2-MXT e ASH/4-MXT. Os valores obtidos para  $K_{SV}$  ( $10^3$  a  $10^5 \text{ M}^{-1}$ ) e para  $k_q$  ( $10^{12}$  a  $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) foram semelhantes aos descritos na literatura para outras moléculas. [He, 2005; Xie, 2005; Kandagal, 2006; Li, 2007, 2009; Cui, 2008; Zhang, 2008]





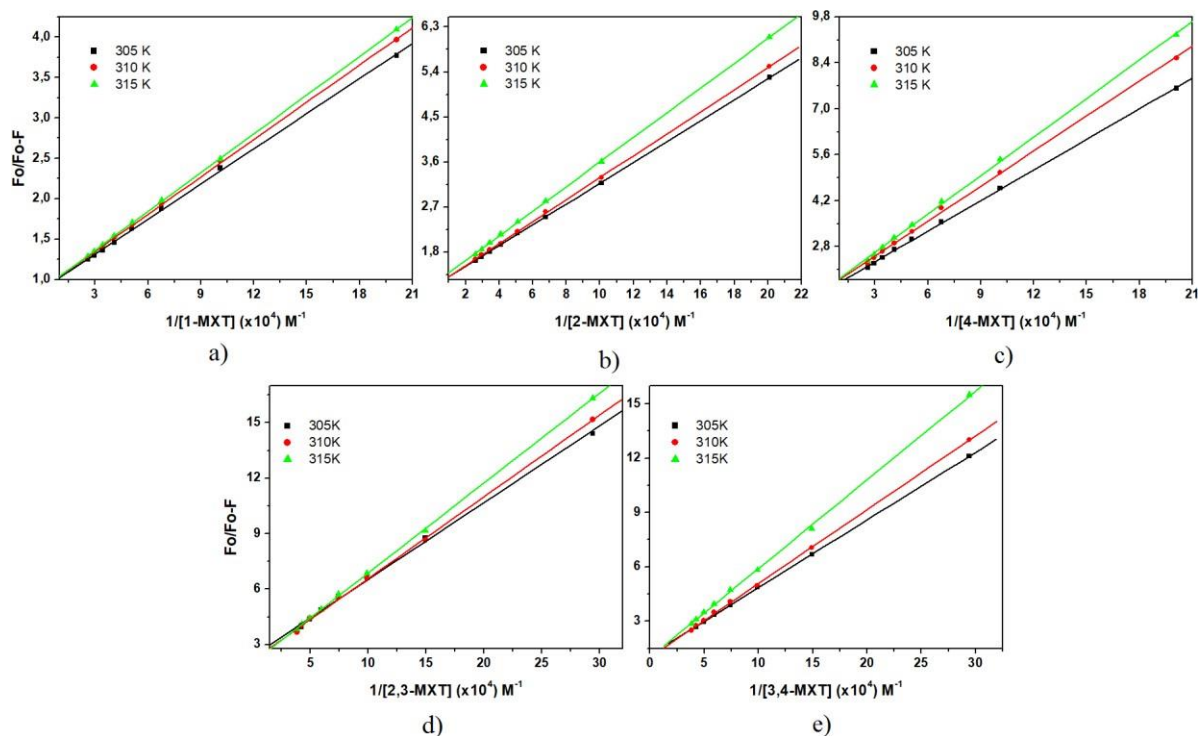
**Figura 94.** Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados de xantona **a)** 1MXT, **b)** 2MXT, **c)** 4MXT, **d)** 23MXT e **e)** 34MXT.

**Tabela 35.** Valores para  $K_{SV}$  e  $k_q$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados da xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT nas temperaturas de 305 K, 310 K e 315 K.

T (K)	305		310		315	
Composto	$K_{SV}$ $10^4 M^{-1}$	$k_q$ $10^{12} M^{-1}s^{-1}$	$K_{SV}$ $10^4 M^{-1}$	$k_q$ $10^{12} M^{-1}s^{-1}$	$K_{SV}$ $10^4 M^{-1}$	$k_q$ $10^{12} M^{-1}s^{-1}$
<b>1MXT</b>	$11,17 \pm 0,52$	$11,17 \pm 0,52$	$9,89 \pm 0,49$	$9,89 \pm 0,49$	$9,23 \pm 0,41$	$9,23 \pm 0,41$
<b>2MXT</b>	$4,07 \pm 0,04$	$4,07 \pm 0,04$	$3,84 \pm 0,06$	$3,84 \pm 0,06$	$3,34 \pm 0,03$	$3,34 \pm 0,03$
<b>4MXT</b>	$2,11 \pm 0,03$	$2,11 \pm 0,03$	$1,89 \pm 0,04$	$1,89 \pm 0,04$	$1,78 \pm 0,03$	$1,78 \pm 0,03$
<b>23MXT</b>	$1,25 \pm 0,03$	$1,25 \pm 0,03$	$1,26 \pm 0,05$	$1,26 \pm 0,05$	$1,23 \pm 0,05$	$1,23 \pm 0,05$
<b>34MXT</b>	$5,22 \pm 0,06$	$5,22 \pm 0,06$	$5,00 \pm 0,07$	$5,00 \pm 0,07$	$4,08 \pm 0,03$	$4,08 \pm 0,03$

As constantes de supressão efetivas para os derivados da xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT ou constantes de interação de Stern-Volmer modificadas ( $K_a$ ), foram obtidas a partir da construção de gráficos de Stern-Volmer modificados (Equação 30), [Lakowicz, 2006] conforme mostrado na Figura 95 para 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT.





**Figura 95.** Gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados de xantona: **a)** 1MXT, **b)** 2MXT, **c)** 4MXT, **d)** 23MXT e **e)** 34MXT.

Os valores de  $K_a$  encontrados para a interação derivados de xantona/ASH ASH/1MXT, ASH/2MXT, ASH/4MXT, ASH/23MXT e ASH/34MXT (Tabela 36) estão na faixa entre ( $K_a \cong 10^4$  a  $10^5$   $M^{-1}$ ), sendo que em todos os casos apresentam boa correlação linear (Tabela 37), o que deixa claro que estes derivados de xantona interagem moderadamente a ASH, pois os valores de  $K_a$  foram semelhantes ao da literatura para outras moléculas que apresentam interações moderadas entre as moléculas bioativas e albumina ( $K_a \cong 10^4$  a  $10^5$   $M^{-1}$ ). [He, 2005; Tang, 2006; Li, 2007, 2009; Zhang, 2008]

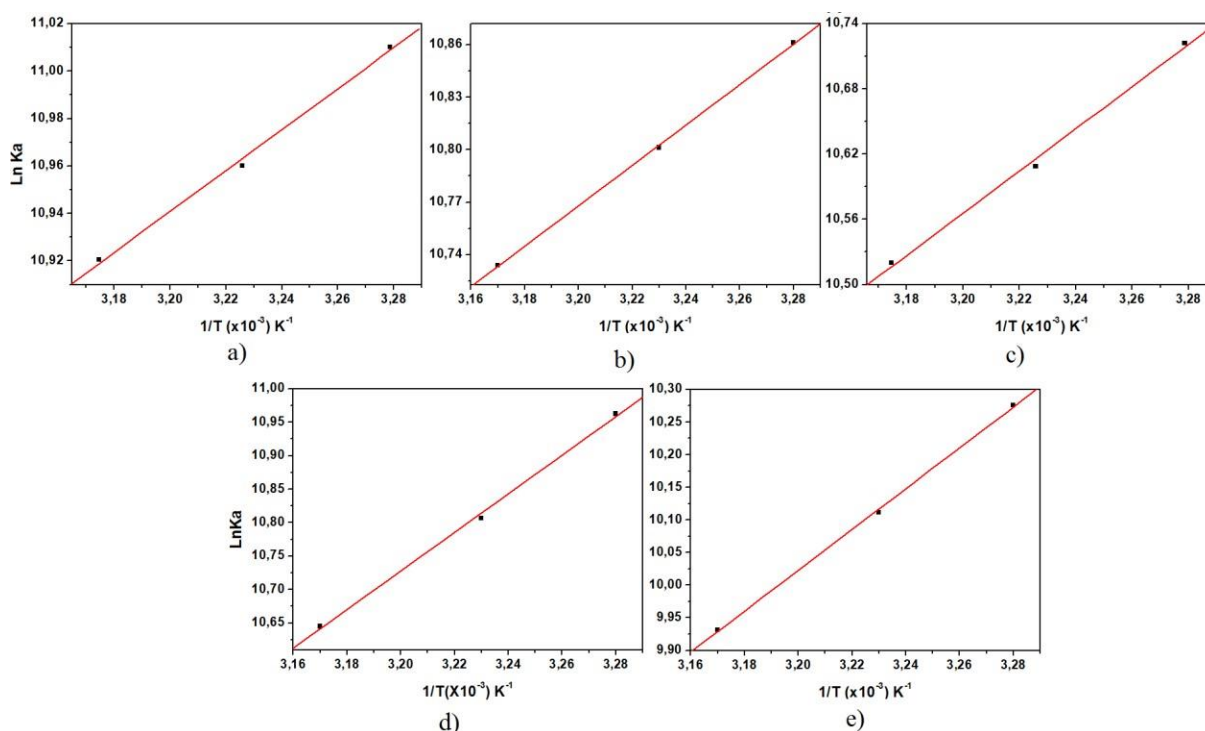
**Tabela 36.** Valores para  $K_a$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados da xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT em diferentes temperaturas (305 K, 310 K e 315 K).

Composto	Temperatura (K)		
	305	310	315
	$K_a (10^4 \text{ M}^{-1})$	$K_a (10^4 \text{ M}^{-1})$	$K_a (10^4 \text{ M}^{-1})$
1MXT	$6,05 \pm 0,09$	$5,79 \pm 0,05$	$5,53 \pm 0,03$
2MXT	$5,21 \pm 0,04$	$4,93 \pm 0,05$	$4,59 \pm 0,04$
4MXT	$4,53 \pm 0,08$	$4,05 \pm 0,11$	$3,70 \pm 0,09$
23MXT	$5,77 \pm 0,25$	$4,46 \pm 0,15$	$4,20 \pm 0,09$
34MXT	$6,03 \pm 0,16$	$5,13 \pm 0,13$	$4,30 \pm 0,18$

**Tabela 37.** Valores estatísticos obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados pela supressão de fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para os derivados de xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT.

Composto	$R^2$	$SD$	$N$	$P$
1-MXT	0,99969	0,02295	8	<0.0001
	0,99990	0,01391	8	
	0,99996	0,00886	8	
2-MXT	0,99994	0,01422	8	<0.0001
	0,99992	0,01803	8	
	0,99995	0,01585	8	
4-MXT	0,99976	0,04360	8	<0.0001
	0,99954	0,06888	8	
	0,99966	0,06425	8	
2,3-MXT	0,99875	0,19338	8	<0.0001
	0,99961	0,11459	8	
	0,99987	0,07347	8	
3,4-MXT	0,99995	0,05250	8	<0.0001
	0,99987	0,04750	8	
	0,99970	0,07830	8	

Através dos valores de  $K_a$  encontrados para a supressão de ASH, foram construídos gráficos de van't Hoff empregando-se a equação 39, [Lakowicz, 2006] os quais estão apresentados na figura 96 para os derivados da xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT. A partir destes gráficos foram obtidos os parâmetros termodinâmicos de variação de entalpia  $\Delta H^\circ$  e de entropia  $\Delta S^\circ$  envolvidos no processo de supressão da fluorescência da ASH, os quais permitiram o cálculo do valor da variação de energia livre de Gibbs  $\Delta G^\circ$  (Tabela 38), para os quais foram utilizadas as temperaturas de 305 K, 310 K e 315 K.



**Figura 96.** Gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) pelos derivados de xantona **a)** 1MXT, **b)** 2MXT, **c)** 4MXT, **d)** 23MXT e **e)** 34MXT.

**Tabela 38.** Valores para os parâmetros termodinâmicos  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  e  $\Delta G^\circ$  obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) pelos derivados de xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT nas temperaturas de 305 K, 310 K e 315 K.

Composto	T (K)	$\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta S^\circ$ (J/mol.K)	$\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	$R^2$
1MXT	305			-27,9	
	310	-7,17 + 0,41	0,068 + 0,0013	-28,2	0,9995
	315			-28,6	
2MXT	305			-27,5	
	310	-9,61 + 0,19	0,058 + 0,001	-27,8	0,9998
	315			-28,1	
4MXT	305			-27,2	
	310	-16,15 + 0,97	0,036 + 0,003	-27,3	0,9982
	315			-27,5	
23MXT	305			-27,8	
	310	-23,97 + 0,99	0,012 + 0,003	-27,8	0,9991
	315			-27,9	
34MXT	305			-28,0	
	310	-25,55 $\pm$ 0,67	0,008 + 0,002	-28,1	0,9997
	315			-28,2	

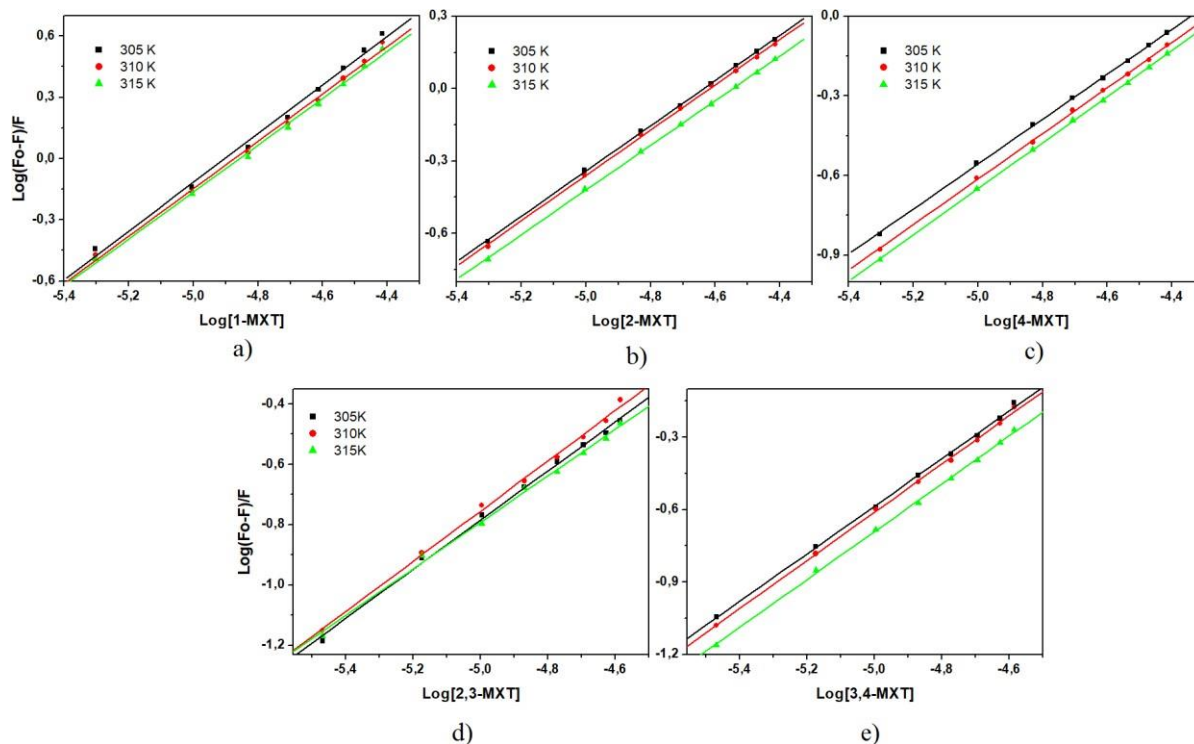
Os valores de  $\Delta H^\circ$  negativos encontrados em todos os casos estudados para os derivados de xantona mostraram que os processos de interação entre ASH e os derivados de xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT foram exotérmicos (Tabela 38). Por outro lado, os valores de  $\Delta S^\circ$  positivos evidenciaram que o tipo de interação entre ASH e estes derivados da xantona possui caráter hidrofóbico, e os valores de  $\Delta G^\circ$  negativos ( $\Delta G^\circ \cong -29$  a  $-25$  kJ/mol) demonstraram a espontaneidade destas interações (Tabela 38).

Para o processo de interação ASH/xantona baseado simplesmente em um modelo de força intermolecular, podemos inferir que ela pode envolver uma razoável interação hidrofóbica, evidenciada pelos valores positivos de  $\Delta S^\circ$ , levando inicialmente à formação de uma espécie hidrofobicamente associada. Já os valores de  $\Delta H^\circ < 0$  indicam que os compostos devem estabelecer interações intermoleculares de caráter hidrofílico do tipo interação ligação de hidrogênio e interações dipolares ocasionadas pela presença de: uma carbonila benzílica, bem como a possibilidade da interação dos oxigênios metoxílicos ou de interações tipo  $\pi$  como consequência dos grupos aromáticos presentes nos derivados das xantonas estudadas 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT.

Já a maior contribuição dos efeitos entálpicos (menores valores de  $\Delta H^\circ$ ) encontrados para os derivados contendo mais de um grupo metoxila como 23MTX e 34MTX (Tabela 38) deve estar correlacionada aos efeitos eletrônicos gerados pelos grupos metoxilas presentes como substituintes sobre a extensão de conjugação dos sistemas  $\pi$  do anel aromático/carbonila, bem como a maior probabilidade de interações hidrofílicas devido à presença de um número maior de átomos de oxigênio em suas estruturas. [Ross, 1981]

Para uma supressão estática, os sítios de interação são independentes dos sítios equivalentes na macromolécula. Valores de constantes de interação ( $K_b$ ) e de números de sítios de interação ( $n$ ) foram obtidos a partir da construção de gráficos empregando a equação de Stern-Volmer modificada duplo-log (Equação 33) [Lakowicz, 2006] e estão mostrados na Figura 97.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 39, o número de sítios de interação entre a ASH e 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT é aproximadamente igual a 1 (um). Isso indica que existe somente uma interação molecular entre estes derivados da xantona com ASH.



**Figura 97.** Gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados de xantona **a)** 1MXT, **b)** 2MXT, **c)** 4MXT, **d)** 23MXT e **e)** 34MXT.

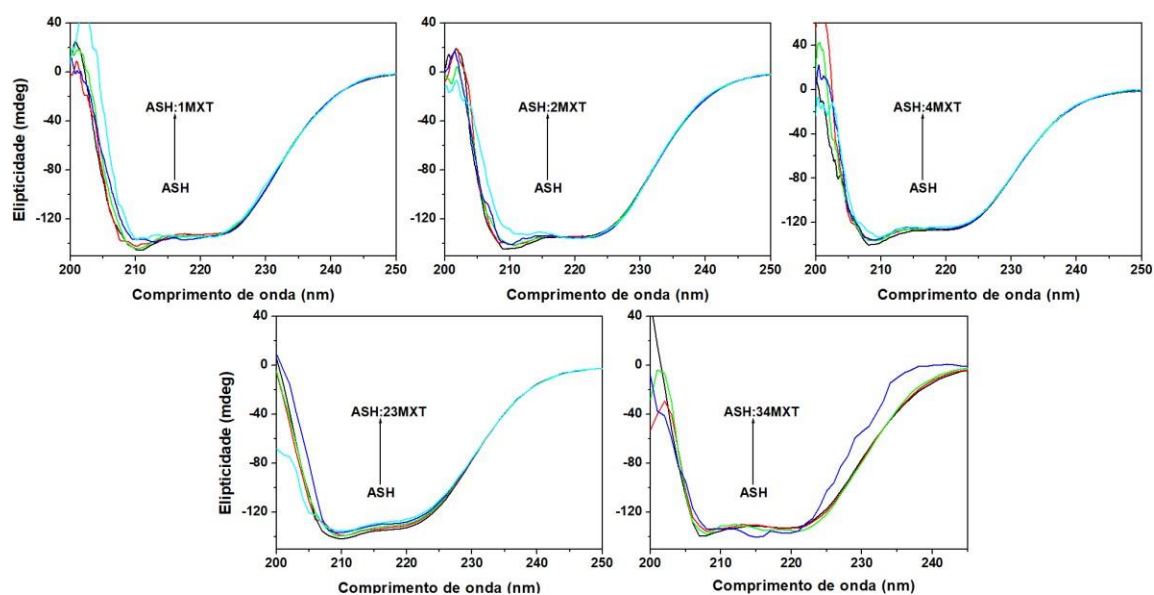
Os resultados encontrados para os valores de  $K_b$  e  $n$  (Tabela 39) mostraram pouquíssima dependência com a temperatura. De uma maneira geral, os valores de  $K_b$  indicam que o provável mecanismo de supressão de fluorescência de ASH e 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT é estático, pois não houve uma correlação com o aumento da temperatura.

**Tabela 39.** Valores de número e ordem de interação ( $n$  e  $K_b$ ) obtidos a partir dos gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão da fluorescência de ASH ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelos derivados da xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT nas temperaturas de 305 K, 310 K e 315 K.

Composto	T (K)	$n$	$K_b(\times 10^4 M^{-1})$	$R^2$	$SD$
1MXT	305	$1,19 \pm 0,03$	$71,86 \pm 0,01$	0,9974	0,02795
	310	$1,16 \pm 0,02$	$46,58 \pm 0,01$	0,9979	0,02475
	315	$1,15 \pm 0,02$	$38,29 \pm 0,01$	0,9984	0,02110
2MXT	305	$0,94 \pm 0,01$	$2,25 \pm 0,01$	0,9998	0,00545
	310	$0,94 \pm 0,01$	$2,18 \pm 0,01$	0,9996	0,00855
	315	$0,93 \pm 0,01$	$1,65 \pm 0,01$	0,9999	0,00474
4MXT	305	$0,85 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,01$	0,9998	0,00549
	310	$0,86 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,01$	0,9998	0,00625
	315	$0,87 \pm 0,01$	$0,49 \pm 0,01$	0,9999	0,00371
23MXT	305	$0,82 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,01$	0,9987	0,01683
	310	$0,83 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,01$	0,9986	0,01823
	315	$0,77 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$	0,9983	0,0187
34MXT	305	$0,98 \pm 0,01$	$4,31 \pm 0,01$	0,9995	0,01308
	310	$0,99 \pm 0,01$	$4,77 \pm 0,01$	0,9994	0,01464
	315	$0,99 \pm 0,01$	$3,58 \pm 0,01$	0,9996	0,01175

### 5.5.3 Estudo espectroscópico de dicroísmo circular (DC) para ASH em presença dos derivados da xantona

Os espectros de dicroísmo circular obtidos para ASH na ausência e na presença dos derivados de xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT na temperatura de  $T = 310$  K estão apresentados na Figura 98, sendo que, em todos os casos, foram semelhantes quanto ao formato, somente apresentando variações de intensidade das bandas em 208 e 222 nm, o que significa que a estrutura de ASH foi mantida. [Yue, 2008] Nestes estudos foi observado que a adição de alíquotas destes derivados de xantona à albumina sérica humana influenciaram na sua elipticidade, o que pode ser observado pela diminuição na intensidade de ambas as bandas (208 e 222 nm), sugerindo a ocorrência de pequenas mudanças na estrutura secundária da proteína, indicando a formação de complexos entre ASH e 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT.



**Figura 98.** Espectros de dicroísmo circular para a interação entre ASH (pH = 7,4) e derivados de xantona (1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:1MXT, ASH:2MXT, ASH:4MXT, ASH:23MXT e ASH:34MXT [ASH] =  $1,00 \times 10^{-6}$  M e [1MXT] = [2MXT] = [4MXT] = [23MXT] = [34MXT] = 0; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01 ( $\times 10^{-6}$ ) M, a T = 310 K.

Estimativas acerca das % de hélice- $\alpha$  para a estrutura secundária de ASH na ausência e na presença de 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT foram feitas usando as equações 8 e 9. [Chen, 1972] Os valores experimentais de elipticidade ( $\theta$ ) foram lidos nos comprimentos de onda de 208 nm e 222 nm e foram utilizados para calcular a elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual (*MRE*), especificamente *MRE*<sub>208</sub> e *MRE*<sub>222</sub> (Equação 8). Posteriormente, os valores de *MRE*<sub>208</sub> e *MRE*<sub>222</sub> foram substituídos na equação 9 para calcular os valores de percentual de hélice- $\alpha$  (% hélice- $\alpha$ ) na estrutura secundária da ASH

(Tabela

40).



**Tabela 40.** Porcentagem de hélice- $\alpha$  calculada a 208 nm e 222 nm para ASH (pH = 7,4) na ausência e na presença dos derivados de xantona 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT na temperatura de 310 K.

Composto	ASH:MXT	(% hélice- $\alpha$ ) (208 nm)	(% hélice- $\alpha$ ) (222 nm)
<b>1MXT</b>	1:0	67,8	67,7
	1:4	64,6	66,9
	1:8	63,9	67,6
	1:16	59,2	67,7
	1:32	52,1	68,3
<b>2MXT</b>	1:0	67,3	67,9
	1:4	66,9	68,2
	1:8	63,3	68,5
	1:16	63,6	68,5
	1:32	54,4	68,7
<b>4MXT</b>	1:0	68,8	63,0
	1:4	65,9	62,4
	1:8	66,2	62,2
	1:16	65,2	62,2
	1:32	61,6	61,7
<b>23MXT</b>	1:0	68,1	64,6
	1:4	64,2	63,6
	1:8	65,8	62,9
	1:16	65,5	62,12
	1:32	64,3	61,1
<b>34MXT</b>	1:0	68,1	65,6
	1:4	66,3	66,1
	1:8	67,7	67,9
	1:16	55,0	69,3
	1:32	31,2	16,9

Os resultados obtidos para a variação do % hélice- $\alpha$  da estrutura secundária da proteína (ASH) apresentados na Tabela 40 indicam que houve interação dos derivados de xantona com os resíduos de aminoácidos da cadeia principal polipeptídica de ASH e que possivelmente houve uma diminuição da rede de ligações hidrogênio. [Kang, 2004; Shaikh, 2007; Yue, 2008; Cheng, 2009]. Esta justificativa é compatível com as possíveis mudanças espectrais obtidas pela observação dos espectros de UV-Vis e de emissão de fluorescência.

#### 5.5.4 Estudos de interação competitiva para ASH em presença dos derivados da xantona

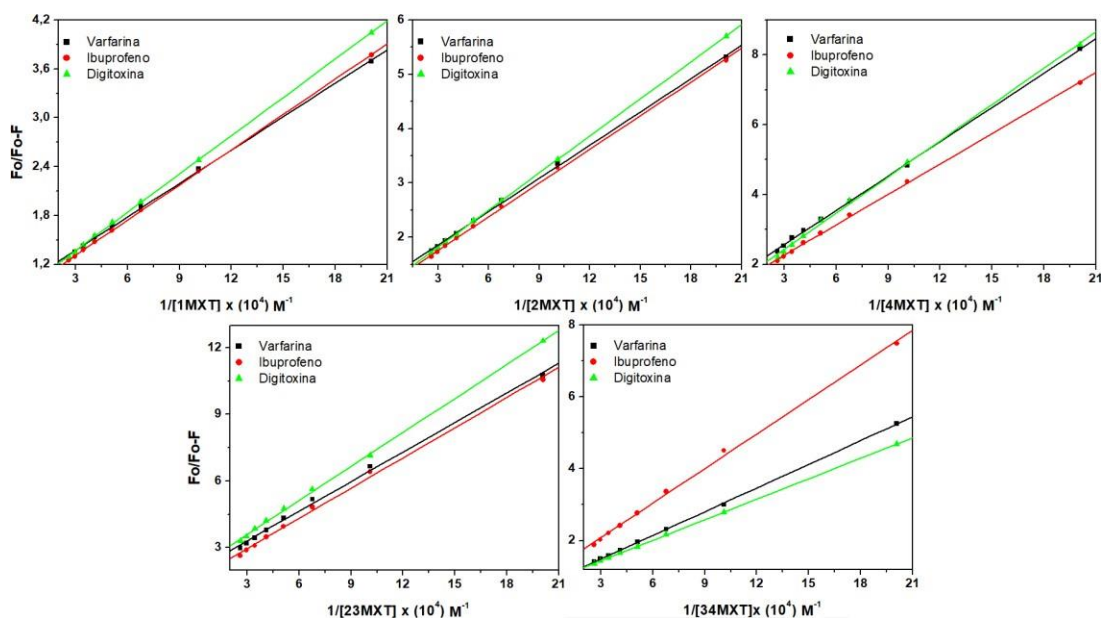
A fim de identificar os sítios de interação das xantonas 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT com ASH, foram realizados experimentos competitivos com marcadores de sítios. Existem três sítios de interação principais na albumina e, conforme descrito na literatura, varfarina, ibuprofeno e digitoxina ligam-se especificamente no sítio SI (subdomínio IIA), sítio SII (subdomínio IIIA) e sítio III (subdomínio IB), respectivamente. [Sudlow, 1976; Sun, 2016] A constante de interação efetiva ( $K_a$ ) obtidos através de gráficos de Stern-Volmer modificada (Figura 99), na presença de cada sonda de sítio, foi calculada a 310 K e os resultados estão listados na Tabela 41.

A partir dos dados de competição (Tabela 41) foi possível separar os derivados de xantona em dois grupos segundo o número de metoxilas presentes como substituinte. Os compostos apresentando apenas uma metoxila na estrutura, isto é, 1MXT, 2MXT e 4MXT têm como alvo de interação principal o sítio da varfarina (SI de Sudlow), pois estes apresentaram mudanças nos valores da  $K_a$  na ordem de ~ 21,8% para 1MXT, 24,1% para 2MXT e 21,7% para 4MXT, enquanto a influência de ibuprofeno e digitoxina nos parâmetros de interação são menos significativas. Esses resultados indicam uma competição entre a varfarina e as potenciais fármacos 1MXT, 2MXT e 4MXT para o mesmo sítio de interação na ASH [Caruso, 2016; Sun, 2016].

Outro fato relevante é a mudança observada nos dados de competição em relação à posição da metoxila presente como substituinte, pois pode ser observado um aumento gradual do efeito de competição pelo sítio do ibuprofeno (SII de Sudlow), de ~5,5% para 1MXT, aumentando para 11,8% para 2MXT e 18,7% para 4MXT. Esses resultados indicam que a preferência de complexação de 1MXT, 2MXT e 4MXT com a albumina está diretamente ligada a questões da distribuição eletrônica como consequência do grupo substituinte. Conforme a metoxila se afasta da carbonila, pela mudança da posição do grupo metoxila do C-1 aromático para C-4, o efeito eletrônico do átomo de oxigênio afeta significativamente a polaridade desses compostos e consequentemente a forma pela qual ocorre a complexação ligante/ASH. Como previsto pela teoria de Sudlow, o sítio SI é o alvo principal de compostos heterocíclicos aromáticos apresentando carga dispersa enquanto o sítio SII é preferencial para compostos que sustentam cargas negativas concentradas. [Sudlow 1976; Leboffe, 2020]

O segundo grupo de compostos que é formado pelos derivados da xantona 23MXT e 34MXT, que possuem duas metoxilas como substituintes, apresentou um mecanismo de

competição que indica a possibilidade de interação aos dois sítios SI e SII da ASH, com uma pequena preferência para o sítio do ibuprofeno (SII). Para estas dimetoxixantonas foram observadas mudanças nos valores de  $K_a$  na ordem de 36,3% para 23MXT e 31,5% para 34MXT, ligeiramente superiores àqueles encontrados para a competição com a varfarina (SI) que apresentaram valores de  $K_a$  na ordem de 21,7% para 23MXT e 26,1% para 34MXT. Essa preferência pelo sítio SII para estes derivados da xantona indica novamente que os efeitos eletrônicos exercidos pelos átomos de oxigênio promovem mudanças na distribuição global dos elétrons do sistema  $\pi$  conjugado com a carbonila e, como consequência, a sua preferência pelo sítio de interação com a ASH, como observado em menor grau para as xantonas 1MXT, 3MXT e 4MXT (Tabela 41), o que está de acordo com os estudos de Sudlow. [Sudlow 1976; Leboffe, 2020]



**Figura 99.** Gráficos de Stern–Volmer modificado para as interações ASH:1-MXT, ASH:2-MXT e ASH:4-MXT, respectivamente, na presença de marcadores de sítio varfarina, digitoxina e ibuprofeno a 310 K e pH = 7,4. [ASH] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M, [1MXT] = [2MXT] = [4MXT] = 0,49; 0,99; 1,47; 1,96; 2,46; 2,91; 3,38 e  $3,84 \times 10^{-5}$  M e [23MXT] = [34MXT] = 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e 2,60  $\times 10^{-5}$  M.

**Tabela 41.** Valores para a constante de interação do Stern-Volmer modificado ( $K_a$ ) para a interação de 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT com ASH na presença de três marcadores de sítio diferentes a 310 K.

Comp.	Marcador	Sítio	$K_a$ ( $\times 10^4$ M <sup>-1</sup> )	% mudança	R <sup>2</sup>
<b>1MXT</b>	Varfarina	I	$7,05 \pm 0,14$	21,8	0,9996
	Ibuprofeno	II	$6,11 \pm 0,05$	5,5	0,9999
	Digitoxina	III	$5,75 \pm 0,08$	1,0	0,9999
<b>2MXT</b>	Varfarina	I	$6,12 \pm 0,09$	24,1	0,9997
	Ibuprofeno	II	$5,51 \pm 0,09$	11,8	0,9998
	Digitoxina	III	$5,01 \pm 0,01$	1,6	0,9999
<b>4MXT</b>	Varfarina	I	$4,93 \pm 0,69$	21,7	0,9995
	Ibuprofeno	II	$4,81 \pm 0,52$	18,8	0,9997
	Digitoxina	III	$3,65 \pm 0,78$	9,9	0,9994
<b>23MXT</b>	Varfarina		$3,48 \pm 1,18$	21,9	0,9987
	Ibuprofeno	II	$2,84 \pm 1,12$	36,3	0,9988
	Digitoxina	III	$3,72 \pm 0,73$	16,6	0,9995
<b>34MXT</b>	Varfarina	I	$3,79 \pm 0,52$	26,1	0,9998
	Ibuprofeno	II	$3,51 \pm 0,80$	31,5	0,9994
	Digitoxina	III	$4,59 \pm 0,29$	10,5	0,9999

### 5.5.5 Estudo de docagem molecular para ASH em presença de derivados de xantona

A partir de estudos de supressão de fluorescência e interação competitiva sabe-se que a interação das metoxixantonas 1MXT, 2MXT e 4MXT ocorre preferencialmente no Sítio I (também conhecido como Sítio I de Sudlow), onde o resíduo Trp-214 pode ser encontrado. Já para os derivados 23MXT e 34MXT a interação ocorre preferencialmente no Sítio II. [Chaves, 2015] Para sugerir os principais resíduos de aminoácidos capazes de interagir com cada ligante estudado nos complexos ASH/1MTX, ASH/2MTX, ASH/3MTX, ASH/23MTX e ASH/34MTX foram realizados cálculos de docagem molecular. Os resultados obtidos mostram a docagem para os compostos 1MXT, 2MXT e 4MXT interagindo no Sítio I (Figuras 100a-c), e para os compostos 23MXT e 34MXT interagindo no Sítio II (Figuras 100d-e).

A figura 100a mostra a melhor pose de encaixe para o maior valor de pontuação de docagem para a interação ASH:1MXT no sítio I de Sudlow. Os resultados de docagem molecular sugerem que interações hidrofóbicas e interações por empilhamento  $\pi$  estão envolvidas no processo de interação. Os resíduos de aminoácidos Lys-199, Phe-211, Phe-211, Trp-214, Val-344, Leu-481, Leu-481 e Val-482 interagem por meio de forças hidrofóbicas com os grupos apolares do ligante, como o anel aromático, com distâncias de 2,73; 3,47; 3,28; 3,82; 2,97; 3,52; 3,34; 3,79Å, respectivamente. Por outro lado, o resíduo de aminoácido Trp-214 interage por meio de empilhamento  $\pi$  com os anéis aromáticos, com distâncias de 3,71; 4,03 e 4,20Å, como mostrado na tabela 42.

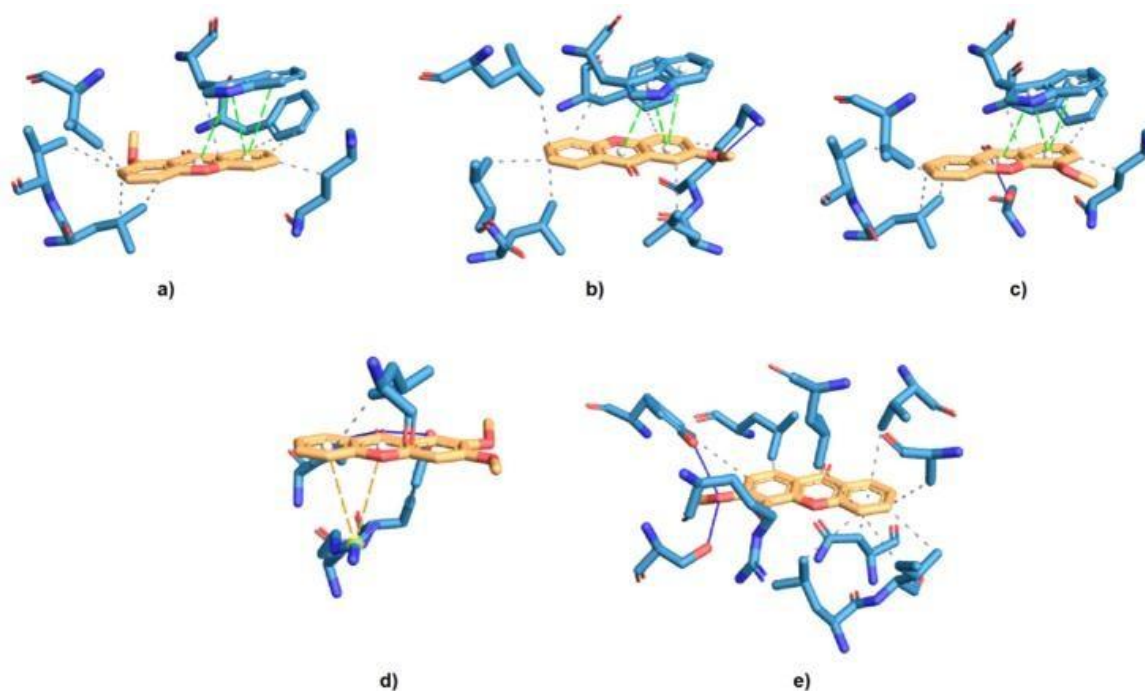
A figura 100b mostra a melhor pose de encaixe para o maior valor de pontuação de docagem para a interação ASH:2MXT no sítio I de Sudlow. Os resultados da docagem molecular sugerem que interações hidrofóbicas, uma interação por ligação de hidrogênio e interações por empilhamento  $\pi$  estão envolvidas no processo de interação. Os resíduos de aminoácidos Leu-198, Lys-199, Phe-211, Trp-214, Leu-347, Leu-481, e Val-482 interagem por meio de forças hidrofóbicas com os grupos apolares do ligante, como o anel aromático, com distâncias de 2,82; 2,55; 3,71; 3,61; 3,73; 3,14 e 3,33Å, respectivamente. O resíduo de aminoácido Lys-199 também interage por meio de ligação de hidrogênio, com distância de 3,06Å, enquanto que o resíduo de aminoácido Trp-214 também interage por meio de empilhamento  $\pi$  com os anéis aromáticos, com distâncias de 3,69; 3,61 e 4,08Å, como mostrado na tabela 42.

A figura 100c mostra a melhor pose de encaixe para o maior valor de pontuação de docagem para a interação ASH:4MXT no sítio I de Sudlow. Os resultados da docagem molecular sugerem que interações hidrofóbicas, uma interação por ligação de hidrogênio e interações por empilhamento  $\pi$  estão envolvidas no processo de interação. Os resíduos de aminoácidos Lys-199, Trp-214, Val-344 e Val-482 interagem por meio de forças hidrofóbicas com os grupos apolares do ligante, com distâncias de 2,71; 3,77; 2,77 e 3,64Å, respectivamente. O resíduo de aminoácido Phe-211 interage por meio de forças hidrofóbicas com os grupos apolares do ligante com distâncias de 3,41 e 3,26Å. O resíduo de aminoácido Leu-481 interage por meio de forças hidrofóbicas com os grupos apolares do ligante com distâncias de 3,11 e 3,63Å. O resíduo de aminoácido Ser-202 interage por meio de ligação de hidrogênio, com distância de 2,27Å. O resíduo de aminoácido Trp-214 interage por meio de

empilhamento  $\pi$  com os anéis aromáticos, com distâncias de 3,78; 3,57 e 3,99Å, como mostrado na tabela 42.

Para a interação ASH:23MXT e ASH:34MXT, a Figura 100d mostra a melhor pose de encaixe para o maior valor de pontuação de docagem para a interação ASH:23MXT no sítio II de Sudlow. Os resultados da docagem molecular sugerem que uma interação hidrofóbica, interações de ligação de hidrogênio e interações por empilhamento  $\pi$ -cátion estão envolvidas no processo de interação. O resíduo de aminoácido Leu-387 interage por meio de força hidrofóbica com grupo apolar do ligante, com distância de 3,59Å. Os resíduos de aminoácidos Tyr-411 e Lys-414 interagem por meio de interações de hidrogênio, com distâncias de 2,13 e 2,55Å, respectivamente. O resíduo de aminoácido Arg-410 interage por meio de empilhamento  $\pi$ -cátion, com distâncias de 4,42 e 4,40Å, como mostrado na tabela 43.

A figura 100e mostra a melhor pose de encaixe para o maior valor de pontuação de docagem para a interação ASH:34MXT no sítio II de Sudlow. Os resultados da docagem molecular sugerem que interações hidrofóbicas e interações de ligação de hidrogênio estão envolvidas no processo de interação. Os resíduos de aminoácidos Leu-387, Asn-391, Leu-407, Tyr-411, Val-433, Ala-449 e Leu-453 interagem por meio de forças hidrofóbicas com os grupos apolares do ligante, com distâncias de 3,80; 3,56; 3,60; 3,87; 2,97; 3,43 e 3,51Å, respectivamente. O resíduo de aminoácido Ile-388 interage por meio de forças hidrofóbicas com os grupos apolares do ligante com distâncias de 3,56 e 3,38Å. Os resíduos de aminoácidos Tyr-411, Arg-485 e Ser-489 interagem por meio de interações de hidrogênio, com distâncias de 2,19; 2,60 e 2,21Å respectivamente, como mostrado na tabela 43.



**Figura 100.** Melhor pose de pontuação de docagem para **a)** ASH:1MXT no sítio I de Sudlow, **b)** ASH:2MXT no sítio I de Sudlow, **c)** ASH:4MXT no sítio I de Sudlow, **d)** ASH:23MXT no sítio II de Sudlow e, **e)** ASH:34MXT no sítio II de Sudlow, obtido pelo programa GOLD 2022.3.0 (função ChemPLP). A estrutura do ligante está representada em laranja, os resíduos de aminoácidos selecionados (estão em azul claro; oxigênio: vermelho; e nitrogênio: azul escuro). As interações hidrofóbicas estão representadas por linhas pontilhadas em cinza, as interações de ligação de hidrogênio estão representadas em linhas contínuas em azul e as interações de empilhamento  $\pi$  estão representadas em linhas tracejadas em verde.

**Tabela 42.** Resíduos de aminoácidos que participam da interação ASH/1MXT, ASH/2MXT e ASH/4MXT com o Sítio I da ASH e as respectivas distâncias de interação.

Composto	Aminoácido	Interação	Distância (Å)
1MXT	Lys-199	Hidrofóbica	2,73
	Phe-211	Hidrofóbica	3,47
	Phe-211	Hidrofóbica	3,28
	Trp-214	Hidrofóbica	3,82
	Val-344	Hidrofóbica	2,97
	Leu-481	Hidrofóbica	3,52
	Leu-481	Hidrofóbica	3,34
	Val-482	Hidrofóbica	3,79
	Trp-214	Empilhamento $\pi$	4,03
	Trp-214	Empilhamento $\pi$	3,71
	Trp-214	Empilhamento $\pi$	4,20
2MXT	Leu-198	Hidrofóbica	2,82
	Lys-199	Hidrofóbica	2,55
	Phe-211	Hidrofóbica	3,71
	Trp-214	Hidrofóbica	3,61
	Leu-347	Hidrofóbica	3,73
	Leu-481	Hidrofóbica	3,14
	Val-482	Hidrofóbica	3,33
	Lys-199	Ligação de hidrogênio	3,06
	Trp-214	Empilhamento $\pi$	3,69
	Trp-214	Empilhamento $\pi$	3,61
	Trp-214	Empilhamento $\pi$	4,08
4MXT	Lys-199	Hidrofóbica	2,71
	Phe-211	Hidrofóbica	3,41
	Phe-211	Hidrofóbica	3,26
	Trp-214	Hidrofóbica	3,77
	Val-344	Hidrofóbica	2,77
	Leu-481	Hidrofóbica	3,11
	Leu-481	Hidrofóbica	3,63
	Val-482	Hidrofóbica	3,64
	Ser-202	Ligação de hidrogênio	2,27
	Trp-214	Empilhamento $\pi$	3,78
	Trp-214	Empilhamento $\pi$	3,57
	Trp-214	Empilhamento $\pi$	3,99



**Tabela 43.** Resíduos de aminoácidos que participam da interação ASH/23MXT e ASH/34MXT com o Sítio II da ASH e as respectivas distâncias de interação.

Composto	Aminoácido	Interação	Distância (Å)
<b>23MXT</b>	Leu-387	Hidrofóbica	3,59
	Tyr-411	Ligação de hidrogênio	2,13
	Lys-414	Ligação de hidrogênio	2,55
	Arg-410	$\pi$ -cátion	4,42
	Arg-410	$\pi$ -cátion	4,40
<b>34MXT</b>	Leu-387	Hidrofóbica	3,80
	Ile-388	Hidrofóbica	3,56
	Ile-388	Hidrofóbica	3,38
	Asn-391	Hidrofóbica	3,56
	Leu-407	Hidrofóbica	3,60
	Tyr-411	Hidrofóbica	3,87
	Val-433	Hidrofóbica	2,97
	Ala-449	Hidrofóbica	3,43
	Leu-453	Hidrofóbica	3,51
	Tyr-411	Ligação de hidrogênio	2,19
	Arg-485	Ligação de hidrogênio	2,60
	Ser-489	Ligação de hidrogênio	2,21

## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 Conclusão para os derivados da tiossemicarbazona

O principal mecanismo de supressão da fluorescência para todos os compostos estudados foi determinado como estático, indicando uma associação no estado fundamental entre ASH e UTS, DFTS ou TFTS. Estudos por fluorescência resolvida no tempo confirmaram o mecanismo de supressão estática, devido à não variação, dentro do erro experimental, no tempo de vida da fluorescência da albumina na ausência e na presença dos fármacos potenciais.

Os valores da constante de interação de Stern–Volmer ( $K_a$ ) são da ordem de  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , mostrando uma interação moderada entre os potenciais fármacos antitripanossômicas com ASH e os resultados de DC indicaram uma fraca perturbação na estrutura secundária da albumina. Parâmetros termodinâmicos sugeriram que o processo de interação é conduzido entropicamente ( $\Delta S^\circ > 0$ ) e entálpicamente ( $\Delta H^\circ < 0$ ), com valores de variação de energia livre de *Gibb* favoráveis ( $\Delta G^\circ < 0$ ).

As interações hidrofóbicas e as interações de hidrogênio são as principais forças de interação para a associação entre as-tiossemicarbazonas e a albumina. A fluorescência síncrona não indicou nenhuma perturbação significativa no microambiente dos resíduos Tyr e Trp após a interação da albumin com o ligante. Os experimentos de interação competitiva na presença dos marcadores de sítio varfarina, ibuprofeno e digitoxina sugerem que UTS, DFTS e TFTS competem pelo mesmo sítio de interação da varfarina, indicando o sítio I como o principal sítio de interação para todos os compostos estudados.

Os resultados do docagem molecular sugeriram que o UTS está interagindo com os resíduos Trp-214, Leu-480 e Arg-484; DFTS com resíduos Phe-210, Trp-214, Glu-449 e Ser-453 e TFTS com resíduos Phe-210, Trp-214 e Ser-453. Em todos os casos, interações de hidrogênio e interação hidrofóbica são as principais forças de interação para a associação entre ASH:UTS, ASH:DFTS e ASH:TFTS.

No geral, todos os potenciais fármacos antitripanossômicos estudadas podem ser transportadas e distribuídas na corrente sanguínea pela ASH. A presença de átomos de flúor na estrutura do ligante não alterou significativamente os parâmetros de interação.

## 6.2 Conclusão para os derivados da metformina

Os três novos derivados halogenados da metformina MFCl, MFBr e MF3CF<sub>3</sub> podem interagir com ASH via um mecanismo de supressão estático, o que pode ser confirmado pelo estudo do decaimento de fluorescência da albumina resolvida no tempo na ausência e na presença das metforminas. A interação entre cada metformina halogenada e ASH é moderada ( $K_a$  e  $K_b$   $10^4$  M<sup>-1</sup>), espontânea ( $\Delta G^\circ < 0$ ) e conduzida entropicamente ( $\Delta S^\circ > 0$ ).

O dicróismo circular indicou fraca perturbação na estrutura secundária da albumina após a interação do ligante, e resultados de fluorescência síncrona indicaram que MFCl, MFBr e MF3CF<sub>3</sub> não perturbam o microambiente ao redor dos resíduos Tyr, mas os mesmos compostos podem perturbar o microambiente ao redor do resíduo Trp-214. Cada derivado da metformina pode se ligar em apenas um sítio da proteína ( $n = 1$ ), e estudos de interação competitiva na presença de varfarina, ibuprofeno ou digitoxina indicaram o subdomínio IIA (sítio I de Sudlow) como o principal sítio de interação.

Os resultados do docking molecular sugeriram interações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e van der Waals como as principais forças de interação entre cada um destes compostos e os resíduos de aminoácidos dentro do subdomínio IIA da estrutura da ASH. Cálculos químicos quânticos sugeriram grupos imino com os potenciais eletrostáticos negativos mais intensos, enquanto o potencial eletrostático positivo está localizado nos átomos de hidrogênio em N,N-dimetil e os sistemas fenila, que podem ajudar nas interações hidrofóbicas.

No geral, os derivados halogenados da metformina apresentaram melhores parâmetros de interação para ASH do que a fármaco comercial.

### 6.3 Conclusão para análogo da chalcona

A diminuição dos valores de  $K_{SV}$  com o aumento da temperatura, assim como os valores de  $k_q$  da ordem de  $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , indicam a existência de uma interação ASH/IC9 no estado fundamental, caracterizando um mecanismo estático de supressão da fluorescência. Decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo confirmaram o mecanismo estático. A constante de interação de Stern-Volmer modificada ( $K_a = 10^4 \text{ M}^{-1}$ ), bem como os parâmetros termodinâmicos indicam uma interação moderada entre o inibidor de hMAO-B IC9 e ASH, sendo conduzida entalpicamente e entropicamente.

A interação é espontânea e causa fraca perturbação na estrutura secundária da albumina, bem como no microambiente ao redor do resíduo Trp. Existe apenas um sítio principal de interação para IC9, que está localizado no subdomínio IIA, onde pode ser encontrado o resíduo Trp-214 (sítio I de Sudlow).

Cálculos de docagem molecular sugeriram que IC9 pode interagir via ligação de hidrogênio, forças hidrofóbicas e eletrostáticas com os resíduos de aminoácidos Leu-197, Trp-214, Val-342, Lys-443, Pro-446 e Ser-453. O cálculo químico quântico sugeriu que a presença de um átomo de bromo está apoiando a capacidade de interação de IC9 a ASH eletrostaticamente.

No geral, ASH pode ser um bom carreador e biodistribuidor para o potencial inibidor de hMAO-B IC9 na corrente sanguínea humana.

## 6.4 Conclusão para os derivados da xantona

O principal mecanismo de supressão de fluorescência para todas as xantonas estudadas foi determinado como estático, indicando uma associação do estado fundamental com 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT. Os valores da constante de interação de Stern-Volmer ( $K_a$ ) são da ordem de  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , mostrando uma interação moderada entre os derivados da xantona com ASH, com os resultados de DC indicando uma fraca perturbação na estrutura secundária da albumina.

Parâmetros termodinâmicos sugeriram que o processo de interação é conduzido entropicamente ( $\Delta S^\circ > 0$ ) e entálpicamente ( $\Delta H^\circ < 0$ ), com valores de variação de energia livre de Gibbs favoráveis ( $\Delta G^\circ < 0$ ). Os experimentos de interação competitiva na presença dos marcadores de sítio varfarina, ibuprofeno e digitoxina sugerem que 1MXT, 2MXT, 4MXT, 23MXT e 34MXT competem por sítios de interação relativamente diferentes. Enquanto os compostos monometoxilados 1MXT, 2MXT e 4MXT preferem, em diferentes graus, complexar preferencialmente no sítio da varfarina (sítio I), os compostos dimetoxilados têm uma maior tendência em complexação com o sítio do ibuprofeno (sítio II).

Os estudos de modelagem molecular indicam que os processos de interação das metoxixantonas 1MXT, 2MXT e 4MXT, localizadas no sítio I (Sudlow), ocorrem principalmente com os resíduos de aminoácidos Lys-199, Phe-211, Trp-214, Val-344, Leu-481 e Val-482, enquanto as metoxixantonas 23MXT e 34MXT, localizadas no sítio II (Sudlow), interagem preferencialmente com os resíduos de aminoácidos Arg-117, Ile-142, Tyr-138, Tyr-161 e Arg-186.

No geral, todos os potenciais fármacos com potencial atividade anticâncer estudadas podem ser transportadas e distribuídas na corrente sanguínea pela ASH. A presença de grupos metoxila na estrutura do ligante não alterou significativamente os parâmetros de interação como  $K_{sv}$ ,  $K_a$ ,  $n$  e  $K_b$ , mas apresentaram relativa influência sobre os parâmetros termodinâmicos, refletindo o efeito da deslocalização eletrônica exercida pelos átomos de oxigênio dos grupos metoxila tanto com respeito à posição como em número de grupos substituintes, como pode ser observado para o composto 1MXT apresentando menor contribuição entálpica entre todos os compostos estudados deve estar correlacionado com efeitos estérico e consequentemente reduzindo as interações hidrofílicas como as interações de hidrogênio. Por outro lado, grupos metoxila em posição *para* em relação á carbonila, favorecem interações hidrofílicas tais como as interações de hidrogênio e dipolo-dipolo

refletindo em maiores contribuições entálpicas para a espontaneidade das complexações como observado para os compostos 23MXT e 34MXT.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abegão, L. M. G.: *Propriedades ópticas não lineares de compostos orgânicos: chalconas e corantes de oxazóis*; 2017 126 p. (Tese de doutorado), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

Abid, O. R.; Khalid, M.; Hussain, M. T.; Hanif, M.; Qadeer, G.; Rama, N. H.; Kornienko, A.; Khan, K. M.; *J. Fluor. Chem.*; 2012, 135, 240-245.

Abou-Zied, O. K.; *Current Pharmaceutical Design*, 2015, 21, 1800-1816

Abram, S.; Maichle-Mössmer, C.; Abram, U.; *Polyhedron*; 1998, 17, 131-143.

Adasme, M. F.; Linnemann, K. L.; Bolz, S. N.; Kaiser, F.; Salentin, S.; Haupt, V. J.; Schroeder, M.; *Nucleic Acids Research*; 2021, 49 (1), 530-534.

Ahmad, B.; Parveen, S.; Khan, R. H.; *Biomacromolecules*; 2006, 7, 1350-1356.

Alberts, B.; Johnson A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.; *Molecular Biology of the Cell. Garland Science* 2002.

Alderson, P.; Bunn, F.; Lefebvre, C.; Li, W. P.; Li, L.; Roberts, I.; Schierhout, G.; *Cochrane Database Syst. Rev.*; 2004, 18, CD001208.

Aldini, G.; Gamberoni, L.; Orioli, M.; *J Mass Spectrom*; 2006, 41, 1149-61.

Alexander, M. R.; Alexander, B.; Mustion, A. L.; Spector, R.; Wright, C. B.; *J. Am. Med. Assoc.*; 1982, 2, 247, 831-833.

Allen, F. H.; Kennard, O.; Taylor, R.; *Acc. Chem. Res.*; 1983, 16 (5), 146-153.

Andei, E *Compêndio Médico: Dicionário Brasileiro de Medicamentos*, Editora Andrei, 38ª ed. 2016.

Antonini, I.; Claudi, F.; Franchetti, P.; Grifantini, M.; Marteli, S.; *J. Med. Chem.*; 1977, 20 (3), 447-449.

Anwar, M. A.; Kheir, W. A.; Eid, S.; Fares, J.; Liu, X.; Eid, A. H.; Eid, A. A.; *J. Cancer*; 2014, 5 (9), 736-744.

Artali, R.; Bombieri, G.; Calabi, L.; Del Pra, A.; *Il Farmaco*; 2005, 60, 485-495.

Ascenzi, P.; Colasanti, M.; Persichini, T.; Muolo, M.; Polticelli, F.; Venturini, G.; Bordo, D.; Bolognesi, M.; *Biol. Chem.*; 2000, 381, 623-627.

Ascenzi, P.; di Masi, A.; De Sanctis, G.; Coletta, M.; Fasano, M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 2009, 387, 83-86.

Ascenzi, P.; di Masi, A.; Fanali, G.; Fasano, M.; *Cell Death Discov.*; 2015, 1, 15025.

Ascenzi, P.; di Masi, A.; Leboffe, L.; Alberio, T.; Fanali, G.; Fasano, M.; *IUBMB Life*; 2013, 65 (6), 544-549.

Ascenzi, P.; Fanali, G.; Fasano, M.; Pallottini, V.; Trezza, V.; *J. Mol. Struct.*; 2014, 1077, 4-13

Ascenzi, P.; Fasano, M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 2007, 353, 469-474.

Ascenzi, P.; Fasano, M.; *Biophys. Chem.*; 2010, 148 (1-3), 16-22.

Ascenzi, P.; Gioia, M.; Fanali, G.; Coletta, M.; Fasano, M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 2012, 424 (3), 451-455.

Bailey, C. J.; Day, C.; *Pract. Diabetes Int.*; 2004, 21, 115-117.

Bar-Or, D.; Rael, L. T.; Lau, E. P.; Rao, N. K.; Thomas, G. W.; Winkler, J. V.; Yukl, R. L.; Kingston, R. G.; Curtis, C. G.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 2001, 284 (3), 856-862.

Basken, N. E.; Mathias, C. J.; Green, M. A.; *J. Pharm. Sci.*; 2009, 98 (6), 2170-2179.

Basuli, F.; Ruf, M.; Pierpont, C. G.; Bhattacharya, S.; *Inorg. Chem.*; 1998, 37 (23), 6113-6116.

Bayach, I.; D'Aleó, A.; Trouillas, P.; *J. Phys. Chem. A*, 2019, 123, 194.

Becker, G. J.; *Kidney Int*; 2004, 66, 16-17.

Benedetti, F.; Berti, F.; Bidoggia, S.; *Org. Biomol. Chem.*; 2011, 9 (12), 4417-4420.



Bennhold, H., Peters, H., Roth, E.; *Ober einen Fall von kompletter Analbuminaemie ohne wesentliche klinische Krankheitszeichen. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.*; 1954, 60, 630-634.

Berde, C. B.; Hudson, B. S.; Simoni, R. D.; Sklar, L.; *J Biol Chem*; 1979, 254, 391-400.

Berg J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; *Biochemistry*; WH Freeman & Company Limited 2002.

Berger, V.; Richter, F.; Zettlitz, K.; Unverdorben, F.; Scheurich, P.; Herrmann, A.; Pfizenmaier, K.; Kontermann, R. E.; *Protein Eng. Des. Sel.*; 2013, 26, 581-587.

Bertucci, C.; Domenici, E.; *Curr. Med. Chem.*; 2002, 9, 1463-1481.

Bertucci, C.; Nanni, B.; Raffaelli, A.; Salvadori, P.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 1998, 18 (1-2), 127-136.

Bertucci, C.; Pistolozzi, M.; De Simone, A.; *Anal. Bioanal. Chem.*; 2010, 398, 155-166.

Bharti, N.; Shailendra; Sharma, S.; Naqvi, F.; Azam, A.; *Bioorg. Med. Chem.*; 2003, 11 (13), 2923-2929.

Bhattacharya, A. A.; Curry, S.; Franks, N. P.; *J. Biol. Chem.*; 2000, 275 (49), 38731-38738.

Bhattacharya, A. A.; Grüne, T.; Curry, S.; *J. Mol. Biol.*; 2000, 303, 721-732.

Birdsall, B.; King, R. W.; Wheeler, M. R.; Lewis, C. A.; Goode, S. R.; Dunlap, R. B.; *Analytical Biochemistry*; 1983, 132 (2), 353-361.

Birkett, D. J.; Myers, S. P.; Sudlow, G.; *Molecular Pharmacology*; 1977, 13 (6), 987-992.

Blindauer, C. A.; Harvey, I.; Bunyan, K. E.; Stewart, A. J.; Sleep, D.; Harrison, D. J.; Berezenko, S.; Sadler, P. J.; *Biol. Chem.*; 2009, 284 (34), 23116-23124.

Bolin, C. M.; Basha, R.; Cox, D.; Zawia, N. H.; Maloney, B.; Lahiri, D. K.; Cardozo-Pelaez, F.; *FASEB J*; 2006, 20, 788-790.

Bordbar, A. K.; Taheri-Kafrani, A.; Mousavi, S. H.; Haertle, T.; *Arch Biochem Biophys*; 2008, 470, 103-110.

Borisover, M. D.; Sirotkin, V. A.; Solomonov, B.N.; *Thermochim Acta*; 1996, 284, 263-277.

- Bourdon, E.; Loreau, N.; Lagrost, L.; Blache, D.; *Free Radic. Res.*; 2005, 39, 15-20.
- Bräse, S.; Encinas, A.; Keck, J.; Nising, C. F.; *Chem. Rev.*; 2009, 109, 3903-3990.
- Braslavsky, S. E.; *Pure Appl. Chem.*; 2007, 79, 293-465.
- Brune, D.; Kim, S.; *Biophysics*; 1993, 90, 3835-3839.
- Burke, T. G.; Carter, D. C.; *United States Patent* 7691872, 2010.
- Buttar, D.; Colclough, N.; Gerhardt, S.; MacFaul, P. A.; Phillips, S. D.; Plowright, A.; Whittamore, P.; Tam, K.; Maskos, K.; Steinbacher, S.; Steuber, H.; *Bioorg. Med. Chem.*; 2010, 18, 7486-7496.
- Callis, P. R.; Liu, T.; *J. Phys. Chem. B*; 2004, 108, 4248-4259.
- Campbell, R. K.; White Jr, J. R.; Saulie, B. A.; *Clinical Therapeutics*; 1996, 18 (3), 360-371.
- Carter, D. C.; Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 7th ed.; Abraham, D. J., Rotella, D. P., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2010, 437-467.
- Carter, D. C.; He, X. M.; Munson, S. H.; Twigg, P. D.; Gernert, K. M.; Broom, B.; Miller, T. Y.; *Science*, 1989, 244, 1195-1198.
- Carter, D. C.; Ho, J. X.; Rüker, F.; *US Pat.*; 1999, 5, 948, 609.
- Carter, D. C.; Ho, J.; Wang, Z. *United States Patent Application* 20070043509, 2007.
- Carter, D. C.; Ho, J.; Wang, Z.; *United States Patent Application* 20070219767, 2007.
- Carter, D. C.; *United States Patent* 7439077, 2008.
- Carter, D.; Ho, J. X.; *Adv Protein Chem*; 1994, 45, 153-203.
- Caruso, Í. P.; Filho, J. M. B.; de Araújo, A. S.; de Souza, F. P.; Fossey, M. A.; Cornélio, M. L.; *Food Chem.*; 2016, 196, 935-942.
- Casas, J. S.; Garcia-Tasende, M. S.; Sordo, J.; *Coord. Chem. Rev.*; 2000, 209, 197-261.

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 (10), 19526-19539.

Chaves, O. A.; Calheiro, T. P.; Netto-Ferreira, J. C.; de Oliveira, M. C. C.; Franceschini, S. Z.; de Salles, C.M. C.; Zanatta, N.; Frizzo, C. P.; Iglesias, B. I.; Bonacorso, H. G.; *International Journal of Biological Macromolecules*; 2020, 160, 1114-1129.

Chaves, O. A.; Cesarin-Sobrinho, D.; Sant'Anna, C. M. R.; de Carvalho, M. G.; Suzart, L. R.; Catunda-Junior, F. E. A.; Netto-Ferreira, J. C.; Ferreira, A. B. B.; *J. Photochem. Photobiol. A*; 2017, 336, 32-41.

Chaves, O. A.; de Castro, I. C.; Goulart, C. M.; Bellieny, M. S. S.; Netto-Ferreira, J. C.; Echevarria-Lima, J.; Echevarria, A.; *Investigational New Drugs*; 2019, 37, 994-1005.

Chaves, O. A.; Fernandes, T. V. A.; de Melos, J. L. R.; Netto-Ferreira, J. C.; Echevarria, A.; *Journal of Molecular Liquids*; 2020, 310, 113117.

Chaves, O. A.; Mathew, B.; Cesarin-Sobrinho, D.; Lakshminarayanan, B.; Joy, M.; Mathew, G. E.; Suresh, J.; Netto-Ferreira, J. C.; *Journal of Molecular Liquids*; 2017, 242, 1018-1026.

Chaves, O. A.; Mathew, B.; Joy, M.; Lohidakshan, K. K.; Marathakam, A.; Netto-Ferreira, J. C.; *Journal of Molecular Liquids*; 2018, 260, 186-194.

Chaves, O. A.; Mathew, B.; Sobrinho, D. C.; Lakshminarayanan, B.; Joy, M.; Mathew, G. E.; Suresh, J.; Netto-Ferreira, J. C.; *J. Mol. Liq.*; 2017, 242, 1016-1026.

Chaves, O. A.; Oliveira, C. H. C. S.; Ferreira, R. C.; Melos, J. L. R.; Rodrigues-Santos, C. E.; Echevarria, A.; Cesarin-Sobrinho, D.; *J. Fluor. Chem.*; 2017, 199, 103-112.

Chaves, O. A.; Oliveira, C. H. C. S.; Ferreira, R. C.; Robson Pacheco Pereira, R. P.; Melos, J. L. R.; Rodrigues-Santos, C. E.; Echevarria, A.; Cesarin-Sobrinho, D.; *Journal of Fluorine Chemistry*; 2017, 199, 103-112.

Chaves, O. A.; Pereira, R. P.; *SDRP J. Food Sci. Technol.*; 2017, 2, 1-8.

Chaves, O. A.; Pires, L. O.; Castro, R. N.; Sant'Anna, C. M. R.; Netto-Ferreira, J. C.; *Rev. Virtual Quim.*; 2019, 11 (5), 1562-1578.

Chaves, O. A.; Santos, M. R. L.; de Oliveira, M. C. C.; Sant'Anna, C. M. R.; Ferreira, R. C.; Echevarria, A.; Netto-Ferreira, J. C.; *J. Mol. Liq.*; 2018, 254, 280-290.

Chaves, O. A.; Santos, M. R. L.; de Oliveira, M. C. C.; Sant'Anna, C. M. R.; Ferreira, R. C.; Echevarria, A.; Netto-Ferreira, J. C.; *J. Mol. Liq.*; 2018, 254, 280-290.

Chaves, O. A.; Schaeffer, E.; Sant'Anna, C. M. R.; Netto-Ferreira, J. C.; Cesarin-Sobrinho, D.; Ferreira, A. B. B.; *Mediterr. J. Chem.*; 2016, 5, 331-339.

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.*; 2016, 27 (10), 1858-1865.

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.*; 2016, 27, 1858-1865.

Chaves, O. A.; Soares, M. A. G.; de Oliveira, M. C. C.; *Carbohydrate Reseach*; 2021, 501, 108274.

Chaves, O.A.; Teixeira, F. S. M.; Guimarães, H. A.; Braz-Filho, R.; Vieira, I. J. C.; Sant'Anna, C. M. R.; Netto-Ferreira, J. C.; Cesarin-Sobrinho, D.; Ferreira, A. B. B.; *J. Braz. Chem. Soc.*; 2016, 28 (7), 1229-1236.

Chen, Y. H.; Yang, J. T.; Martinez, H. M.; *Biochem.*; 1972, 11 (22), 4120-4131.

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

Cheng, Z.; Liu, R.; Jiang, X.; *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*; 2013, 115, 92–105.

Choi, S.; Choi, E. Y.; Kim, D. J.; Kim, J. H.; Kim, T. S.; Oh, S. W.; *Clin. Chim. Acta*; 2004, 339, 147-156.

Christopoulos, A.; Kenakin, T.; *Pharmacol Rev.*; 2002, 54, 323–374.

Coar, T.; *The Aphorisms of Hippocrates with a Translation into Latin and English*. Longman & Co., London.; 1822.

Cohn, E.J.; *Chem. Rev.*; 1941, 28, 395-417.

Colmenarejo G.; *Med Res Rev*; 2003, 23, 275-301.

Condict, L.; Kasapis, S.; *Food Hydrocolloids*; 2022, 124, 107219.

Cordeiro, Y. M. L. *Bases estruturais e termodinâmicas para conversão conformacional da proteína do prion e possíveis implicações sobre a patogenia*. Tese de Doutorado, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Fevereiro, 2005.

Cramer, F. J.; Nordberg, P. A.; Hajdu, J.; Lejon, S.; *FEBS Lett*; 2007, 581, 3178-3182.

Crews, P.; Rodríguez, J.; Jaspars, M.; *Organic structure analysis*, 1th ed., Oxford University Press, Inc: New York, 1998.

Curry, S.; *Drug Metab. Pharmacokinet.*; 2009, 24 (4), 342-357.

Curry, S.; Mandelkow, H.; Brick, P.; Franks, N.; *Nat Struct Biol*; 1998, 5, 827-835.

Curry, S.; Brick, P.; Franks, N. P.; *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*; 1999, 1441, 131-140.

Cusi, K.; Defronzo, R. A.; *Diabetes Rev.*; 1998, 6 (2), 89-131.

Custodio, J. M. F.; Moreira, C. A.; Valverde, C.; de Aquino, G. L. B.; Baseia, B.; Napolitano, H. B.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 2018, 29 (2), 258-268.

Custodio, J. M. F.; Santos, F. G.; Vaz, W. F.; Cunha, C. E. P.; Silveira, R. G.; Anjos, M. M.; Campos, C. E. M.; Oliveira, G. R.; Martins, F. T.; da Silva, C. C.; Valverde, C.; Baseia, B.; Napolitano, H. B.; *Journal of Molecular Structure*, 2018, 1157, 210-221.

D'Arcy, P. F.; McElnay, J. C.; *Pharmacol. Ther.*; 1982, 17 (2), 211-220.

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.; *J. Fluorine Chem.*; 2016, 190, 81-88.

DeLano, W.L.; *The PyMOL Molecular Graphics System*; 2002; Delano Scientific, San

Carlos.Denis, P.S.; *Memoire sur le Sang. Bailliere et Fils*, Paris; 1859.

Dessy, G.; Fares, V.; Scaramuzza, L.; Tomlinson, A. A. G.; De Munno, G.; *J. Chem. Soc.; Dalton Trans.*; 1978, 1549.

di Masi, A.; Leboffe, L.; Trezza, V.; Fanali, G.; Coletta, M.; Fasano, M.; Ascenzi, P.; *Curr. Pharm. Des.*, 2015, 21 (14), 1837-1847.

Diaz, N.; Suarez, D.; Sordo, T. L.; Merz Jr, K. M.; *J Med Chem*; 2001, 44, 250-260.

Ding, A.; Ojingwa, J. C.; McDonagh, A. F.; Burlingame, A. L.; Benet, L. Z.; *Proc Natl Acad Sci USA*; 1993, 90, 3797-3801.

Dirks, B. M.; Boyer, P. D.; *Cereal Chem*; 1951, 448, 483-490.

Doweiko, J. P.; Nompleggi, D. J.; *J Parenter Enteral Nutr*; 1991, 15, 207-211.

Drmanovic, Z.; Voyatzi, S.; Kouretas, D.; Sahpazidou, D.; Papageorgiou, A.; Antonoglou, O.; *Anticancer Res*; 1999, 5B, 4113-4124.

Drzewoski, J.; Hanefeld, M.; *Pharmaceuticals (Basel)*; 2021, 14 (5), 122.

Dubois-Presle, N.; Lapique, F.; Maurice, M. H.; Fournel-Gigleux, S.; Magdalou, J.; Abiteboul, M.; Siest, G.; Netter, P.; *Mol. Pharmacol.*; 1995, 47 (3), 647-653.

Ehianeta, T. S.; Laval, S.; Yu, B.; International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Biofactors; 2016, 42 (5), 445-458.

Eid, A. A.; Ford, B. M.; Block, K.; Kasinath, B. S.; Gorin, Y.; Ghosh-Choudhury, G.; Barnes, J. L.; Abboud, H. E.; *J. Biol. Chem.*; 2010, 285 (48), 37503- 37512.

El Massry, M.; Alaeddine, L. M.; Ali, L.; Saad, C.; Eid, A. A.; *Curr Med Chem.*; 2021, 28 (12), 2328-2345.

Elsadek, B.; Kratz, F.; *J Control Release*; 2012, 157, 4-28.

Emerling, B. M.; Weinberg, F.; Snyder, C.; Burgess, Z.; Mutlu, G. M.; Viollet, B.; Budinger, G. R.; Chandel, N. S.; *Free Radic. Biol. Med.*; 2009, 46 (10), 1386-1391.

Ernst, S. R.; Cagle, F.; *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry*; 1977, 33, 235-237.

Erstad, B. L.; Gales, B. J.; Rappaport, W. D.; *Arch. Inter. Med.*; 1991, 151, 901-911.

Evans, T. W.; *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2002, 16 (5), 6-11.

Ezazi-Toroghi, S.; Ali, S. A.; Bokov, D. O.; Dareini, M.; Bahadori, M.; Mokaberi, P.; Amiri-Tehrani-zadeh, Z.; Saberi, M. R.; Chamani, J.; *Journal of the Iranian Chemical Society*; 2022, 19, 4569-4588.

Fabisiak, J. P.; Sedlov, A.; Kagan, V. E.; *Antioxid. Redox Signal.*; 2002, 4, 855-865.

Fanali, G.; Ascenzi, P.; Fasano, M.; *Biophys Chem*; 2007, 129, 29-35.

Fanali, G.; di Masi, A.; Trezza, V.; Marino, M.; Fasano, M.; Ascenzi, P.; *Mol. Aspects Med.*; 2012, 33 (3), 209-290.

Fasano, M.; Curry, S.; Terreno, E.; Galliano, M.; Fanali, G.; Narciso, P.; Notari, S.; Ascenzi, P.; *IUBMB Life*; 2005, 57 (12), 787-796.

Fasano, M.; Fanali, G.; Leboffe, L.; Ascenzi, P.; *IUBMB Life*; 2007, 59, 436-440.

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

Faure, P.; Wiernsperger, N.; Polge, C.; Favier, A.; Halimi, S.; *Clin. Sci.*; 2008, 114 (3), 251-256.

Fayed, T. A.; Awad, M. K.; *Chem Phys*; 2004, 303 (3), 317-326.

Ferreira, R. C.; Chaves, O. A.; Oliveira, C. H. C. S.; Ferreira, S. B.; Ferreira, V. F.; Sant'Anna, C. M. R.; Cesarin-Sobrinho, D.; Netto-Ferreira, J. C.; *Rev. Virtual Quim.*; 2018, 10 (2), 432-447.

Figge, J.; Rossing, T.; Fencel, V.; *J Lab Clin Med*; 1991, 117, 453-467.

Foretz, M.; Taleux, N.; Guigas, B.; Horman, S.; Beauloye, C.; Andreelli, F.; Bertrand, L.; Viollet, B.; *Med. Sci. (Paris)*; 2006, 22 (4), 381-388.

Foster, J.E.; Plasma albumin, in the plasma proteins, In: Putnam, E.W. (Ed.), *Academic Press*, New York, 1960, 1, 179-239.

Franklim, T. N.; Freire-de-Lima, L.; Chaves, O. A.; LaRocque-de-Freitas, I. F.; da Silva-Trindade, J. D.; Netto-Ferreira, J. C.; Freire-de-Lima, C. G.; Decoté-Ricardo, D.; Previato, J. O.; Mendonça-Previato, L.; de Lima, M. E. F.; *J. Braz. Chem. Soc.*; 2019, 30 (7), 1378-1394.

Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; ... & Fox, D. J.; Gaussian 09, Revision D.; 2009, 01; Gaussian, Inc., Wallingford

Furukawa, M.; Tanaka, R.; Chuang, V. T.; Ishima, Y.; Taguchi, K.; Watanabe, H.; Maruyama, T.; Otagiri, M.; *J. Control. Release*; 2011, 154, 189-195.

Galabov, B.; Ilieva, S.; Hadjieva, B.; Dinchova, E.; *J. Phys. Chem. A*; 2003, 107 (30), 5854-5861.

Galliano, M.; Kragh-Hansen, U.; Tárnoky, A. L.; Chapman, J. C.; Campagnoli, M.; Minchiotti, L.; *Clin Chim Acta*; 1999, 289, 45-55.

Gao, H.; Lei, L.; Liu, J.; Kong, Q.; Chen, X.; Hu, Z. J. *Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2004, 167, 213

Gatto, E.; Mazzuca, C.; Stella, L.; Venanzi, M.; Toniolo, C.; Pispisa, B.; *J. Phys. Chem. B*; 2006, 110, 22813-22818.

Ge, G. B.; Ai, C. Z.; Hu, W. B.; Hou, J.; Zhu, L. L.; He, G. Y.; Fang, Z. Z.; Liang, S. C.; Wang, F. Y.; Yang, L.; *Eur. J. Pharm. Sci.*; 2013, 48 (1-2), 360-369.

Geagea, A. G.; Rizzo, M.; Jurjus, A.; Cappello, F.; Leone, A.; Tomasello, G.; Gracia, C.; Al Kattar, S.; MassaadMassade, L.; Eid, A.; *Oncotarget*; 2019, 10 (13), 1284-1305.

Gelbard, G.; Vielfaure-Joly, F.; *Tetrahedron Lett.*; 1998, 39 (18), 2743-2746.



Georges, H.; Presle, N.; Buronfosse, T.; Fournel-Gigleux, S.; Netter, P.; Magdalou, J.; Lapique, F.; *Chirality*; 2000, 12 (2), 53-62.

Ghosh, R.; Kishore, N.; *Biochimie*; 2022, 193, 16-37.

Ghuman, J.; Zunszain, P. A.; Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Otagiri, M.; Curry, S.; *J. Mol. Biol.*, 2005, 353 (1), 38-52.

Goncharov, N. V.; Belinskaia, D. A.; Shmurak, V. I.; Terpilowski, M. A.; Jenkins, R. O.; Avdonin, P. V.; *Molecules*; 2017, 22, 1201.

Goodman, L. S.; Brunton, L. L.; Chabner, B.; Knollmann, B. C.; *Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*; McGraw-Hill: New York, 2011.

Gou, Y.; Yang, F.; Liang, H.; *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2016, 16, 996-1008

Govender, H.; Mocktar, C.; Kumalo, H. M.; Koorbanally, N. A.; *Phosphorus, sulfur, and silicon and the related elements*; 2019, 194 (11), 1074-1081.

Grytsai, O.; Ronco, C.; Benhida, R.; *J. Org. Chem.*; 2021, 17, 1001-1040

Gu, Q.; Kenny, J. E.; *Anal. Chem.*; 2009, 81, 420–426.

Gull, N.; Sen, P.; Khan, R. H.; Ud-Din, K.; *J. Biochem*; 2009, 145, 67–77.

Gum, E. T.; Swanson, R. A.; Alano, C.; Liu, J.; Hong, S.; Weinstein, P. R.; Panter, S. S.; *Stroke*; 2004, 35 (2), 590-595.

Gunton, J. E.; Delhanty, P. J. D.; Takahashi, S.; Baxter, R. C.; *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 2003, 88 (3), 1323-1332.

Guo, XJ.; Sun, XD.; Xu, SK.; *Journal of Molecular Structure*; 2009, 931, 55-59.

Gupta, D., Lis, C. G.; *Nutr. J.*; 2010, 9, 69-85.

Gurung, A.B.; Ali, M. A.; Lee, J.; Farah, M. A.; Al-Anazi, K. M.; Sami, H.; *Saudi Journal of Biological Sciences*; 2022, 29, 53-64.

Hardie, D. G.; Carling, D.; *Eur. J. Biochem.*; 1997, 246 (2), 259-273.

Harrowfield, J. McB.; Pakawawatchai, C.; White, A. H.; *J. Chem. Soc.; Dalton Trans.*; 1983, 1109-1113.

Hastings, G. E.; Wolf, P. G.; *Atz'h. Fam. Med.*; 1992, 1, 281-287.

Haynes, G.; Navickis, M.; Wilkes, M.; *Eur. J. Anaesthesiol.*; 2003, 20, 771-793.

He, W. Y.; Li, Y.; Si, H. Z.; Dong, Y. M.; Sheng, F. L.; Yao, X. J.; Hu, Z. D. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*; 2006, 182, 158-167.

He, W.; Chen, H.; Sheng, F.; Yao, X.; *Spectrochim. Acta A*; 2009, 74, 427-433.

He, W.; Li, Y.; Liu, J.; Hu, Z.; Chen, X.; *Biopolymers*; 2005, 79, 48-57.

He, W.; Li, Y.; Xue, C.; Hu, Z.; Chen, X.; Sheng, F.; *Bioorg. Med. Chem.*; 2005, 13, 1837.

He, X. M.; Carter, D. C.; *Nature*; 1992, 358, 209-215.

He, W.; Li, Y.; Tian, J.; Liu, H.; Hu, Z.; Chen, X. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2005, 174, 53.

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

Hegele, R. A.; *Nat. Rev. Genet.*; 2009, 10, 109-121.

Hehre, W. J.; *A guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations*; 2003, Vol. 2; Irvine, CA: Wavefunction.

Hein, K. L.; Kragh-Hansen, U.; Morth, J. P.; Jeppesen, M. D.; Otzen, D.; Møller, J. V.; Nissen, P.; *Journal of Structural Biology*; 2010, 171, 353-360.

Hervé, F.; Urien, S.; Albengres, E.; Duché, J. C.; Tillement, J. P.; *Clin Pharmacokinetics*; 1994, 26, 44-58.

Hewitt, L. E.; *I. Biochem. J.*; 1936, 30, 2229-2236.

Hinchcliffe, E.; Kenney, E.; *Eur. Patent Appl.*; 1986, 201, 239.

Hobbs, S. K.; Monsky, W. L.; Yuan, F.; Roberts, W. G.; Griffith, L.; Torchilin, V. P.; Jain, R. K.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 1998, 95 (8), 4607-4612.

<http://gradworks.umi.com/35/00/3500434.html> accessed on 10/12/2014.

<http://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>.

<http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy/5-cd-spectrometer-performance>

[https://kclpure.kcl.ac.uk/portal/files/12489435/Studentthesis-Beulah\\_Banfield\\_2014.pdf](https://kclpure.kcl.ac.uk/portal/files/12489435/Studentthesis-Beulah_Banfield_2014.pdf) accessed on 9/12/2014.

<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>

<https://www.edinst.com/blog/jablonski-diagram-2/>

Hundal, R. S.; Krssak, M.; Dufour, S.; Laurent, D.; Lebon, V.; Chandramouli, V.; Inzucchi, S. E.; Schumann, W. C.; Petersen, K. F.; Landau, B. R.; Shulman, G. I.; *Diabetes*, 2000, 49 (12), 2063-2069.

Ishikawa, T.; Harwood, L. M.; *Synlett*; 2013, 24 (19), 2507-2509.

Jayasri, B.; Rajeshwari, K.; Vasantha, P.; Anantha Lakshmi, P. V.; *Biol Trace Elem Res.*; 2023 Mar 1.

Johnson Jr., W. C.; *Annu. Rev. Biophys Biophys Chem.*; 1988, 17, 145-166.

Johnson, A. B.; Webster, J. M.; Sum, C.; Heseltine, L.; Argyraki, M.; Cooper, B. G.; Taylor, R.; *Metabolism*; 1993, 42 (9), 1217-1222.

Joshi, T.; Pierroz, V.; Mari, C.; Gemperle, L.; Ferrari, S.; Gasser, G. A.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*; 2014, 53 (11), 2960-2963.

Jouad, E. M.; Riou, A.; Allain, M.; Khan, M. A.; Bouet, G. M.; *Polyhedron*; 2001, 20, 67.

Joy, M.; Adeniyi, A. A.; Mathews, A.; Mathew, B.; Prasanth, S.; Soliman, M. E. S.; Malayan, J. J.; Anabha, E.R.; *J. Mol. Struct.*; 2017, 1127, 498-510.

Joy, M.; Alex, N.; Malayan, J. J.; Sudarsanakumar, C.; Mathews, A.; *ChemistrySelect.*; 2016, 1 (18), 5974-5981.

Kandagal, P. B.; Ashoka, S.; Seetharamappa, J.; Shaikh, S. M. T.; Jadegoud, Y.; Ijare, O. B. J. *Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 393-399.

Kandagal, P. B.; Seetharamappa, J.; Ashoka, S.; Shaikh, S. M. T.; Manjunatha, D. H.; *J. Int. J. Biol. Macromol.*; 2006, 39, 234.

Kaneko, K.; Chuang, V. T.; Minomo, A.; Yamasaki, K.; Bhagavan, N. V.; Maruyama, T.; Otagiri, M.; *IUBMB Life*; 2011, 63 (4), 277-285.

Kang, J.; Liu, Y.; Xie, M. X.; Li, S.; Jiang, M.; Wang, Y. D.; *Biochim. Biophys. Acta*; 2004, 1674, 205.

Kathuria, D.; Bankar, A. A.; Bharatam, P. V.; *J. Mol. Struct.*; 2018, 1152, 61-78.

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

Khamees, H. A.; Jyothi, M.; Khanum, S. A.; Madegowda, M.; *Journal of Molecular Structure*; 2018, 1161, 199-217.

Khan, M. A.; Muzzamil, S.; Musarrat, J. *Int. J. Biol. Macromol.* 2002, 30, 243.

Kievit, F. M.; Zhang, M.; *Adv. Mater*; 2011, 23 (36), 217-247.

Klip, A.; Leiter, L. A.; *Diabetes Care*; 1990, 13 (6), 696-704.

Koga, M.; Kasayama, S.; *Endocrine J.*; 2010, 57, 751-762.

Komatsu, T.; Ando, K.; Kawai, N.; Nishide, H.; Tsuchida, E.; *Chem. Lett.*; 1995, 813-814.

Komatsu, T.; Oguro, Y.; Teramura, Y.; Takeoka, S.; Okai, J.; Anraku, M.; Otagiri, M.; Tsuchida, E.; *Biochim. Biophys. Acta*; 2004, 1675, 21-31.

Komatsu, T.; Qu, X.; Ihara, H.; Fujihara, M.; Azuma, H.; Ikeda, H.; *J. Am. Chem. Soc.*; 2011a, 133, 3246-3248.

Komatsu, T.; Sato, T.; Boettcher, C.; *Chem. Asian. J.*; 2012a, 7 (1), 201-206.

Komatsu, T.; *Nanoscale*; 2012, 4, 1910-1918.

Kordes, S.; Pollak, M. N.; Zwinderman, A. H.; Mathôt, R. A., Weterman, M. J., Beeker, A.; Punt, C. J.; Richel, D. J.; Wilmink, J. W.; *The Lancet Oncology*; 2015, 16 (7), 839-847.

Kragh-Hansen, U.; *Biochem. J.*; 1985, 225, 629-638.

Kragh-Hansen, U.; *Pharmacol. Rev.*; 1981, 33, 17-53.

Kratochwil, N. A.; Huber, W.; Muller, F.; Kansy, M.; Gerber, P. R.; *Biochem. Pharmacol.*; 2002, 64, 1355-1374.

Kratz, F.; Elsadek, B.; *Journal of Controlled Release*; 2012, 161, 429-445.

Kratz, F.; *J. Control. Release*; 2014, 190, 331-336.

Kratz, F.; *Journal of Controlled Release*; 2008, 132, 171-183.

Kuhlmann, J.; Puls, W.; *Oral Antidiabetics; Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer: Berlin, Heidelberg, Germany, 1996, 119.

Kumar, C. V.; Chattopadhyay, S.; Das, P. K.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1983, 105 (15), 5143-5144.

Kumar, H.; Devaraji, V.; Joshi, R.; Wankar, S.; Ghosh, S. K.; *ACS Omega*; 2018, 3, 10114-10128.

Kurono, Y.; Kushida, I.; Tanaka, H.; Ikeda, K.; *Chem Pharm Bull (Tokyo)*; 1992, 40, 2169-2172.

Ladokhin, A. S.; Jayasinghe, S.; White, S. H.; *Anal. Biochem.*; 2000, 285, 235-245.

Lakowicz, J. R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; third ed., Springer, 2006.

Lauvergnat, D.; Hiberty, P. C.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1997, 119 (40), 9478-9482.

Lawn, R. M.; Adelman, J.; Bock, S. C.; Franke, A. E.; Houck, C. M.; Najarian, R. C.; Seeburg, P. H.; Wion, K. L.; *Nucleic Acids Res.*; 1981, 9, 6103-6114.

Leboffe, L.; di Masi, A.; Polticelli, F.; Trezza, V.; Ascenzi, P.; *Current Medicinal Chemistry*, 2020, 27, 4907-4931.

Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G.; *Phys. Rev. B.*; 1988, 37, 785-789.

Lee, H.; Kim, I. H.; *Free Radic. Biol. Med.*; 2001, 30, 327-333.

Lejon, S.; Cramer, J. F.; Nordberg, P.; *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.*; 2008, 64, 64-69.

Lejon, S.; Frick, I. M.; Bjorck, L.; Wikstrom, M.; Svensson, S.; *J Biol Chem*; 2004, 279, 42924-42928.

Lemes, S. R.; Adriano Júnior, L.; Manoel, D. S.; de Sousa, M. A. M.; Fonseca, R. D.; Lima, R. S.; Noda-Perez, C.; Reis, P. R. M.; Cardoso, C. G.; Silveira-Lacerda, E. P.; Souza, M. A. R.; Mendonça, C. R.; Gonçalves, P. J.; de Boni, L.; da Fonseca, T. L.; da Silva Junior, N. J.; *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*; 2018, 204, 685-695.

Levitt, D. G.; Levitt, M. D.; *Int J Gen Med*; 2016, 9, 229-255.

Levy, Y.; Onuchic, J. N.; *Annu Rev Biophys Biomol Struct*; 2006, 35, 389-415.

Lexa, K. W.; Dolgih, E.; Jacobson, M. P.; *PLoS One*; 2014, 9 (4), e93323.

Li, D.; Ji, B.; Sun, H.; *Spectrochim. Acta Part A*; 2009, 73, 35

Li, D.; Zhu, J.; Jin, J.; Yao, X. *J. Mol. Struct.* 2007, 846, 34.

Li, J.; Ren, C.; Zhang, Y.; Liu, X.; Yao, X.; Hu, Z. *J. Mol. Struct.* 2008, 885, 64.

Li, J.; Zhao, YL.; Huang, HY.; Wang, YZ.; *Am. J. Chin. Med.*; 2017, 45 (4), 667-736.

Li, M.; Lee, P.; Zhang, Y.; Ma, Z.; Yang, F.; Zhou, Z.; Wu, X.; Liang, H.; *Chem. Biol. Drug Des.*; 2014, 83 (2), 167-173.

Li, Y.; Yao, X.; Jin, J.; Chen, X.; Hu, Z. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1774, 51.

Liang, H.; Yang, F.; Lee, N.; Wu, X.; *Future Med. Chem.*; 2014, 6 (2), 119-121.

Liang, J.; Cheng, Y.; Han, H.; *J. Mol. Struct.*; 2008, 892, 116-120.

Liberati, A., Moja, L., Moschetti, I., Gensini, G. F., Gusinu, R.; *Intern. Emerg. Med.*; 2006, 1, 243-245.

Liebmann, J., Cook, J., Lipschultz, C. *et al.* Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol®) in human tumour cell lines. *Br J Cancer* **68**, 1104–1109 (1993). <https://doi.org/10.1038/bjc.1993.488>

Linciano, S.; Moro, G.; Zorzi, A.; Angelini, A.; *Journal of Controlled Release*; 2022, 348, 115-126.

Lindup, W. E.; Orme, M. C.; *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*; 1981, 282 (6259), 212-214.

Liu, F.; *Current Pharmaceutical Design*; 2015, 21, 1866-1888.

Liu, M.; Lim, Z. J.; Gwee, Y. Y.; Levina, A.; Lay, P. A.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*; 2010, 49 (9), 1661-1664.

Liyasova, M. S.; Schopfer, L. M.; Lockridge, O.; *Biochem Pharmacol*; 2010, 79, 784-791.

Lobana, T. S.; Khanna, S.; Butcher, R. J.; Hunter, A. D.; Zeller, M.; *Polyhedron*; 2006, 25, 2755-2763.

Lobana, T. S.; Kumari, P.; Butcher, R. J.; Akitsu, T.; Aritake, Y.; Perles, J.; Fernandez, F. J.; Vega, M. C.; *J. Organomet. Chem.*; 2012, 701, 17-26.

Lockridge, O.; Xue, W.; Gaydess, A.; *J Biol Chem*; 2008, 283, 22582-22590.

Lopes, N. D.; Chaves, O. A.; de Oliveira, M. C. C.; Sant'Anna, C. M. R.; Sousa-Pereira, D.; Netto-Ferreira, J. C.; Aurea Echevarria, A.; *International Journal of Biological Macromolecules*; 2018, 112, 1062-1072.

Luetscher, J.A.; *Physiol.*; 1947, 27, 621-642.

Ma, J.; Fan, Y.; Si, Q.; Liu, Y.; Wang, X.; Liu, H.; Xie, M.; *Analytical Sciences*; 2017, 33, 493-498

Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K.; *J. Control. Release.*; 2000, 65 (1-2), 271-284.

Mahmoud, M. A.; Zaitone, S. A.; Ammar, A. M.; Sallam, S. A.; *Journal of Molecular Structure*; 2016, 1108, 60-70.

Maidur, S. R.; Patil, P. S.; Ekbote, A.; Chia, T. S.; Quah, C. K.; *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*; 2017, 184, 342-354.

Maidur, S. R.; Patil, P. S.; Rao, S. V.; Shkir, M.; Dharmaprakash, S.M.; *Optics and Laser Technology*; 2017, 97, 219-228.

Makhlouf, M. M.; Radwan, A. S.; Aly, M. R. E.; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*; 2017, 332, 465-474.

Mandal, G.; Bardhan, M.; Ganguly, T.; *Colloids Surf. B Biointerfaces.*; 2010, 81 (1), 178-184.

Manoharan, I.; Boopathy, R.; *Arch. Biochem. Biophys.*; 2006, 452 (2), 186-188.

Margarson, M.; Soni, N.; *Anaesthesia*; 1998, 53, 789-803.

Masson, P.; Froment, M. T.; Darvesh, S.; Schopfer, L. M.; Lockridge, O.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*; 2007, 22 (4), 463-469.

Masters, K.S.; Bräse, S.; *Chem. Rev.*; 2012, 112 (7), 3717-3776.

Matei, I.; Hillebrand, M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 2010, 51 (3), 768-773.

Matesanz, A. I.; Herrero, J. M.; Quiroga, A. G.; *Current Topics in Medicinal Chemistry*; 2021, 21, 59-72.

Matesanz, A. I.; Souza, P.; *Mini-Rev Med Chem*; 2009, 9(12), 1389-1396.

Mathew, B.; Adeniyi, A. A.; Dev, S.; Joy, M.; Ucar, G.; Mathew, G. E.; Singh-Pillay, A.; Soliman, M. E. S.; *J. Phys. Chem. B.*; 2017a, 121 (6), 1186-1203.

Mathew, B.; Adeniyi, A. A.; Joy, M.; Mathew, G. E.; Singh-Pillay, A.; Sudarsanakumar, C.; Soliman, M. E. S.; Suresh, J.; *Journal of Molecular Structure*; 2017, 1146, 301-308.

Mathew, B.; Baek, S. C.; Parambi, D. G. T.; Lee, J. P.; Joy, M.; Rilda, P. R. A.; Randev, R. V.; Nithyamol, P.; Vijayan, V.; Inasu, S. T.; Mathew, G. E.; Lohidakshan, K. K.; Krishnang, G. K.; Kim, H.; *Med. Chem. Commun.*; 2018, 9 (11), 1871-1881



Mathew, B.; Dev, S.; Joy, M.; Mathew, G. E.; Marathakam, A.; Krishnan, G. K.; *ChemistrySelect*; 2017c, 2 (35), 11645-11652.

Mathew, B.; Baek, S. C.; Parambi, D. G. T.; Lee, J. P.; Joy, M.; Rilda, P. R. A.; Randev, R. V.; Nithyamol, P.; Vijayan, V.; Inasu, S. T.; Mathew, G. E.; Lohidakshan, K. K.; Krishnang, G. K.; Kim, H.; *Med. Chem. Commun.*; 2018, 9, 1871–1881 (Já Citado?)

Matsushita, S.; Isima, Y.; Chuang, V. T.; Watanabe, H.; Tanase, S.; Maruyama, T.; Otagiri, M.; *Pharm. Res.*; 2004, 21 (10), 1924-1932.

Means, G. E.; Bender, M. L.; *Biochemistry*; 1975, 14, 4989-4994.

Means, G. E.; Wu, H. L.; *Arch Biochem Biophys*; 1979, 194, 526-530.

Melder, R. J.; Osborn, B. L.; Riccobene, T.; Kanakaraj, P.; Wei, P.; Chen, G.; Stelow, D.; Halpern, W. G.; Migone, T. S.; Wang, Q.; Grzegorzewski, K. J.; Gallant, G.; *Cancer Immunol. Immunother.*; 2005, 54, 535-547.

Meloun, B.; Moravek, L.; Kostka, V.; *FEBS Lett*; 1975, 58, 134-137.

Mendes, E. P.; Goulart, C. M.; Chaves, O. A.; Faiões, V. S.; Canto-Carvalho, M. M.; Machado, G. C.; Torres-Santos, E. C.; Echevarria, A.; *Biomolecules*; 2019, 9, 643.

Mendez, C. M.; McClain, C. J.; Marsano, L. S.; *Nutr. Clin. Pract.*; 2005, 20, 314-320.

Michellini, L. J.; Castro, M. R. C.; Custodio, J. M. F.; Naves, L. F. N.; Vaz, W. F.; Lobón, G. S.; Martins, F. T.; Perez, C. N.; Napolitano, H. B.; *Journal of Molecular Structure*; 2018, 1168, 309-315.

Miller, Y. I.; Shaklai, N.; *Biochim. Biophys. Acta*; 1999, 1454, 153-164.

Minchiotti, L.; Galliano, M.; Kragh-Hansen, U.; Peters Jr., T.; *Hum. Mutat.*; 2008, 29, 1007-1016.

Minghetti, P. P.; Ruffner, D. E.; Kuang, W. J.; Dennison, O. E.; Hawkins, J. W.; Beattie, W. G.; Dugaiczky, A.; *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 6747-6757.

Mitchellhill, K. I.; Stapleton, D.; Gao, G.; House, C.; Michell, B.; Katsis, F.; Witters, L. A.; Kemp, B. E.; *J. Biol. Chem.*; 1994, 269 (4), 2361-2364.

Mohtat, N.; Cozens, F. L.; Scaiano, J. C.; *J. Phys. Chem. B.*; 1998, 102 (39), 7557-7562.

Montes-Gonzalez, I.; Alsina-Sánchez, A. M.; Aponte-Santini, J. C.; Delgado-Rivera, S. M.; Durán-Camacho, G. L.; *PureAppl. Chem.*; 2019, 91 (4), 653-669.

Monzani, E.; Bonafè, B.; Fallarini, A.; Redaelli, C.; Casella, L.; Minchiotti, L.; Galliano, M.; *Biochim. Biophys. Acta*; 2001, 1547, 302-312.

Mroueh, F. M.; Noureldein, M.; Zeidan, Y. H.; Boutary, S.; Irani, S. A. M.; Eid, S.; Haddad, M.; Barakat, R.; Harb, F.; Costantine, J.; Kanj, R.; Sauleau, E. A.; Ouhtit, A.; Azar, S. T.; Eid, A. H.; Eid, A. A.; *FASEB J.*; 2019, 33 (12), 14051-14066.

Muleta, F.; Alansi, T.; Eswaramoorthy, R.; *Journal of Natural Sciences Research*; 2019, 9 (17), 33-46.

Muller, D.; Karle, A.; Meissburger, B.; Hofig, I.; Stork, R.; Kontermann, R. E.; *J. Biol. Chem.*; 2007, 282 (17), 12650–12660.

Nakashima, F.; Shibata, T.; Kamiya, K.; Yoshitake, J.; Kikuchi, R.; Matsushita, T.; Ishii, I.; Giménez-Bastida, J. A.; Schneider, C.; Uchida, K.; *Sci. Rep.*; 2018, 8, 932.

Nicodem, D. E.; Matos, J. A. M. G.; *J. Photochem.*; 1981, 15 (3), 193-202.

Nijegorodov, N. I.; Downey, W. S.; *J. Phys. Chem.*; 1994, 98, 5639-5643.

Noguchi, Y.; Wu, J.; Duncan, R.; Strohm, J.; Ulbrich, K.; Akaike, T.; Maeda, H.; *Jpn. J. Cancer Res.*; 1998, 89 (3), 307-314.

Okano, L. T.; Barros, T. C.; Chou, D. T. H.; Bennet, A. J.; Bohne, C.; *J. Phys. Chem. B.*; 2001, 105 (11), 2122-2128.

Oliveira, R. B.; Souza-Fagundes, E. M.; Soares, R. P. P.; Andrade, A. A.; Krettli, A. U.; Zani, C. L.; *Eur J Med Chem*; 2008, 43(9), 1983-1988.

Otagiri, M.; Chuang, V. T.; *Biol. Pharm. Bull.*; 2009, 32, 527-534.

Otagiri, M.; *Drug Metab. Pharmacokinet.*; 2005, 20 (5), 309-323.

Ozaki, J. I.; Motomura, M.; Setoguchi, Y.; Fujio, N.; Yamamoto, K.; Kariya, T.; Sakai, T.; *Gastroenterol Jpn*; 1991, 26, 472-476.

Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T.; *Protein Sci.*; 1995, 4 (11), 2411-2423.

Paiva, R. O.; Kneipp, L. F.; Goular, C. M.; Albuquerque, M. A.; Echevarria, A.; *Ciênc. Agrotec., Lavras*; 2014, 38 (6), 531-537.

Palenik, G. J.; Rendle, D. F.; Carter, W. S.; *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*; 1974, 3 10.1002/bio.3319

Pathak, M.; Ojha, H.; Tiwari, A. K.; Sharma, D.; Saini, M.; Kakkar, R.; *Chemistry Central Journal*; 2017, 11, 132-142 plasmon resonance and fluorescence spectroscopy.

Pedro, M.; Cerqueira F.; Sousa, M. E.; Nascimento, M. S. J.; Pinto, M.; *Bioorg. Med. Chem.*; 2002, 10 (12), 3725-3730.

Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R.; *Nat Nanotechnol.*; 2007, 2, 751-760.

Peters Jr, T.; *Academic Press*, San Diego, 1995.

Petersen, C. E.; Ha, C. E.; Harohalli, K.; Park, D. S.; Bhagavan, N. V.; *Chem Biol Interact*; 2000, 124, 161-172.

Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Twine, S.; East, M.; Curry, S.; *J. Biol. Chem.*; 2001, 276, 22804-22809.

Petitpas, I.; Grüne, T.; Bhattacharya, A. A.; Curry, S.; *J. Mol. Biol.*; 2001, 314, 955-960.

Petitpas, I.; Petersen, C. E.; Ha, C. E.; Bhattacharya, A. A.; Zunszain, P. A.; Ghuman, J.; Bhagavan, N. V.; Curry, S.; *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*; 2003, 100 (11), 6440-6445.

Phuangsayai, O.; Hannongbua, S.; Gleeson, M. P.; *J Phys Chem B*; 2014, 118, 11886-11894.

Pirna, A.; Bogdan, M.; *Rom J Biophys*; 2008, 18, 49-55.

Pogam, P.; Boustie, J.; *Molecules*; 2016, 21 (3), 294.

Rabbani, G.; Lee, E. J.; Ahmad, K.; Baig, M. H.; Choi, I.; *Mol. Pharm.*; 2018, 15, 1445-1456.

Rabbani, G.; Ahn, S. N.; *International Journal of Biological Macromolecules*; 2019, 123, 979-990.

Race, J.; *Biochem. J.*; 1932, 26, 1573-1574.

Rachelin, Y. P.; Pradhan, S.; James, C.; *Spectroscopy Letters*; 2018, 51 (3), 144-154.

Rahman, A. F. M. M.; Bhattacharya, S.; Peng, X.; Kimura, T.; Kimura, T.; Komatsu, N.; *ChemComm*; 2008, 1196-1198.

Rahnama, E.; Mahmoodian-Moghaddam, M.; Khorsand-Ahmadi, S.; Saberi, M. R.; Chamani, J.; *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*; 2015, 33 (3), 513-533.

Rahnama, E.; Mahmoodian-Moghaddam, M.; Khorsand-Ahmadi, S.; Saberi, M. R.; Chamani, J.; *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*; 2015, 33 (3), 513-533.

Ray, P.; *Chem. Rev.*; 1961, 61 (4), 313-359.

Ray, R. K.; Kauffman, G. B.; Ray, R. K.; *New Age International Ltd.*: New Delhi, India; 1999.

Rena, G.; Hardie, D. G.; Pearson, E. R.; *Diabetologia*; 2017, 60 (9), 1577-1585.

Roche, M.; Rondeau, P.; Singh, N. R.; Tarnus, E.; Bourdon, E.; *FEBS Lett.*; 2008, 582 (13), 1783-1787.

Ross, P. D.; Subramanian, S.; *Biochemistry*; 1981, 20 (11), 3096-3102.

Rossetti, L.; DeFronzo, R. A.; Gherzi, R.; Stein, P.; Andraghetti, G.; Falzetti, G.; Shulman, G. I.; Klein-Robbenhaar, E.; Cordera, R.; *Metabolism*; 1990, 39 (4), 425-435.

Ryan, A. J.; Chung, C. W.; Curry, S.; *BMC Struct. Biol.*; 2011, 11, 18.

Ryan, A. J.; Ghuman, J.; Zunszain, P. A.; Chung, C. W.; Curry, S.; *J. Struct. Biol.*; 2011, 174, 84-91.

Sakurai, Y.; Ma, S. F.; Watanabe, H.; Yamaotsu, N.; Hirono, S.; Kuroono, Y.; Kragh-Hansen, U.; Otagiri, M.; *Pharm. Res.*; 2004, 21 (2), 285-292.

Sales, A. L. R.; Silla, J. M.; Neto, J. L.; Anconi, C. P. A.; *Journal of Molecular Modeling*; 2021, 27, 101.

Salsi, F.; Jungfer, M. R.; Hagenbach, A.; Abram, U.; *Eur. J. Inorg. Chem.*; 2020, 13, 1222-1229.

Salsi, F.; Portapilla, G. B.; Schutjajew, K.; Carneiro, Z. A.; Hagenbach, A.; Albuquerque, S.; Maia, P. I. S. Ulrich Abram, U.; *Journal of Fluorine Chemistry*; 2018, 215, 52-61.

Salsi, F.; Portapilla, G. B.; Simon, S.; Jungfer, M. R.; Hagenbach, A.; Albuquerque, S.; Abram, U.; *Inorg. Chem.*; 2019, 58, 10129-10138.

Salvi, A.; Carrupt, P. A.; Mayer, J. M.; Testa, B.; *Drug Metab Dispos*; 1997, 25, 395-398.

Santos, F. R.; Silva, M. T.; Netto-Ferreira, J. C.; *Quim. Nova.*; 2007, 30 (4), 897-900.

Santos, J. S.; Melos, J. L. R.; Lima, G. S.; Lyra, J. C.; Guedes, G. P.; Rodrigues-Santos, C. E.; Echevarria, A.; *Journal of Fluorine Chemistry*; 2017, 195, 31-36.

Sargent, T. D.; Wu, J. R.; Sala-Trepat, J. M.; Wallace, R. B.; Reyes, A. A.; Bonner, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1979, 76, 3256-3260.

Sashida, Y.; Ogawa, K.; Kitada, M.; Karikome, H.; Mimaki, Y.; Shimomura, H.; *Chem. Pharm. Bull*; 1991, 39 (3), 709-711.

Sasidharan, R.; Manju, S. L.; Uçar, G.; Baysal, I.; Mathew, B.; *Arch. Pharm.*, 2016, 349 (8), 627-637.

Satheeshchandra, S.; D. Haleshappa, D.; Rohith, S.; Jayarama, A.; Shetty, N.; *Physica B: Condensed Matter*; 2019, 560, 191-196.

Sbarouni, E.; Georgiadou, P.; Voudris, V.; *Clin. Chem. Lab. Med.*; 2011, 49, 177-184.

Scaiano, J. C.; de Lucas, N. C.; Andraos, J.; García, H.; *Chemical Physics Letters*; 1995, 233, 5-8.

- Scaiano, J. C.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1980, 102, 7747-7753.
- Scaiano, J. C.; Kaila, M.; Corrent, S.; *J. Phys. Chem. B*; 1997, 101, 8564-8568.
- Schmidt, S.; Gonzalez, D.; Derendorf, H.; *J. Pharm. Sci.*; 2010, 99 (3), 1107-1122.
- Sgarbossa, A.; Lenci, F.; *Journal of Fluorescence*; 2013, 23 (3), 561-567.
- Shagufta; Ahmad, I.; *Eur. J. Med. Chem.*; 2016, 116, 267-280.
- Shaikh, S. M. T.; Seetharamappa, J.; Kandal, P. B.; Manjunatha, D. H.; Ashoka, S.; *Dyes Pigments*; 2007, 74, 665.
- Sharif, M.; Reimann, S.; Villinger, A.; Langer, P.; *Synlett*; 2010, 913-916.
- Sharma, U. K.; Sharma, N.; Kumar, R.; Sinha, A. K.; *Amino Acids*; 2013, 44 (3), 1031-1037.
- Sharma, D.; Sharma, N.; Pathak, M.; Sharma, R.; Tyagi, P.; Chawla, R.; Basu, M.; Ojha, H.; *Chemical Biology Letters*; 2017, 4 (1), 27-32.
- Silva, C. C.; Chaves, O. A.; Paiva, R. O.; da Costa, G. L.; Netto-Ferreira, J. C.; Echevarria, A.; *J. Braz. Chem. Soc.*; 2020, 31 (9), 1838-1851.
- Singh, B.; Singh, R.; Bhat, R. A.; Singhd, V.; Kumar, D.; *Rev. Roum. Chim.*; 2019, 64 (8), 651-662.
- Slotta, K. H.; Tschesche, R.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges. B*; 1929, 62, 1398–1405.
- Smith, P. C.; Song, W. Q.; Rodriguez, R. J.; *Drug Metab. Dispos.*; 1992, 20 (6), 962-965.
- Song, KS.; Hou, CR.; Liu, L.; Li, XS.; Guo, QX.; *J. Photochem. Photobiol., A*; 2001, 139, 105-109.
- Sousa-Pereira, D.; Chaves, O. A.; Reis, C. M.; de Oliveira, M. C. C.; Sant'Anna, C. M. R.; Netto-Ferreira, J. C.; Aurea Echevarria, A.; *Bioorganic Chemistry*; 2018, 81, 79-87.

Sousa-Pereira, D.; de Oliveira, T. S.; Paiva, R. O.; Chaves, O. A.; Netto-Ferreira, J. C.; Echevarria-Lima, J.; Echevarria, A.; *Molecules*; 2020, 25, 2537.

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

Stella, L.; Mazzuca, C.; Venanzi, M.; Palleschi, A.; Didonè, M.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Pispisa, B.; *Biophys. J.*; 2004, 86, 936-945.

Stewart, A. J.; Blindauer, C. A.; Berezenko, S.; Sleep, D.; Tooth, D.; Sadler, P.J.; *FEBS J.*; 2005, 272, 353-362.

Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N.; *Mol. Pharmacol.*; 1975, 11, 824-832.

Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N.; *Mol. Pharmacol.*; 1976, 12, 1052-1061.

Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N.; *Mol. Pharmacol.*; 1976, 12, 1052-1061.

Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K.; *Protein Eng*; 1999, 12, 439-446.

Sui, M.; Liu, W.; Shen, Y.; *J Control Release*; 2011, 155, 227-236.

Sun, Z.; Xu, H.; Cao, Y.; Wang, F.; Mi, W.; *J. Mol. Liq.*; 2016, 219, 405-410.

Suvarapu, L. N.; Somala, A. R.; Koduru, J. R.; Baek, S. O.; Ammireddy, V. R.; *Asian Journal of Chemistry*; 2012, 24 (5), 1889-1898.

Tang, J.; Luan, F.; Chen, X.; *Bioorg. Med. Chem.*; 2006, 14, 3210

Tarasconi, P.; Capacchi, S.; Pelosi, G.; Cornia, M.; Albertini, R.; Bonati, A.; Dall'aglio, P. P.; Lunghi, P.; Pinelli, S.; *Bioorg. Med. Chem.*; 2000, 8 (1), 157-162.

Tenório, R. P.; Góes, A. J. G.; Lima, J. G.; Faria, A. R.; Alves, A. J.; Aquino, T. M.; *Quim. Nova*; 2005, 28 (6), 1030-1037.

Thomas, I.; Gregg, B.; *Pediatr. Diabetes*; 2017, 18 (1), 10-16.

Tian, S.; Li, Q.; Yao, W.; Xu, C.; *Protein Expr. Purif.*; 2013, 90, 124-128.

Tsuda, Y.; Tsunoi, T.; Watanabe, N.; Ishida, M.; Yamada, H.; Itoh, T.; *Chirality*; 2001, 13 (5), 236-243.

Tullis, J. L.; *J. Am. Med. Assoc.*; 1977a, 237, 355-360.

Tullis, J. L.; *J. Am. Med. Assoc.*; 1977b, 237, 460-463.

Turro, N. J.; Ramamurthy, V.; Scaiani J. C.; *Principles of Molecular Photochemistry*; first ed., University Science Books, 2008.

Vachev, V. D.; Frederick; J. H.; *Chemical Physics Letters*; 1996, 249 (56), 476-484.

Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N.; *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Second ed., Wiley-VCH, 2002.

van de Weert, M.; *J Fluoresc*; 2010, 20, 625-629.

van de Weert, M.; Stella, L.; *Journal of Molecular Structure*; 2011, 998, 144-150.

van de Wouw, J.; Joles, J. A.; *Clinical Kidney Journal*; 2022, 15 (4) 624-634.

Varshney, A.; Sen, P.; Ahmad, E.; Rehan, M.; Subbarao, N.; Khan, R. H.; *Chirality*; 2010, 22, 77-87.

Vassilev, N. G.; Dimitrov, V. S.; *J. Mol. Struct.*; 2003, 654, 27-34.

Vaziri, P. B.; Vahedi, M.; Abdollahzadeh, S. H.; Abdolsamadi, H. R.; Hajilooi, M.; Kasraee, S. H.; *Iranian J. Public Health*; 2009, 38 (3), 54-59.

Venyaminov, S. Y.; Yang, J. T.; *Determination of protein secondary structure*; In: Fasman, G. D.(eds); *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules.*; Springer, Boston, MA; 1996, 69-107.

Visy, J.; Fitos, I.; Mady, G.; Urge, L.; Krajcsi, P.; Simonyi, M.; *Chirality*; 2002, 14, 638-642.

Wa, C.; Cerny, R. L.; Clarke, W. A.; Hage, D. S.; *Clinica Chimica Acta*; 2007, 385, 48-60.

Walker, J. E.; *FEBS Lett*; 1976, 66, 173-175.



Wang, J.; Sanchez-Rozello, M.; Aceña, J. L.; del Pozo, C.; Sorochinsky, A. E.; Fustero, S.; Soloshonok, V. A.; Liu, H.; *Chem. Rev.*; 2014, 114, 2432-2506.

Wang, L.; Zhang, G.; Wang, Y.; *Mol. Biol. Rep.*; 2014, 41, 3381-3391.

Wang, N.; Ye, L.; Zhao, B. Q.; Xu, J. X.; *Braz. J. Med. Biol. Res.*; 2008, 41 (7), 589-595.

Wang, Y.; Jiang, J.; Jiang, X.; Cai, S.; Han, H.; Li, L.; Tian, Z.; Jiang, W.; Zhang, Z.; Xiao, Y.; Wright, S. C.; Larrick, J. W.; *Bioorg. Med. Chem.*; 2008, 16 (13), 6552-6559.

Wang, Y.; Wang, S.; Huang, M.; *Curr. Pharm. Des.*; 2015, 21 (14), 1831-1836.

Wang, Y.; Yu, H.; Shi, X.; Luo, Z.; Lin, D.; Huang, M.; *J. Biol. Chem.*; 2013, 288 (22), 15980-15987.

Wang, Z.; Ho, J.; Carter, D. C.; *United States Patent Application* 20060234960, 2006.

Wang, Z.; Li, D.; Jin, J.; *Spectrochim. Acta A*; 2008, 70, 866-870.

Wang, Z.; Yang, L.; Zhang, X.; *Synthetic Communications.*; 2013, 43 (23), 3093-3114.

Wardell, M.; Wang, Z.; Ho, J. X.; Robert, J.; Ruker, F.; Ruble, J.; Carter, D. C.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 2002, 291, 813-819.

Watanabe, H.; Tanase, S.; Nakajou, K.; Maruyama, T.; Kragh-Hansen, U.; Otagiri, M.; *Biochem J*; 2000, 349 (3), 813-819.

Watson, P. D.; *J Appl Physiol*; 1999, 86, 1421-1427.

Wei, Y. L.; Li, J. P.; Dong, C.; Shuang, S. M.; Liu, D. S.; Huie, C. W.; *Talanta*; 2006, 70, 377.

Weir, D.; Scaiano, J. C.; *Tetrahedron*; 1987, 43 (7), 1617-1623.

Werner, E. A.; Bell, J.; *J. Chem. Soc. Trans.*; 1922, 121, 1790-1794.

Wolfbeis, O. S.; Gurakar, A.; *Clin Chim Acta*; 1987, 164, 329-337.

Woody, R. W.; *Meth. Enzymol.*; 1995, 246, 34-71.

Xiang, Y.; Wu, F.; *Spectrochim. Acta A*; 2010, 77, 430-436.

Xu, H.; Liu, Q.; Wen, Y.; *Spectrochim. Acta A*; 2008, 71, 984-988.

Yadav, P.; Yadav, J. K.; Alka Agarwal, A.; Awasthi, S. K.; *RSC Adv.*; 2019, 9 (55), 31969-31978.

Yamasaki, K.; Chuang, V. T.; Maruyama, T.; Otagiri, M.; *Biochim. Biophys. Acta.*; 2013, 1830 (12), 5435-5443.

Yang, F.; Bian, C.; Zhu, L.; Zhao, G.; Huang, Z.; Huang, M.; *J. Struct. Biol.*; 2007, 157, 348-355.

Yang, F.; Yue, J.; Ma, L.; Ma, Z.; Li, M.; Wu, X.; Liang, H.; *Mol. Pharm.*; 2012, 9 (11), 3259-3265.

Yang, Q.; Zhou, X.; Chen, X.; *J. Luminesc.*; 2011, 131, 581-856.

Yasmeen, S.; Riyazuddeen; *J. Mol. Liq.*; 2017, 233, 55-63.

Yin, BT; Yan, CY.; Peng, XM.; Zhang, SL.; Rasheed, S.;Geng, RX.; Zhou, CH.; *European Journal of Medicinal Chemistry*; 2014, 71, 148-159.

Yoshida, K.; Kuroono, Y.; Mori, Y.; Ikeda, K.; *Chem Pharm Bull (Tokyo)*; 1985, 33, 4995-5001.

Yu, W.; Shi, L.; Hui, G.; Cui, F.; *J. Lumin.*; 2013, 134, 491-497.

Yu, X.; Yang, Y.; Lu, S.; Yao, Q.; Liu, H.; Li, X.; Yi, P.; *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*; 2011, 83 (1), 322-328.

Yuan, F.; Dellian, M.; Fukumura, D.; Leunig, M.; Berk, D. A.; Torchilin, V. P.; Jain, R. K.; *Cancer Res.*; 1995, 55 (17), 3752-3756.

- Yue, Y.; Zhang, Y.; Li, Y.; Zhu, J.; Qin, J.; Chen, X.; *J. Luminesc.*; 2008, 128, 513
- Yue, Y.; Zhang, Y.; Qin, J.; Chen, X.; *J. Mol. Struct.*; 2008, 888, 25.
- Zhang, G.; Chen, X.; Guo, J.; Wang, J.; *J. Mol. Struct.*; 2009, 921, 346-351.
- Zhang, G.; Que, Q.; Pan, J.; Guo, J.; *J. Mol. Struct.*; 2008, 881, 132-138.
- Zhang, G.; Wang, A.; Jiang, T.; Guo, J.; *J. Mol. Struct.*; 2008, 891, 93-97.
- Zhang, G.; Zhao, N.; Hu, X.; Tian, J.; *Spectrochim. Acta A*; 2010, 76, 410-417.
- Zhao, H. L.; Xue, C.; Wang, Y.; Sun, B.; Yao, X. Q.; Liu, Z. M.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.*; 2009, 72, 405-411.
- Zheng, Y. R.; Suntharalingam, K.; Johnstone, T. C.; Yoo, H.; Lin, W.; Brooks, J. G.; Lippard, S. J.; *J Am Chem Soc*; 2014, 136 (24), 8790-8798.
- Zhivkova, Zvetanka D.; *Curr. Pharm. Des.*; 2015, 21, 1817-1830.
- Zhu, L.; Yang, F.; Chen, L.; Meehan, E. J.; Huang, M.; *J. Struct. Biol.*; 2008, 162 (1), 40-49.
- Zhu, R. Y.; Xin, X.; Dai, H. Y.; Li, Q.; Lei, J. Y.; Chen, Y.; Jin, J.; *Protein Expr. Purif.*; 2012, 85, 32-37.
- Zsila, F.; *J. Phys. Chem. B*; 2013, 117 (37), 10798-10806.
- Zsila, F.; *Mol. Pharmaceutics*; 2013a, 10 (5), 1668-1682.
- Zunszain, P. A.; Ghuman, J.; Komatsu, T.; Tsuchida, E.; Curry, S.; *BMC Struct. Biol.*; 2003, 3, 6.
- Zunszain, P. A.; Ghuman, J.; McDonagh, A. F.; Curry, S.; *J. Mol. Biol.*; 2008, 381, 394-406.