

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

Tese

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE NOVOS TRIPANOCIDAS 1,2,4-
-TRIAZOL-3-TIONAS COM ALBUMINA SÉRICA HUMANA**

Gabriel Freitas do Rio

Seropédica, RJ
Dezembro de 2024



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

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE NOVOS TRIPANOCIDAS 1,2,4-
-TRIAZOL-3-TIONAS COM ALBUMINA SÉRICA HUMANA**

Gabriel Freitas do Rio

Sob a Orientação do Professor
Dr. Carlos Mauricio Rabello Sant'Anna

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
Dezembro de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

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

R585a Rio, Gabriel Freitas do, 1986-
Avaliação da interação entre novos tripanocidas
1,2,4-triazol-3-tionas com albumina sérica humana /
Gabriel Freitas do Rio. - Seropédica, 2024.
184 f.: il.

Orientador: Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna.
Coorientador: Dari Cesarin Sobrinho.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química,
2024.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Derivados de piperina. 3.
Hibridização molecular. 4. Albumina sérica humana. I.
Sant'Anna, Carlos Mauricio Rabello de, 1965-, orient.
II. Sobrinho, Dari Cesarin, 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**

GABRIEL FREITAS DO RIO

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

TESE APROVADA EM 10/12/2024

Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna
(Orientador)

Rosane Nora Castro Dr^a. UFRRJ

Claudio Eduardo Rodrigues dos Santos Dr. UFRRJ

Nelilma Correia Romeiro Dr.^a UFRJ

Rodrigo José Corrêa Dr. UFRJ



TERMO N° 1195/2024 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 11/12/2024 12:05)
CARLOS MAURÍCIO RABELLO DE SANT'ANNA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQF (11.39.00.25)
Matrícula: ###204#4

(Assinado digitalmente em 11/12/2024 10:07)
CLAUDIO EDUARDO RODRIGUES DOS SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###244#8

(Assinado digitalmente em 11/12/2024 07:23)
ROSANE NORA CASTRO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###775#8

(Assinado digitalmente em 08/04/2025 07:49)
RODRIGO JOSÉ CORRÊA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.997-##

(Assinado digitalmente em 16/12/2024 09:37)
NELILMA CORREIA ROMEIRO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.877-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: 1195, ano: 2024, tipo: TERMO, data de emissão: 11/12/2024 e o código de verificação: 441d2dbe05

DEDICATÓRIA

*“...Por meu pai que contrabandeava cigarros, por meu primo que
passava rifa, pelo tio que roubava estanho à Estrada de Ferro, por
seu Neco que fazia charutos ordinários, pelo sargento Gonzaga que
tomava tiquira com mel de abelha e trepava com a janela aberta,
pelo meu carneiro manso
pela minha cidade azul
pelo Brasil salve salve,
Stalingrado resiste. ...”*

Poema Sujo – Ferreira Gullar

AGRADECIMENTOS

Ao professor e amigo Aurélio Baird Buarque Ferreira (*in memoriam*), que passou por todas as etapas de minha formação acadêmica e muitas das pessoais e cidadãs. É uma meta e um farol, além de representar uma vaidade, pelo orgulho e sorte de ter convivido com ele.

Ao professor e amigo Angelo da Cunha Pinto (*in memoriam*), pela amizade, auxílio, conselhos, me mostrar o que é a ciência e me abrir as portas de seu grupo de pesquisa.

A professora Bárbara Vasconcellos da Silva, por me orientar, por sua paciência e por me ensinar o rigor científico.

Ao professor Evelton Alves Casardelli, um amigo desde o início de minha jornada acadêmica.

Ao professor Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna, por aceitar o desafio de me orientar rumo ao título de Doutor, mesmo sob situações tão adversas que lhe testaram em muitas esferas e não desistiu mesmo quando era o caminho mais fácil.

Ao professor Darí Cesarin Sobrinho, por me coorientar, sempre com dedicação e observação a fatores extra-acadêmicos, por vezes renunciando a seus horários pessoais para tornar possível minha conclusão de curso.

A minha família, em especial minha mãe Lucia, minha irmã Rafaela, meu avô Antônio (de Freitas) e minha avó Marli, que, a seu modo heterogêneo e por vezes obtuso, me trouxeram (talvez empurraram) até aqui.

A minha namorada e companheira, que tive a sorte de encontrar, Sophia Dantas, que me deu a mão quando era mais fácil mudar de calçada e me incentiva e motiva sempre, com muita resiliência.

A minha amiga Michelle Branco Ramos, a irmã que a vida me deu e que me retribui sempre com um sorriso do tamanho do oceano toda a fez que me vê e me abraça nas não raras vezes em que me chateio com algo, até quando é com ela.

Ao Leonardo Araújo da Silva (roliço), meu amigo desde o primeiro dia de Rural, a pessoa mais sensível que conheço e que me ajudou até mesmo quando isso o atrapalhava.

Ao meu amigo José Monsair Martucheli de Almeida Junior (Juquinha), meu amigo desde que nos conhecemos e ele não conseguiu pegar o dinheiro no chão. Uma mistura de índio e erudito e quem eu sinto muita falta do convívio diário.

Ao meu amigo Ronaldo Conceição da Silva, a alegria mal-humorada e quem eu sinto muita falta, também.

Ao meu amigo Luiz Felipe Jooris Alves, que sempre ofereceu sua amizade de forma simples e gratuita, me incluindo no seu cotidiano e aprofundando essa amizade, no que poderia parecer improvável.

A minha amiga Sabrina Martinez (gaúcha), que foi uma das grandes responsáveis por meu sucesso no mestrado (quando eu não sabia nem soltar a bola no rotavapor) e se tornou uma das pessoas mais caras em minha vida e que também me faz uma falta enorme não poder tomar aquela cervejinha com ela.

A minha amiga Jamile Carvalho, quem eu conheço desde o início da vida e com quem quero ainda seguir amigo por todo o curso dela, mesmo que a distância e a rotina provoquem distâncias.

A minha amiga Gabriela Souza, uma pessoa incrível, doce e obstinada que conheci se tornou minha amiga quando julgava não ser mais possível ter amizades nessa altura da vida, que me viu e ouviu de verdade, pra além de meu ser social, e quem eu lamento não poder ter convívio diário.

Ao meu grande amigo Raul que eu tive a sorte de conhecer, juntamente a sua família Beth e Anahí. Indignado, inteligente e sempre sorridente. Se tivéssemos mais “Rauls” o mundo seria melhor.

Ao meu amigo Afonso que conheci tardeamente, mas por quem nutro grande amizade.

Ao meu amigo Tiago (Petrópolis) de Souza Dias Alves, que foi companheiro nesses anos finais da vida acadêmica e com quem, não diferente, lamento a distância que a rotina nos imprime.

Ao amigo Ari Miranda da Silva, que sempre foi camarada e que sempre fez além para me ajudar, mesmo até quando eu, errado, não queria.

Aos meus demais amigos, camaradas e colegas que de alguma forma contribuíram com o que sou hoje, Luan, Jan, Jorge Fábio, que primeiro me deu trote na rural, Tiago (padeiro), Emanuel, Lucas, Paulo, Cosme, Naza, Bianca, Daniela Rodrigues, (as duas últimas amizades desde as épocas de UFRJ e que me são muito caras), Tiago (Petrukio), Yuri (amizades de infância para a eternidade), Ricardo Marcelo (que me ajudou quando mais precisei e não tinha nada para ofertar, além de minha amizade).

A Flávia, que fez parte de grande parcela de minha existência e que também a torna responsável pelo que sou hoje. Eu sei que flores existiram, mas que não resistiram a vendavais constantes.

Aos demais amigos que me escapam, aos técnicos, professores e trabalhadores da Rural, tais como a professora Rosane, Maurício (*in memoriam*) e Gil (*in memoriam*), que os cito como representantes de suas respectivas classes.

A todos que lutaram e lutam pela existência da educação gratuita e de qualidade, que me formaram químico, professor, petroleiro e cidadão.

A todas as instituições de ensino que passei, em especial a UFRRJ, pela qual eu tenho o maior carinho.

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

RESUMO

RIO, Gabriel Freitas do. **AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE NOVOS TRIPANOCIDAS 1,2,4-TRIAZOL-3-TIONAS COM ALBUMINA SÉRICA HUMANA.** 2024. 186p. Tese (Doutorado em Química, Química Orgânica). Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ

Há uma forte demanda para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas, uma doença tropical negligenciada. Este trabalho investiga a interação da albumina sérica humana (ASH) com uma nova série de 1,2,4-triazol-3-tionas derivadas da piperina (dispostos no **Resumo Gráfico**), nas quais apresentaram atividade tripanocida na faixa de micromolar baixa. Estes compostos foram sintetizados e testados sob a coordenação do Professor Marco Edilson Lima Freire da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. (IQ-UFRRJ). Este foi realizado por técnicas espectroscópicas, incluindo absorção UV-vis, dicroísmo circular, fluorescência em estado estacionário e resolvida no tempo combinada com cálculos teóricos (docagem molecular). A interação de todos os compostos é espontânea ($\Delta G^\circ < 0$) e forte ($K_a \approx 10^5 \text{ M}^{-1}$), resultando em uma associação não convencional do estado fundamental (há uma combinação de mecanismos de extinção estáticos e dinâmicos). Os valores positivos de ΔH° e ΔS° são indicativos de que a interação entre os compostos e a albumina sérica humana (ASH) é impulsionada entropicamente e sugerem que é governada predominantemente por interações hidrofóbicas. Curiosamente, os resultados de interação competitiva mostram que os compostos contendo um substituinte ciclo-hexil em N_4 (**19c** e **19e**) se ligam preferencialmente ao sítio I de Sudlow, enquanto os compostos contendo um substituinte feniletil em N_4 (**19b** e **19d**) ligam-se preferencialmente ao sítio II de Sudlow. Os resultados do docagem indicam que os perfis de interação de **19c** e **19e** com o sítio I de Sudlow são bastante semelhantes, assim como os de **19b** e **19d** no sítio II de Sudlow. Em todos os casos, as interações evidenciadas pelo método teórico são predominantemente hidrofóbicas, de acordo com os dados termodinâmicos. Os perfis de interação favoráveis com ASH devem ter um efeito positivo na farmacocinética dos compostos tripanocidas derivados da piperina e provavelmente uma grande influência em sua eficácia *in vivo*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Derivados de piperina, Hibridização molecular, Albumina sérica humana

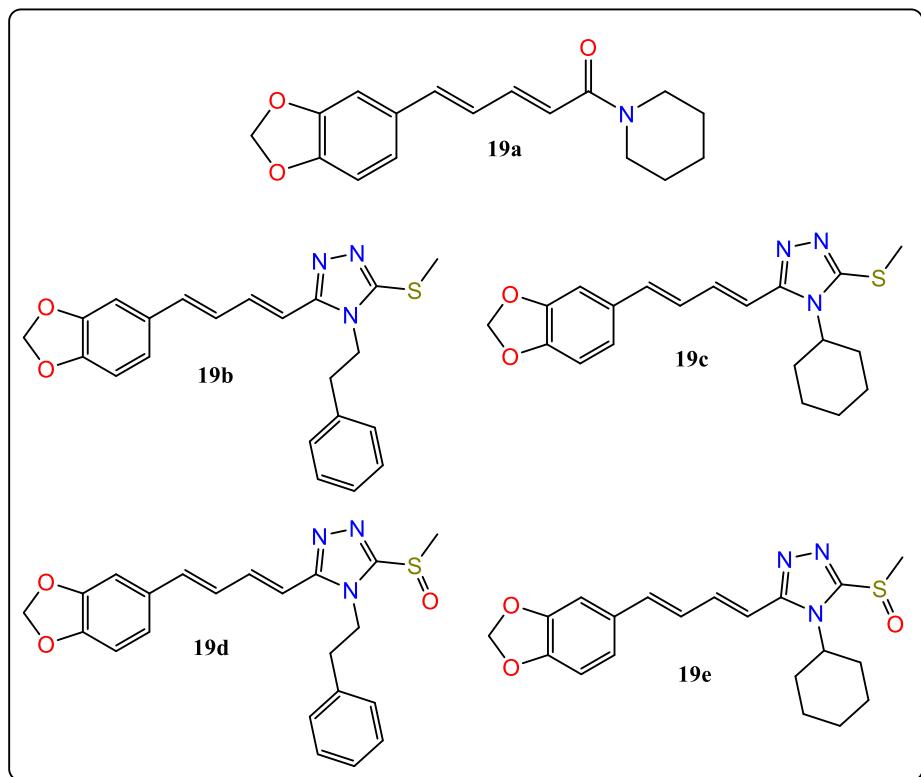
ABSTRACT

RIO, Gabriel Freitas do. **EVALUATION OF THE INTERACTION BETWEEN NEW TRYPANOCIDES 1,2,4-TRIAZOLE-3-THIONES WITH HUMAN SERUM ALBUMIN.** 2024. 186p. Thesis (PhD in Chemistry, Organic Chemistry). Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ

There is a strong demand for the development of new drugs for the treatment of Chagas disease, a neglected tropical disease. This work investigates the interaction of human serum albumin (HSA) with a new series of 1,2,4-triazole-3-thiones derived from piperine (shown in the **Graphical Abstract**), which showed trypanocidal activity in the low micromolar range. These compounds were synthesized and tested under the coordination of Professor Marco Edilson Lima Freire from the Federal Rural University of Rio de Janeiro (IQ-UFRRJ). The study was carried out by spectroscopic techniques, including UV-vis absorption, circular dichroism, steady-state and time-resolved fluorescence combined with theoretical calculations (molecular docking). The binding is spontaneous ($\Delta G^\circ < 0$) and strong ($K_a \approx 10^5 \text{ M}^{-1}$), resulting in a non-conventional ground state association (there is a combination of static and dynamic quenching mechanisms). The positive values of ΔH° and ΔS° are indicative that the binding is entropically driven and suggest that the interaction between the compounds and human serum albumin (HSA) is governed by hydrophobic interactions. Interestingly, competitive binding results show that compounds containing a cyclohexyl substituent at N_4 (**19c** and **19e**) bind preferentially to Sudlow's site I, whereas compounds containing a phenylethyl substituent at N_4 (**19b** and **19d**) bind preferentially to Sudlow's site II. Docking results indicate that the interaction profiles of **19c** and **19e** to Sudlow's site I are quite similar, as are those of **19b** and **19d** in Sudlow's site II. In all cases, the interactions are predominantly hydrophobic, in accordance with the thermodynamic data. The favorable interaction profiles with HSA should have a positive effect on the pharmacokinetics of the trypanocide piperine derivatives and probably a major influence on their *in vivo* efficacy.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Piperine derivatives, Molecular hybridization, Human serum albumin, 1, 2,4-triazole-3-thioether

Resumo Gráfico



Índice de Figuras

- Figura 1:** (a) Berenice, aos 2 anos, a primeira diagnosticada com a doença de Chagas e (b) Matéria de jornal trazendo Berenice, que viria a morrer aos 75 anos, de insuficiência cardíaca, e mostrando a história da doença, imagem retirado dos arquivos do Instituto Oswaldo Cruz [Lidani et al., 2019] - 27 -
- Figura 2:** Países da américa latina, em tom escuro de laranja, onde a DC é endêmica e países onde novos casos estão sendo registrados, em tom mais claro de laranja. [<https://dndial.org/doencas/doenca-de-chagas#fatos-sobre-a-doena/>. Acessado em 22 de outubro de 2024] - 28 -
- Figura 3:** Diferenciação da posição das antenas na cabeça dos diferentes gêneros de triatomíneos, adaptado de Meis e Castro, 2017. - 29 -
- Figura 4:** Estágios da vida dos insetos triatomíneos. [disponível em: https://www.saberatualizado.com.br/2023/03/indigenas-na-amazonia-evoluiram.html#google_vignette] - 29 -
- Figura 5:** Formas majoritárias do *T. cruzi*. - 30 -
- Figura 6:** Forma amastigota do *T. cruzi*, por microscopia eletrônica. - 30 -
- Figura 7:** Representação da forma amastigota do *T. cruzi*, com suas organelas indicadas, adaptado de Teixeira et al., 2012. - 30 -
- Figura 8:** Forma epimastigota do *T. cruzi*, por microscopia eletrônica. - 31 -
- Figura 9:** Representação da forma epimastigota do *T. cruzi*, com suas organelas indicadas, adaptado de Teixeira et al., 2012. - 31 -
- Figura 10:** Forma tripomastigota do *T. cruzi*, por microscopia eletrônica. - 31 -
- Figura 11:** Representação da forma tripomastigota do *T. cruzi*, com suas organelas indicadas, adaptado de Teixeira et al., 2012. - 32 -
- Figura 12:** 1. Cílico de vida do *T. cruzi* e seus estágios infectivos nos vetores e nos hospedeiros, adaptado de Teixeira, Benchimol, Crepaldi e Souza, de 2012. - 34 -
- Figura 13:** Indícios de infecção pelo *T. cruzi*, por meio vetorial. A esquerda, indivíduo com sinal de românia e a direita outro indivíduo apresenta chagoma de inoculação, disponível em Instituto de Salud del Estado de México, 2017 (apud <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/parasito-hospedeiro>). - 36 -
- Figura 14:** Na primeira imagem à esquerda temos um coração afigido pela doença de chagas, claramente aumentado, ao lado de um coração saudável; à direita imagem radioscópica de coração infectado, com aglomerado parasitário no interior das células cardíacas. - 37 -
- Figura 15:** Estruturas químicas das moléculas violeta de genciana (1), nitrofurazona (2), nifurtimox (3) e benzonidazol (4). - 38 -
- Figura 16:** Mecanismo de ação proposto para os fármacos nifurtimox (3) e BDZ (4), adaptado de Dias e colaboradores, de 2009 [Dias et al., 2009]. - 40 -
- Figura 17:** Núcleo do esterol (9), colesterol (10) e ergosterol (11), com o núcleo esterol evidenciado em azul. - 43 -
- Figura 18:** Estrutura dos azocompostos fluconazol (12) e cetoconazol (13). - 44 -
- Figura 19:** Estrutura química da piperina (19a) e dos triazóis 3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il)-5-(metiltio)-4-fenetyl-4H-1,2,4-triazol (19b); 3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il)-4-ciclohexil-5-(metiltio)-4H-1,2,4-triazol (19c); 3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il)-5-(metilsulfônio)-4-fenetyl-4H-1,2,4-triazol (19d) e 3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il)-4-ciclohexil-5-(metilsulfônio)-4H-1,2,4-triazol (19e). - 45 -
- Figura 20:** Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais não-polares e alifáticas [Lehninger, Nelson e Cox 1993]. - 47 -
- Figura 21:** Estrutura de aminoácidos com cadeias laterais aromáticas [Lehninger, Nelson e Cox 1993]. - 48 -
- Figura 22:** Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas [Lehninger, Nelson e Cox 1993]. - 49 -
- Figura 23:** Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente (ácidos) [Lehninger, Nelson e Cox 1993]. - 49 -
- Figura 24:** Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente (básicos) [Lehninger, Nelson e Cox 1993]. - 50 -
- Figura 25:** Níveis de organização da estrutura molecular de proteínas [Hemoglobina humana. Níveis de organização: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária - Canal CECIERJ, acessado em 21-09-2024]. - 51 -

Figura 26: Estrutura primária de uma proteína caracterizada pela formação de uma ligação peptídica . - 51
Figura 27: Estrutura secundária para uma proteína tipo hélice- α (à esquerda) e folha- β (à direita) [Lehninger, Nelson, e Cox 1993]..... - 51 -
Figura 28: a) Estrutura terciária da ASH, ilustrando a localização dos resíduos de aminoácidos Cys34 e Trp214 e dos subdomínios, codificados por cores: I A-azul escuro; I B- 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)..... - 52 -
Figura 29: Visão geral das principais proteínas plasmáticas humanas que podem ser identificadas por técnicas eletroforéticas simples [Fanali 2012]..... - 54 -
Figura 30: Gráfico que mostram o número de artigos, no intervalo entre 2015 a 2024, utilizando a palavra-chave <i>human serum albumin</i> , nas bases de dados Web of Science e SciFinder - 59 -
Figura 31: Sequência completa de aminoácidos da albumina sérica humana. O resíduo de cisteína 34 contém o único grupo SH livre da albumina. [adaptado de Dugaiczyk, Law e Dennison, 1982] - 60 -
Figura 32: Representação em forma de fita da estrutura tridimensional da ASH e duas perspectivas diferentes (a e b) com rota relativa de 180° [PDB ID, 1AO6] [Sugio 1999]. Foram usadas como referência relativa as hélices- α Ila-h2 e IIIa-h6. A figura foi preparada usando o programa JSmol. - 61 -
Figura 33: Representação dos subdomínios da ASH bem como suas respectivas hélices- α e pontes de dissulfetos. A sequência de nomenclatura é derivada do trabalho de Minghetti e colaboradores. [Minghetti 1986] [Sugio 1999]..... - 62 -
Figura 34: a) Estrutura tridimensional para ASH com destaque para a Cys34 e o 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 azul marinho (Phe e Tyr). [PDB ID, 1AO6] [Sugio, 1999] As figuras foram preparadas usando o programa JSmol. - 63 -
Figura 35: Representação para a estrutura cristalina dos sítios de ligação de ácidos graxos (FAs) mostrando os principais resíduos de α -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] - 65 -
Figura 36: 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 parmítico [PDB ID, 1E7H] Todas as figuras foram preparadas usando o programa JSmol - 65 -
Figura 37: Representação para a cocristalização do ácido cápricos nos sítios de ligação de ácidos graxos FA1-FA7 (primários) e FA8 e FA9 (secunários) (PDB-1E7E). A figura foi preparada usando o programa JSmol. - 66 -
Figura 38: 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- α pertencentes aos subdomínios Ila-h2 e IIIa-h6. As estruturas foram construídas usando o programa JSmol - 67 -
Figura 39: Representação estrutural do modo de ligação de múltiplos ácidos graxos (AGs) para ASH para os diferentes sítios de ligação (FA1 – FA7). A representação da superfície molecular da ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°). [Linciano, 2022]..... - 68 -
Figura 40: Representação estrutural do modo de ligação no sítio FA1 para múltiplos ácidos graxos complexados com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA1/ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano 2022]. - 68 -
Figura 41: Representação estrutural do modo de ligação no sítio FA2 para múltiplos ácidos graxos complexados com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA2/ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano 2022]. - 69 -
Figura 42: Representação estrutural do modo de ligação nos sítios a) FA3 e b) FA4 para múltiplos ácidos graxos complexados com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA3-4/ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano, 2022] - 70 -

Figura 43: Representação estrutural do modo de ligação no sítio FA5 para múltiplos ácidos graxos complexados com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA5/ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano 2022].	- 70 -
Figura 44: Representação estrutural do modo de ligação no sítio FA6 para múltiplos ácidos graxos complexados com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA6/ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano 2022].	- 71 -
Figura 45: Representação estrutural do modo de ligação no sítio FA7 para múltiplos ácidos graxos complexados com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA7/ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano 2022].	- 72 -
Figura 46: Representação estrutural do modo de ligação no sítio FA9 para o ácido cáprico complexado com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA9/ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano 2022].	- 72 -
Figura 47: Estrutura cristalina de ASH indicando as regiões de ligação primária de fármacos endógenos exógenos: sítio SI, sítio SII e sítio SIII [PDB ID, 1AO6] A estrutura foi preparada usando o programa JSmol.	- 73 -
Figura 48: Representação da complexação nos sítios primários de ligação de fármacos endógenos e exógenos com ASH a) sítio I ou sítio da varfarina, b) sítio II ou sítio do ibuprofeno e c) sítio III ou sítio do ácido salicílico [Leboffe et al., 2020].	- 74 -
Figura 49: Representação da estrutura cristalina do ambiente próximo a Lys199 para a estrutura nativa da ASH. [Gou, 2016]	- 76 -
Figura 50: Representação estrutural para complexação no sítio SIII de ASH com: a) ácido fusídico e b) AZT [Leboffe et al., 2020].	- 78 -
Figura 51: Representação da estrutura cristalina do ambiente que próximo a Cys34 para a estrutura nativa da ASH [PDB ID 1AO6] [Gou 2016].	- 79 -
Figura 52: Ambiente estrutural do complexo ASH:aspirina (PDB ID: 2I2Z) [Yang et al., 2007] e do aduto ASH:ácido salicílico (PDB ID: 2I30) [Yang et al., 2007]. Os resíduos de acetil-Lys199 e Lys199 são mostrados em verde. As ligações de hidrogênio são mostradas em linhas tracejadas azuis. O ácido salicílico é representado em bastões (preto), adaptado de De Simone, di Masi e Ascenzi, 2021.	- 80 -
Figura 53: 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.	- 81 -
Figura 54: Representação da estrutura cristalina de ASH indicando as regiões de complexação com metais Cu ²⁺ , Pt ²⁺ , Pb ²⁺ , Au ³⁺ , e Zn ²⁺ bem como sítio de ligação SI e SII em marrom e azul, respectivamente, além da cisteína 34, isolada, em amarelo. Adaptado de Kratz [Kratz 2014].	- 82 -
Figura 55: Os locais de glicação da ASH para resíduos de lisina são mostrados pela esfera de cor vermelha. O sítio de glicação não enzimática predominante é Lys525 e os locais de glicação predominantes são Lys 199, 281, 439 de ASH mostrados pela caixa destacada em rosa. Os outros resíduos de Lys propensos à glicação são Lys 12, 51, 233, 276, 317, 323, 378 e 545. Esta imagem foi gerada a partir de PDB id: 1AO6 usando o pacote PyMOL [Rabanni e Ahn, 2019].	- 83 -
Figura 56: Representação esquemática dos processos mecanísticos empregando ASH como carreador de compostos bioativos [Kratz 2012].	- 85 -
Figura 57: Mecanismo proposto para o processo de acoplamento de doxirrubicina com meleimida na Cys34 da ASH, adaptado de Liu e colaboradores [Liu, Mu e Xing, 2015].	- 87 -
Figura 58: Mecanismo proposto para o processo de acoplamento através da estratégia de formação de um grupo hidrazona junto as lisinas (Lys) da ASH [Gou 2016].	- 88 -
Figura 59: Mecanismo proposto para o processo de produção de pró-fármacos, ou seja, fármacos com potenciais grupos de saída (ligantes doadores Cl/S) onde o pró-fármaco é substituído principalmente por ligantes doadores N/O presentes na albumina. Adaptado de Gou et al., 2016.	- 89 -
Figura 60: Espectro de absorção (em vermelho, indicado pela letra "A") e emissão (em azul, indicado pela letra "E") de fluorescência para os aminoácidos a) fenilalanina, b) tirosina e c) triptofano, adaptado de Lakowicz, 2006.	- 91 -
Figura 61: Espectro de anisotropia de absorção do triptofano como função da orientação do resíduo indólico em relação às bandas ¹ La e ¹ Lb [modificado de Lakowicz (2006)].	- 93 -
Figura 62: Espectro de emissão de fluorescência do resíduo indólico do triptofano em diferentes ambientes químicos [modificado de Lakowicz (2006)].	- 93 -

- Figura 63:** Representação esquemática da polarização circular da radiação eletromagnética. Nas duas figuras a direita, a seta em vermelho corresponde à componente elétrica, a seta em verde à componente magnética e a seta em azul corresponde à soma dos vetores. As demais setas indicam como variam as componentes elétrica e magnética em função do tempo, adaptado de Esteves e Costa, 2014. - 95 -
- Figura 64:** Representação esquemática de um aparelho de dicroísmo circular, onde são mostrados os componentes básicos para sua operação, adaptado de <http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy/5-cd-spectrometer-performance> - 96 -
- Figura 65:** Espectros de dicroísmo circular representativos de estruturas secundárias de proteínas, adaptado de www.chem.uzh.ch/zerbe/CD-Spectroscopy.pdf. - 97 -
- Figura 66:** Compostos fluorescentes em diferentes regiões do visível do espectro eletromagnético, adaptado de Lakowicz, 2006. - 98 -
- Figura 67:** Espectro de fluorescência da ASH a uma concentração de 10^{-5} mol/L - 99 -
- Figura 68:** Diagrama de Jablonski, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após uma molécula absorver um fóton com energia da faixa ultravioleta ou visível. S_0 é o estado eletrônico fundamental, S_1 e T_1 são os estados excitados singuleto e triplete de menor energia, respectivamente. S_2 é um segundo estado excitado singuleto. As setas retas representam os processos envolvendo fótons, e as setas onduladas são as transições não-radioativas (que não emitem radiação) [Sotomayor et al., 2008] .. - 99 -
- Figura 69:** Regra da imagem especular e fatores de Franck-Condon. Os espectros de absorção e emissão para antraceno, adaptado de Lakowicz, 2006. - 101 -
- Figura 70:** Diagrama de Jablonki simplificado para ilustrar o significado de rendimentos quânticos e tempos de vida. [modificado de Lakowicz, 2006] - 101 -
- Figura 71:** Mecanismos de supressão de fluorescência: **a)** mecanismo estático e **b)** mecanismo dinâmico, adaptado de Lakowicz, 2006. - 104 -
- Figura 72:** Diagrama de Jablonski (energia) para o processo de desativação do estado excitado de uma molécula por diferentes mecanismos, adaptado de Lakowicz, 2006. - 104 -
- Figura 73:** Gráfico de Stern-Volmer para o processo de supressão dinâmico, adaptado de Lakowicz, 2006 - 106 -
- Figura 74:** Gráfico de Stern-Volmer para o processo de supressão estático, adaptado de Lakowicz, 2006. - 107 -
- Figura 75:** Gráfico de Stern-Volmer e Stern-Volmer para o processo de supressão estático/dinâmico para a mesma população de fluoróforo, adaptado de Lakowicz, 2006 - 108 -
- Figura 76:** **a)** Stern-Volmer; **b)** Stern-Volmer modificado para a supressão de um sistema contendo mais de um fluoróforo, adaptado de Lakowicz, 2006 - 108 -
- Figura 77:** Gráfico para a supressão de um sistema contendo mais de um fluoróforo, com a mesma capacidade de formação de uma ligação com a molécula do supressor. [modificado de Lakowicz, 2006] - 109 -
- Figura 78:** (A) Espectros na região UV-vis para 19b em PBS (pH 7,4) em diferentes concentrações de ligante. (B) Espectros na região UV-vis para ASH:19b em PBS (pH 7,4). (C) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para 19b em PBS na faixa de 300-550 nm. [ASH] = $1,0 \times 10^{-5}$ M, [19b] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 e 5,51) $\times 10^{-6}$ M (para o UV-vis no equilíbrio ligado à albumina) e [19b] = (0,17, 0,33, 0,50, 0,66, 0,83, 0,99, 1,15 e 1,32) $\times 10^{-5}$ M (concentração total do ligante usada nas medições de fluorescência em estado estacionário). - 127 -
- Figura 79:** (A) Espectros na região UV-vis para 19c em PBS (pH 7,4) em diferentes concentrações de ligante. (B) Espectros na região UV-vis para ASH:19c em PBS (pH 7,4). (C) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para 19c em PBS na faixa de 300-550 nm. [ASH] = $1,0 \times 10^{-5}$ M, [19c] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 e 5,51) $\times 10^{-6}$ M (para o UV-vis no equilíbrio ligado à albumina) e [19c] = (0,17, 0,33, 0,50, 0,66, 0,83, 0,99, 1,15 e 1,32) $\times 10^{-5}$ M (concentração total do ligante usada nas medições de fluorescência em estado estacionário). - 128 -
- Figura 80:** (A) Espectros na região UV-vis para 19d em PBS (pH 7,4) em diferentes concentrações de ligante. (B) Espectros na região UV-vis para ASH:19d em PBS (pH 7,4). (C) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para 19d em PBS na faixa de 300-550 nm. [ASH] = $1,0 \times 10^{-5}$ M, [19d] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 e 5,51) $\times 10^{-6}$ M (para o UV-vis no equilíbrio ligado à albumina) e [19d] = (0,17, 0,33, 0,50, 0,66, 0,83, 0,99, 1,15 e 1,32) $\times 10^{-5}$ M (concentração total do ligante usada nas medições de fluorescência em estado estacionário). - 129 -

- Figura 81:** (A) Espectros na região UV-vis para 19e em PBS (pH 7,4) em diferentes concentrações de ligante. (B) Espectros na região UV-vis para ASH:19e em PBS (pH 7,4). (C) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para 19e em PBS na faixa de 300-550 nm. $[ASH] = 1,0 \times 10^{-5} M$, $[19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6} M$ (para o UV-vis no equilíbrio ligado à albumina) e $[19e] = (0,17, 0,33, 0,50, 0,66, 0,83, 0,99, 1,15 \text{ e } 1,32) \times 10^{-5} M$ (concentração total do ligante usada nas medições de fluorescência em estado estacionário). - 130 -
- Figura 82:** (A) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para ASH não ligado e sua extinção pelo aumento sucessivo de concentrações para (A) 19b, (B) 19c, (C) 19d, e (D) 19e em PBS (pH 7,4) a 310 K. (E, F, G, H) Os gráficos de Stern-Volmer correspondentes para a interação ASH:ligante a 305, 310 e 315 K. $[ASH] = 1,0 \times 10^{-5} M$, $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6} M$ (no equilíbrio ligado à albumina). - 132 -
- Figura 83:** Espectros de fluorescência em estado estacionário para ASH não ligado e sua extinção após adições sucessivas de (A) 19b, (B) 19c, (C) 19d e (D) 19e em PBS (pH 7,4) a 310 K. $[ASH] = 1,00 \times 10^{-6} M$, $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6} M$ (no equilíbrio ligado à albumina). - 133 -
- Figura 84:** (A) Gráficos de Stern-Volmer baseados na média do tempo de vida da fluorescência para a ASH não ligada e ASH:ligante, à temperatura ambiente. Decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo para albumina sem e na presença de (B) 19b, (C) 19c, (D) 19d e (E) 19e. A função de resposta do instrumento (IRF) é representada como pontos laranja. Os resíduos sem e no máximo da concentração do supressor foram mostrados abaixo dos decaimentos. $[ASH] = 1,0 \times 10^{-5} M$, $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6} M$ (no equilíbrio ligado à ASH). - 135 -
- Figura 85:** Gráfico logarítmico duplo para a interação entre ASH e (A) 19b, (B) 19c, (C) 19d e (D) 19e, em PBS (pH 7,4) a 305, 310 e 315 K. $[ASH] = 1,0 \times 10^{-5} M$, $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6} M$ (no equilíbrio ligado à albumina). - 137 -
- Figura 86:** Diagramas de Stern-Volmer modificados para interação entre ASH e (A) 19b, (B) 19c, (C) 19d e (D) 19e, em PBS (pH 7,4) a 305, 310 e 315 K. O diagrama de van't Hoff correspondente com base nos valores de $\ln K_a$ em três temperaturas diferentes para (E) 19b, (F) 19c, (G) 19d e (H) 19e. $[ASH] = 1,0 \times 10^{-5} M$, $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6} M$ (no equilíbrio ligado à ASH). - 138 -
- Figura 87:** Espectro de CD de UV-distante de ASH, sem e na, presença de (A) 19b, (B) 19c, (C) 19d e (D) 19e, em pH = 7,4 e 310 K. (E, F, G e H) O conteúdo da estrutura secundária correspondente (%) para a proporção albumina:ligante de 1:0, 1:4 e 1:8. $[ASH] = 10^{-6} M$ e $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,00, 3,98 \text{ e } 7,94) \times 10^{-6} M$ - 141 -
- Figura 88:** Diagramas de Stern-Volmer modificados para a interação entre ASH e (A) 19b, (B) 19c, (C) 19d e (D) 19e, sem e na presença de sondas de sítio varfarina ou ibuprofeno em PBS (pH 7,4) a 310 K. $[ASH] = [varfarina] = [ibuprofeno] = 1,0 \times 10^{-5} M$ e $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6} M$ (no equilíbrio ligado à ASH). - 142 -
- Figura 89:** Melhor modo de ligação do composto 19e dentro do sítio I de Sudlow da ASH gerado por docagem molecular (função de aptidão ChemScore). Átomos de C do ligante apresentados em ciano e átomos de C da proteína apresentados em verde; átomos de N em azul; átomos de O em vermelho; átomo de S em amarelo. Figura gerada com PyMOL 0.99rc6 (DeLano Scientific LLC). - 145 -
- Figura 90:** Melhor modo de ligação do composto 19d dentro do sítio II de ASH Sudlow gerado por docagem molecular (função de aptidão GoldScore). Átomos de ligante C apresentados em laranja e átomos de proteína C apresentados em verde; átomos de N em azul; átomos de O em vermelho; átomo de S em amarelo. Figura gerada com PyMOL 0.99rc6 (DeLano Scientific LLC). - 147 -

Índice de Esquemas

Esquema 1: Rota sintética do BDZ, adaptado de Hoffman-La Roche [Hoffman-La Roche, 1966]	- 40 -
Esquema 2: Equação cinética das transações eletrônicas, adaptado de Lakowicz, 2006.....	- 104 -
Esquema 3: Esquema do processo de supressão dinâmica, na presença e na ausência de supressor, adaptado de Valeur, 2002.....	- 105 -
Esquema 4: Equilíbrio da supressão estática para a formação de complexos não fluorescentes com supressores	- 106 -
Esquema 5: Mecanismo combinado estático/dinâmico	- 108 -
Esquema 6: Esquema de supressão para mais de um fluorófilo, adaptado de Lakowicz, 2006	- 109 -

Índice de Tabelas

Tabela 1: Classificação dos genótipos de <i>Trypanosoma cruzi</i> , segundo consenso realizado em 2009, atualizado em 2012, adaptado de Zingales et al., 2012.....	- 33 -
Tabela 2: Rotas metabólicas e alvos macromoleculares para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas, adaptado de Dias e colaboradores [Dias, Desso, Thiemann e Oliva, 2009].....	- 42 -
Tabela 3: Os vinte aminoácidos naturais, suas abreviações, radicais, valor de constante de dissociação ácida (pK_a) e ponto isoeletrólico (pI) [Lehninger, Nelson e Cox 1993].....	- 46 -
Tabela 4: Principais resíduos de α -aminoácidos pertencentes aos diferentes sítios de ácido graxo (FAs) que estão interagindo com os ligantes mostrados na Figura 16. [Petitpas, 2001]	- 64 -
Tabela 5: Coeficientes de absorbividade molar e rendimento quântico de fluorescência para Phe, Tyr e Trp em solução aquosa neutra a 23°C, adaptado de Lakowicz (2006).	- 91 -
Tabela 6: Modelos matemáticos usados para diferentes ajustes nos estudos de supressão de fluorescência para o processo de complexação hóspede/hospedeiro.	- 110 -
Tabela 7: Dados de absorbividade molar (ϵ) para os compostos 1b-e a 295 e 340 nm em PBS	- 131 -
Tabela 8: Constante de extinção de Stern-Volmer (KSV), constante de taxa de extinção bimolecular (kq), constante de extinção de Stern-Volmer da fração acessível (Ka), constante de ligação (Kb) e número de sítios de ligação (n) para a interação entre ASH e ligantes 1b-e a 305, 310 e 315 K.	- 134 -
Tabela 9: Tempos de vida de fluorescência (τ_1 e τ_2), tempo de vida médio ($\tau_{average}$) e contribuição relativa (%Rel) para ASH, ASH: 19b-e à temperatura ambiente.....	- 136 -
Tabela 10: Parâmetros termodinâmicos ΔH° , ΔS° e ΔG° para a interação com a ASH	- 139 -
Tabela 11: Constante de extinção de Stern-Volmer da fração acessível (K_a) para a interação entre ASH e ligantes 19b-e na presença de marcadores de sítio varfarina ou ibuprofeno a 310 K.....	- 143 -
Tabela 12: Principais interações para as melhores poses identificadas para os ligantes 19c e 19e no sítio I de Sudlow, função de pontuação de aptidão ChemScore.....	- 144 -
Tabela 13: Principais interações para as melhores poses identificadas para os ligantes 19b e 19d no sítio II de Sudlow, função de pontuação de aptidão GoldScore.	- 146 -

Lista de Símbolos, Abreviações e Unidades

ε	Coeficiente de absorvidade molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)
λ_{abs}	Comprimento de onda de absorção (nm)
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão (nm)
ϕ_f	Rendimento quântico de fluorescência
[Q]	Concentração do supressor
A	Absorbância
AINE	Antiinflamatório Não-esteroidal
Ala	Alanina (A)
Arg	Arginina (R)
ASH	Albumina sérica humana
Asn	Asparagina (N)
Asp	Aspartato (D)
AZT	Subsítio 3'-azido-3'-desoxitimidina
c	Concentração da espécie que absorve a luz (em mol/L)
Cys	Cisteína (C)
DC	Dicroísmo circular
DCI	Dicroísmo Circular Induzido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Enzyme Comission
FA	Ácido Graxo
FRET	Transferência de energia por ressonância de Förster
GA	Módulo de ligação à albumina semelhante à proteína G
Gln	Glutamina (Q)
Glu	Glutamato (E)
Gly	Glicina (G)
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
His	Histidina (H)
I	Intensidade após a luz percorrer uma distância l no meio
I_0	Intensidade da luz incidente
IFN	Interferon
IL-2	Interleucina-2
Ile	Isoleucina (I)

IMN	Subsídio de Indometacina
k_F	Constante de velocidade de decaimento radiativo do fluoróforo
k_{nr}	Constante de velocidade do decaimento não radiativo para S0
k_q	Constante de velocidade de supressão bimolecular
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
L	Distância que a luz percorre no meio (em cm)
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
Leu	Leucina (L)
Lys	Lisina (K)
MeOH	Metanol
Met	Metionina (M)
MRE	Elípticidade residual significativa ou elípticidade molar residual
N	Número de sítios de ligação
P	Probabilidade
PBS	Solução tampão de fosfato
PDB	Banco de Dados de Proteínas
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina (F)
pK	Constante de dissociação
pKa	Potencial de dissociação
Pro	Prolina (P)
R	Coeficiente de correlação
S_0	Estado fundamental singlete
S_1	Estado excitado singlete de mais baixa energia
SAL	Subsídio Salicílico
Ser	Serina (S)
S_n	Estado excitado singlete de enésima
T_1	Estado excitado triplete
T_2	Estado excitado triplete de maior energia
Thr	Treonina (T)
Trp	Triptofano (W)
Tyr	Tirosina (Y)
UV-Vis	Espectrometria no ultravioleta/visível

Val	Valina (V)
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
τ_0	Tempo de vida da espécie não suprimida (natural)

Sumário

DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
Resumo Gráfico	XI
Índice de Figuras	XII
Índice de Esquemas	XVII
Índice de Tabelas	XVIII
Lista de Símbolos, Abreviações e Unidades.....	XIX
Sumário.....	XXII
1. Introdução	- 25 -
1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas.....	- 25 -
1.1.1 Doença de Chagas	- 26 -
1.1.1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i>	- 28 -
1.1.1.2 Ciclo evolutivo do parasita <i>Trypanosoma cruzi</i>	- 33 -
1.1.1.3 Transmissão e manifestações clínicas	- 34 -
1.1.2 Combate quimioterápico da doença de Chagas	- 37 -
1.1.3 Moléculas bioativas no tratamento da DC.....	- 40 -
1.2 Proteínas	- 46 -
1.2.1 Aminoácidos com cadeias laterais não-polares e alifáticas: <i>glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina</i>	- 47 -
1.2.2 Aminoácidos com cadeias laterais aromáticas: <i>fenilalanina, tirosina, triptofano</i>	- 47 -
1.2.3 Aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas: <i>serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina</i>	- 48 -
1.2.4 Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente em pH fisiológico (ácidos): <i>aspartato, glutamato</i>	- 49 -
1.2.5 Aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente em pH fisiológico: (básicos): <i>arginina, lisina, histidina</i>	- 49 -
1.3 Albumina Sérica Humana.....	- 52 -
1.3.1 A albumina ao longo do tempo.....	- 57 -
1.3.2 Estrutura Química da ASH.....	- 59 -
1.3.3 Sítios de ligação de ácidos graxos	- 64 -
1.3.3.1 O sítio de ligação de ácido graxo FA1	- 68 -
1.3.3.2 O sítio de ligação de ácido graxo FA2	- 69 -
1.3.3.3 Os sítios de ligação de ácidos graxos FA3-FA4.....	- 69 -
1.3.3.4 O sítio de ligação de ácido graxo FA5	- 70 -

1.3.3.5	O sítio de ligação de ácido graxo FA6	- 71 -
1.3.3.6	O sítio de ligação de ácido graxo FA7	- 71 -
1.3.3.7	Os sítios de ligação dos ácidos graxos FA8 e FA9	- 72 -
1.3.4	Os Sítios de ligação primários para compostos endógenos e exógenos	- 73 -
1.3.4.1	O sítio ligação I de Sudlow (subdomínio IIA)	- 75 -
1.3.4.2	O sítio ligação II de Sudlow (subdomínio IIIA).....	- 76 -
1.3.4.3	Sítio de ligação III, de fármacos	- 77 -
1.3.4.4	Mecanismos de competição sítio I e sítio II	- 78 -
1.3.5	Resíduo de Cys34 livre.....	- 78 -
1.3.6	A atividade pseudoenzimática da ASH	- 79 -
1.3.7	Módulo de ligação à ASH semelhante à proteína G.....	- 81 -
1.3.8	Ligação de metais com ASH	- 81 -
1.3.9	A reação de glicação da ASH	- 82 -
1.3.10	Albumina como carreador de fármacos.....	- 83 -
1.3.10.1	Conjugados ASH-Fármaco Derivados de Interações Não Covalentes -	85 -
1.3.10.2	Conjugados de fármacos proteicos à base de ASH derivados de ligação covalente -	86 -
1.4	A espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência e sua aplicação em experimentos de supressão	- 89 -
1.4.1	Estudos de fluorescência de proteínas	- 89 -
1.4.1.1	Propriedades Espectrais dos Aminoácidos Aromáticos	- 90 -
1.4.2	Absorção de luz no ultravioleta-visível (UV-Vis).....	- 93 -
1.4.3	Absorção de luz circularmente polarizada: Dicroísmo circular	- 94 -
1.4.3.1	Cálculos da porcentagem de estrutura hélice- α	- 97 -
1.4.4	A Espectroscopia de fluorescência	- 98 -
1.4.4.1	Tempo de Vida e Rendimento Quânticos de Fluorescência.....	- 101 -
1.4.5	Os mecanismos de supressão de fluorescência estática e dinâmica	- 103 -
1.4.5.1	O processo de supressão – A Equação de Stern-Volmer.....	- 105 -
1.4.5.2	Análise de caso para os experimentos de supressão de fluorescência... -	109 -
1.5	A modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de novos fármacos	- 116 -
1.5.1	Diferentes métodos de modelagem molecular	- 117 -
1.5.1.1	Docagem em modelagem molecular (<i>Docking</i>)	- 117 -
2.	Objetivos.....	- 120 -
2.1.	Objetivo Geral	- 120 -
2.2.	Objetivo Específico	- 120 -
3	Parte Experimental	- 121 -
3.1	Materiais e Métodos	- 121 -

3.1.1	Materiais: Vidraria.....	- 121 -
3.1.2	Materiais: Reagentes e Solventes	- 121 -
3.1.3	Aparelhos e métodos	- 122 -
3.2	Tratamento de fluorescência em estado estacionário	- 123 -
3.3	Tratamento de dicroísmo circular (DC).....	- 124 -
3.4	Ensaios de deslocamento de fármacos.....	- 125 -
3.5	Modelagem molecular	- 125 -
4.	Resultados e Discussão.....	- 127 -
4.1.	Análise de espectroscopia no UV-Vis	- 127 -
4.2.	Análise dos resultados envolvendo a equação de Stern-Volmer	- 131 -
4.3.	Análise do duplo logaritmo e da equação de Stern-Volmer modificada.....	- 136 -
4.4.	Parâmetros termodinâmicos	- 139 -
4.5.	Investigação acerca das mudanças conformacionais da ASH	- 140 -
4.6.	Ensaios de deslocamento de fármacos.....	- 142 -
4.7.	Análise teórica sobre a interação ASH:ligantes	- 144 -
5.	Conclusões.....	- 148 -
6.	Referências Bibliográficas.....	- 149 -
7.	Anexo: Produção científica	- 185 -

1. Introdução

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças tropicais negligenciadas (DTN) compõem um grupo diversificado de doenças transmissíveis que são causados por uma variedade de patógenos, como vírus, bactérias, protozoários e vermes parasitas (helmintos). Elas recebem esse nome pois prevalecem em países tropicais e subtropicais, afetando em especial populações economicamente mais sensíveis, além do fato de não terem atenção governamental, midiática, das indústrias farmacêuticas e até mesmo da academia [Molyneux; Savioli e Engels, 2017].

Atualmente, 20 doenças são classificadas como DTN¹, apesar desse número já ter sofrido mudanças algumas vezes pela OMS. Essas doenças são: dengue e chikungunya, raiva, úlcera de Buruli (infecção por *Mycobacterium ulcerans*), treponematose (sífilis endêmica), hanseníase (doença de Hansen), doença de Chagas (trypanossomíase americana), doença do sono (trypanossomíase africana), leishmaniose (visceral e tegumentar), cisticercose e teníase, dracunculose (doença do verme da Guiné), equinococose, infecções de origem alimentar por nematoides, filariose linfática, tracoma, oncocercose (cegueira dos rios), esquistossomose, sarna (e outras ectoparasitoses) acidente ofídico, micetoma/cromoblastomicose e outras micoses profundas e helmintíases transmitidas pelo solo.

A Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas² (DNDi, na sigla em inglês para *Drugs for Neglected Diseases initiative*), apontou, em um estudo de 2002, que entre 1975 e 1999, embora representassem 11% da carga global de doenças, esse grupo recebeu o registro de somente 1% dos novos medicamentos [Trouiller *et al.*, 2002]. Recorte mais recente da mesma organização³ mostra que o cenário pouco mudou, pois, considerando os 850 novos fármacos aprovados entre 2000 e 2011, apenas 4% deles tiveram como foco as DTN.

Em boletim publicado pelo Ministério da Saúde, datado de janeiro de 2024, estimativas da OMS apontam para mais de 1,7 bilhão de pessoas no mundo sob risco das DTNs, sendo mais de 30 milhões no Brasil, e juntas causam entre quinhentos mil a um milhão de óbitos no mundo, anualmente.

¹ Disponível em: World Health Organization (WHO). Specialized Information Services: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Acesso em: 22 de outubro de 2024.

² Uma organização sem fins lucrativos foi fundada, em 2003 por uma parceria supranacional firmada entre a médicos sem fronteiras e outras seis instituições — a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), do Brasil, o Conselho Indiano de Pesquisa Médica (ICMR), o Instituto Queniano de Pesquisa Médica (KEMRI), o Ministério da Saúde da Malásia, o Instituto Pasteur, da França, e o Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais da Organização Mundial da Saúde (WHO-TDR)

³ Disponível em Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi): . Acesso em: 22 de outubro de 2024.

As DTNs mais comuns no Brasil são: doença de Chagas, esquistossomose, hanseníase, leishmaniose visceral, leishmaniose tegumentar, oncocercose, raiva humana, tracoma e acidente ofídico. Até recentemente a filariose linfática estava inclusa nesse grupo, contudo, a partir de janeiro do corrente ano ela encontra-se no status de controlada,⁴ deixando a condição de “emergência de saúde pública”. O país, no entanto, ainda registra parte considerável da carga de DTNs na América Latina como, por exemplo, 90%⁵ dos casos de hanseníase da região. Ainda são registrados, aproximadamente, cerca de 10 mil óbitos anuais atribuídos as DTNs no Brasil, sendo principalmente associados à doença de Chagas e, em estudos recentes, as estimativas variaram de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, o que representava à época cerca de 1,0 a 2,4% da população [Martins-Melo *et al.*, 2016; Dias, *et al.*, 2016].

1.1.1 Doença de Chagas

Descoberta por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, em 1909 (Figura 1), no pequeno vilarejo de Lassance, em Minas Gerais, a doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, é uma DTN causada por um protozoário até então desconhecido, por ele chamado de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz [Chagas, 1909a; Chagas, 1909b]. Ao se referir à doença, Chagas disse em seu artigo: “*Como vedes, meus senhores, o estudo desta moléstia apresenta de curioso o fato de termos partido aqui do conhecimento prévio do germe, de o haver estudado minuciosamente em sua biologia, para, mais tarde chegar, baseado, de alguma forma, nessa mesma biologia, à noção, praticamente a mais importante, de ser ele fator etiológico de uma espécie mórbida humana. No esclarecimento etiológico das outras espécies mórbidas nada de similar encontramos; em todas elas, depois de profundamente estudada a moléstia, em sua sintomatologia, em suas condições epidemiológicas, tem se chegado à verificação do agente mórbido*” [Chagas, 1909b]

Ela é uma doença transmitida por um inseto hematófago popularmente conhecido naquela região como barbeiro, muito comum no interior das casas de pau-a-pique, típicas da população pobre das áreas rurais do Brasil. A tripla descoberta é tida como um marco da medicina tropical, devido a sequência incomum de se partir do encontro do vetor e do parasito para, em seguida, identificar a infecção humana, sendo comemorada como uma das maiores proezas da ciência

⁴ <https://www.who.int/pt/news/item/01-10-2024-brazil-eliminates-lymphatic-filariasis-as-a-public-health-problem>. Acessado em: 20 de outubro de 2024.

⁵ DTNs: Brasil tem mais de 90% dos novos casos de hanseníase registrados nas Américas — Ministério da Saúde, acessado em 20 de outubro de 2024.

nacional. [Kropf, 2009.]. Essa antiga doença tem o potencial de causar incapacidades e mortes e mesmo apresentando programas de controle, sistemas de vigilância, diagnóstico e tratamentos disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS)⁶, ainda se configura como calamidade de saúde pública⁷.



Figura 1: (a) Berenice, aos 2 anos, a primeira diagnosticada com a doença de Chagas e (b) Matéria de jornal trazendo Berenice, que viria a morrer aos 75 anos, de insuficiência cardíaca, e mostrando a história da doença, imagem retirado dos arquivos do Instituto Oswaldo Cruz [Lidani *et al.*, 2019]

Uma DTN, tal qual a DC, está relacionada a múltiplos aspectos que geram circunstâncias favoráveis à infecções, tais como aspectos sociais e ambientais atribuídos à pobreza, à iniquidade social, à exclusão e à urbanização crescente e, mesmo com medidas de controle já implantadas, como os supracitados, continuam influenciando no número de casos, bem como nos desfechos do tratamento das doenças.

Endêmica em 21⁸ países da América Latina, hoje, devido à maior mobilidade humana pelo globo, impulsionada pelo processo de globalização e seu consequente fluxo migratório, a doença atingiu hoje países ditos desenvolvidos, como Estados Unidos, Canadá, Austrália, Japão e até países do oeste, centro e norte europeu, elevando os casos de infectados [Lee *et al.*, 2013] (Figura 2).

⁶ https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/doenca-de-chagas/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-doenca-de-chagas_-_relatorio-de-recomendacao.pdf, acessado em: 26 de outubro de 2024.

⁷ WHO: Weekly Epidemiological Record, Genebra, n. 6, p. 33-44, fev. 2015. Disponível em: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/242316/WER9006_33-44.PDF, acessado em: 26 de outubro de 2024.

⁸ Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela.



Figura 2: Países da América Latina, em tom escuro de laranja, onde a DC é endêmica e países onde novos casos estão sendo registrados, em tom mais claro de laranja. [<https://dndial.org/doencas/doenca-de-chagas#fatos-sobre-a-doena/>]. Acessado em 22 de outubro de 2024]

Segundo a OMS⁹, é estimado que cerca de 6 milhões de pessoas sejam afetadas pela doença em todo o mundo, com a maioria dos casos concentrados na América Latina, e outras 75 milhões correm risco de infecção. Cerca de 30.000 novos casos são registrados anualmente na região, causando aproximadamente 12.000 mortes por ano, uma vez que somente cerca de 1 %¹⁰ receberá o tratamento adequado, acentuando-se assim a urgência por pesquisas tanto acerca de prevenção, quanto tratamento, fato que impulsiona esse trabalho.

1.1.1.1 O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um parasito flagelado, do reino Protista, sub-reino *Protozoa*, Filo *Sarcomastigophora*, subfilo *Mastigophora*, classe *Zoomastigophora*, ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Trypanosoma* [Rey, 1991]. Este protozoário possui um complexo ciclo de vida, envolvendo muitas formas que apresentam entre si importantes diferenças morfológicas, bioquímicas, genéticas e clínicas [Brener, 1963].

⁹ World Chagas Disease Day 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/campaigns/world-chagas-disease-day/2021>>; Acesso em: 28 jun. 2024.

¹⁰ Médicos sem Fronteiras; <[https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/doenca-de-chagas/?utm_source=googlegrants_exiber_com&utm_medium=cpc&utm_campaign=_\[sch\]_\[cmno\]_\[Exiber\]_-Doencas_Geral_trafego_Afinidade_texto_NA&utm_content=_NA&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw7Py4BhCbARIsAMMx-K_Im4xYaL0O2iAZAPTkXa4E-xw-5aLNKvnhO7Oicc_r74vBokjixIaAjuxEALw_wcB](https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/doenca-de-chagas/?utm_source=googlegrants_exiber_com&utm_medium=cpc&utm_campaign=_[sch]_[cmno]_[Exiber]_-Doencas_Geral_trafego_Afinidade_texto_NA&utm_content=_NA&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw7Py4BhCbARIsAMMx-K_Im4xYaL0O2iAZAPTkXa4E-xw-5aLNKvnhO7Oicc_r74vBokjixIaAjuxEALw_wcB)>; acessado em: 27 de outubro de 2024.

Pode infectar diversos gêneros de mais de 130 espécies de insetos triatomíneos, sendo as mais relevantes: *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Rhodnius* (Figura 3); que tem como diferenciação, além da coloração, a posição e número de segmentos de suas antenas [Meis e Castro, 2017].

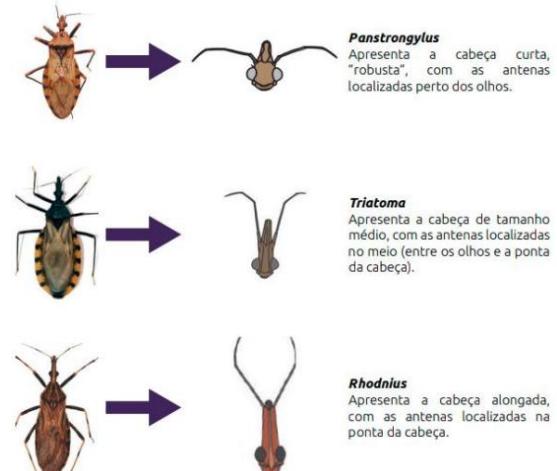


Figura 3: Diferenciação da posição das antenas na cabeça dos diferentes gêneros de triatomíneos, adaptado de Meis e Castro, 2017.

Seu ciclo de vida possui sete estágios de transformação, fase inicial sendo os ovos, cinco fases de ninfas, até a maturação final, na fase adulta, com a fêmea sendo ligeiramente maior (figura 4). Além do nome “barbeiro”, como já citado, podem ser conhecidos como bicho-barbeiro, chupão ou simplesmente percevejo.



Figura 4: Estágios da vida dos insetos triatomíneos. [disponível em: https://www.saberatualizado.com.br/2023/03/indigenas-na-amazonia-evoluiram.html#google_vignette]

Existe uma variedade extensa de células passíveis à infecção por este parasita, assim como de hospedeiros, podendo estar presentes em cerca de 120 espécies de mamíferos hospedeiros, como marsupiais, morcegos, roedores, carnívoros, xenarthras¹¹, lagomorfos¹² e primatas, como os humanos. [Coura, 2015; Pérez-Molina e Molina, 2018] O *T. cruzi* pode se apresentar,

¹¹ Superordem de mamíferos placentários que incluem tatus, preguiças e tamanduás.

¹² Ordem de pequenos mamíferos herbívoros, que inclui os coelhos, lebres e ocotonídeos

majoritariamente, sob as formas amastigota, epimastigota ou tripomastigota e, mais raramente, na forma promastigota (Figura 5).

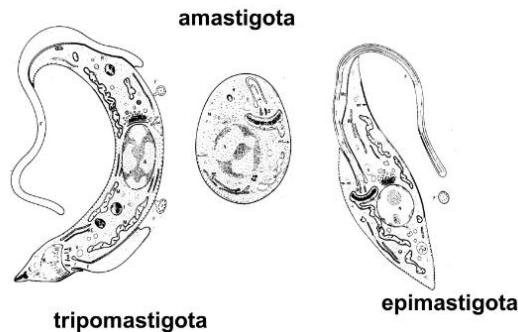


Figura 5: Formas majoritárias do *T. cruzi*.

As amastigotas (do grego, *a* = negação; *mastis* = chicote) são constituídas por células arredondadas, com diâmetro de 2,4-6,5 μm , um flagelo curto, não aparente em microscopia óptica (Figura 6), pouco citoplasma, núcleo grande e se multiplica por divisão binária (Figura 7). Ela é a forma de replicação intracelular, presentes na fase crônica da doença, ou seja, representa o estágio replicativo no hospedeiro vertebrado [Meyer e De Oliveira, 1948]. Contudo, estudos apontam que também são capazes de gerar infecção nos hospedeiros [Carvalho e De Souza, 1989; Ley, Robbins, Nussenzweig e Andrews, 1990; Fernandes, Neira, Ferreira e Mortara, 2006; Pérez-Ayala *et al.*, 2011].

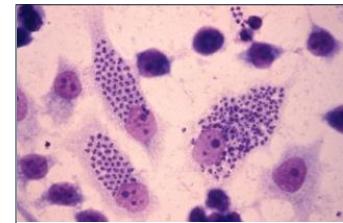


Figura 6: Forma amastigota do *T. cruzi*, por microscopia eletrônica.

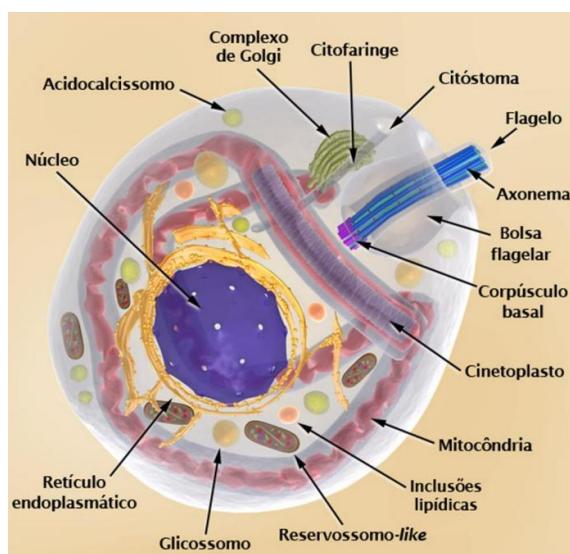


Figura 7: Representação da forma amastigota do *T. cruzi*, com suas organelas indicadas, adaptado de Teixeira *et al.*, 2012.

As formas epimastigotas (do grego, *epi* = por cima, anterior) são encontradas no tubo digestivo do vetor, são não-infectivas para os vertebrados, possuem comprimentos entre 20-40 μm e largura 2-5 μm (Figura 8), são fusiforme¹³ e apresentam o cinetoplasto¹⁴ junto ao núcleo, possuindo estruturas locomotoras aparentes, como flagelo e membrana ondulante e se multiplicam por divisão binária simples no vetor (Figura 9) [Pérez-Ayala *et al.*, 2011].



Figura 8: Forma epimastigota do *T. cruzi*, por microscopia eletrônica.

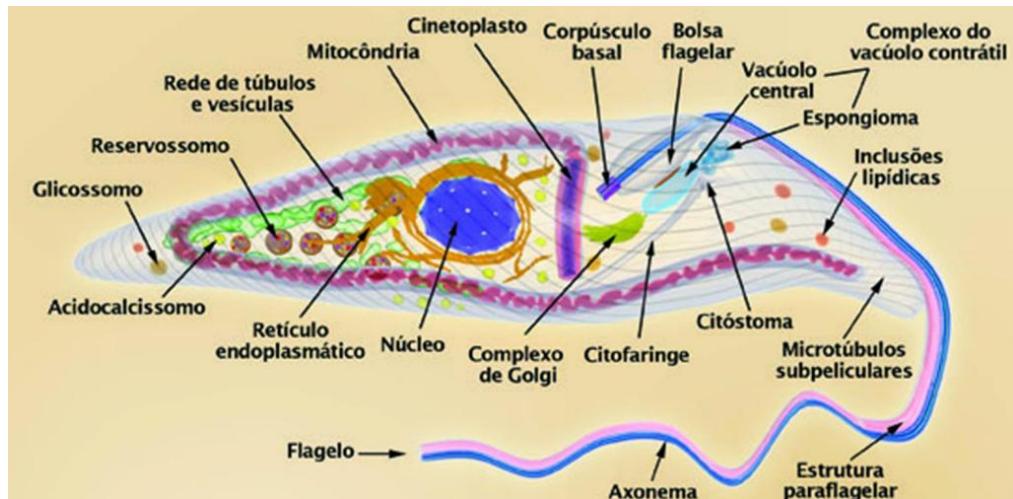


Figura 9: Representação da forma epimastigota do *T. cruzi*, com suas organelas indicadas, adaptado de Teixeira *et al.*, 2012.

As formas tripomastigotas possuem um comprimento de aproximadamente 18 μm , incluindo um flagelo livre de 6 μm e largura de 2-3 μm (Figura 10). São fusiformes e alongadas, o que lhes confere uma propriedade de se aderir a uma superfície por um único ponto enquanto fazem rápidos movimentos rotatórios, semelhantes a uma broca, daí o nome trypo (do grego, perfurar), além de serem dotadas de flagelo próximo ao cinetoplasto que lhes proporciona grande mobilidade. Incapazes de se dividir, são consideradas infectivas ao hospedeiro vertebrado, neste ocorrendo na corrente sanguínea e em diferentes tecidos (tripomastigota sanguíneo). Nos invertebrados (tripomastigota

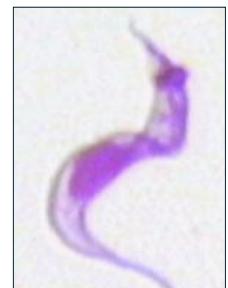


Figura 10: Forma tripomastigota do *T. cruzi*, por microscopia eletrônica.

¹³ Mais espessa ao centro e vai se estreitando de acordo que se aproxima das extremidades.

¹⁴ Região da mitocôndria onde está concentrado o kDNA, o DNA mitocondrial.

metacíclico), estão localizados no intestino posterior, perto da ampola retal (Figura 11) [Pérez-Ayala *et al.*, 2011].

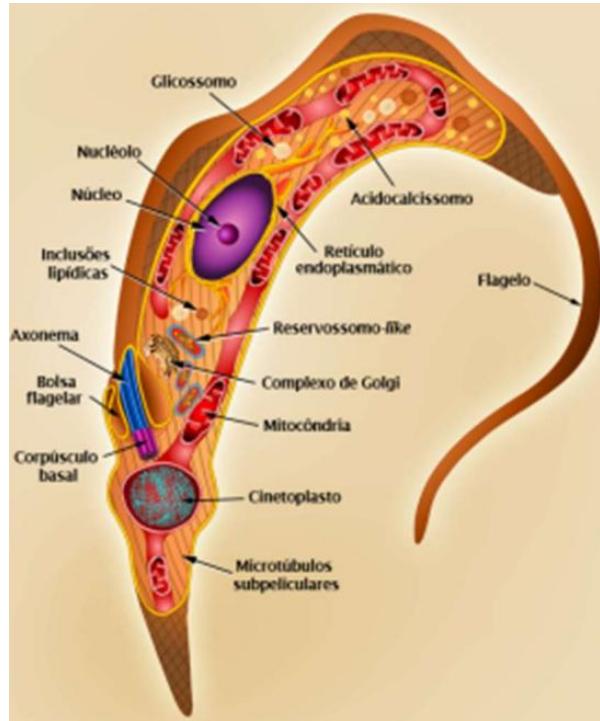


Figura 11: Representação da forma tripomastigota do *T. cruzi*, com suas organelas indicadas, adaptado de Teixeira *et al.*, 2012.

O *T. cruzi* também apresenta grande diversidade morfo-biológica, com mais de 60 linhagens ou cepas filogenéticas sendo descritas na literatura. Elas são identificadas com base em diferenças no comportamento biológico da cepa quando da infecção em animais controlados (de laboratório), característica bioquímica dos isolados e características moleculares dos diferentes estoques, além de diversidade genética revelada através do uso de marcadores enzimáticos e técnicas com o DNA do cinetoplasto [Coura *et al.*, 1966; Andrade e Magalhães, 1997].

A classificação dos genótipos de *T. cruzi* mudou algumas vezes durante os anos, contudo segundo consenso realizado em 2009 e atualizado em 2012, a nomenclatura dos genótipos de *T. cruzi* é aceita como sendo seis Unidades Discretas de Tipagem (UDT) (Tabela 1). Essa nova classificação reputa fatores como distribuição demográfica, patogênese, características clínicas e resposta à terapia para o tratamento da doença. [Zingales *et al.*, 1998; Zingales *et al.*, 2009; Zingales *et al.*, 2012]

O grupo *T. cruzi* I é, majoritariamente, observado em mamíferos selvagens, enquanto o *T. cruzi* II está associado à primatas e à infecções em seres humanos, consistindo, portanto, em cepas de alta parasitemia [Zingales *et al.*, 2012].

Tabela 1: Classificação dos genótipos de *Trypanosoma cruzi*, segundo consenso realizado em 2009, atualizado em 2012, adaptado de Zingales *et al.*, 2012

DTU	Abreviação	Nomenclatura anterior
<i>T. cruzi</i> I	TcI	DTU I
<i>T. cruzi</i> II	TcII	DTU IIb
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	DTU IIc
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	DTU IIa
<i>T. cruzi</i> V	TcV	DTU IId
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	DTU IIe

1.1.1.2 Ciclo evolutivo do parasita *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* ocorre no interior de dois indivíduos: um invertebrado, que é o vetor (o triatomíneo hematófago), e um vertebrado, sendo o hospedeiro (mamíferos, incluindo o homem) [Moncayo e Ortiz, 2006]. No hospedeiro, como por exemplo o ser humano, o *T. cruzi* apresenta-se sob as formas tripomastigotas e amastigotas, enquanto nos vetores ele se desenvolve nas formas de tripomastigotas e epimastigotas. [Pérez-Molina e Molina, 2018].

O ciclo de vida do parasito é mostrado na figura abaixo (Figura 12) e seu detalhamento pode ser entendido como: 1. O inseto vetor pica um hospedeiro mamífero e ingere tripomastigotas localizados no sangue; 2. Tripomastigotas metacíclicos; 3. Tripomastigotas se transformam em epimastigotas e alguns esferomastigotas; 4. Epimastigotas se multiplicam no intestino médio; 5. Epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior; 6. O inseto vetor passa os tripomastigotas metacíclicos nas fezes perto de um local de picada após se alimentar de um hospedeiro mamífero; 7. Tripomastigotas metacíclicos se formam; 8. Tripomastigotas metacíclicos infecta macrófagos; 9. Tripomastigotas metacíclicos se transformam em amastigotas; 10. Amastigotas são liberados do vacúolo parasitóforo; 11. Amastigotas se multiplicam no citoplasma; 12. Amastigotas se transformam em tripomastigotas; 13. Tripomastigotas irrompem para fora da célula; 14. Formam-se amastigotas e tripomastigotas; 15. (a) Tripomastigotas e (b) amastigotas infectam macrófagos [Teixeira, Benchimol, Crepaldi e Souza, 2012.].

Os estágios de 2 a 5 ocorrem no vetor. De 7 a 15 (a e b), no hospedeiro e os estágios assinalados como 1 e 6 são os pontos onde vetor e hospedeiro interagem.

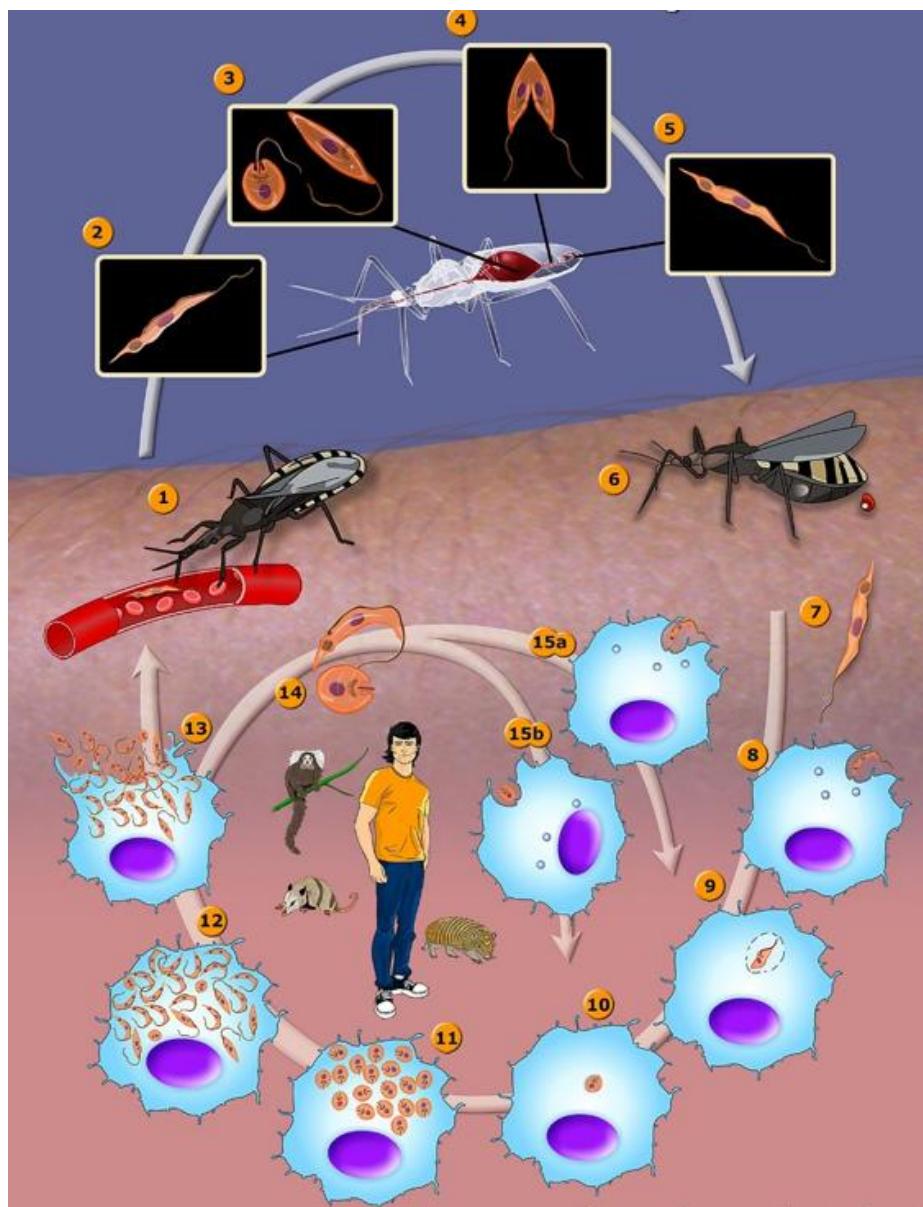


Figura 12: 1. Círculo de vida do *T. cruzi* e seus estágios infectivos nos vetores e nos hospedeiros, adaptado de Teixeira, Benchimol, Crepaldi e Souza, de 2012.

1.1.1.3 Transmissão e manifestações clínicas

Em 90% dos casos, a doença de Chagas é transmitida por via vetorial [Guhl 2009], ou seja, através de ação ativa do inseto. No entanto existem outras maneiras pelas quais o parasita pode ser transmitido aos humanos e as mais comuns são:

- Via transfusional: é transmitida por transfusão de sangue ou transplante de órgãos. Em outro momento essa via já foi mais representativa contudo, mas hoje os países possuem

controle rigoroso de testes e análises de sangue e órgãos de doadores, entretanto eventualmente podem ocorrer contaminações ou erros laboratoriais que levam a infecção. [Sanmartino *et al.*, 2015].

- *Via congênita ou vertical*: ocorre devido à presença de parasitemia durante a gravidez e é mais comum ocorrer se estiver na fase aguda da doença [Guhl, 2009; Zingales *et al.*, 2009]. Pesquisas apontam que podem ocorrer em até 12% dos casos, pois varia dependendo da cepa do *T. cruzi*, da parasitemia da mãe e da existência de dano placentário. É importante ressaltar que a doença não é transmissível pelo leite materno, não se fazendo necessário interromper a lactação [Náquira e Cabrera, 2009; Álvarez-Hernández *et al.*, 2016].
- *Via sexual*: embora as evidências não sejam suficientes, existem estudos que revelam a transmissão do *T. cruzi* através de relações sexuais em camundongos previamente infectados que se reproduzem com fêmeas não infectadas ou vice-versa. Depois, através de estudos parasitológicos, sorológicos e moleculares, foi detectada a presença do parasita no sangue, testículos ou ovários de camundongos não infectados [Ribeiro *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2019]. Além disso, foi observada uma percentagem mais elevada de parasitas presentes no sêmen em comparação com o fluido vaginal, o que sugere que o sêmen acabaria por ser um melhor veículo de transmissão [Ribeiro *et al.*, 2016].
- *Via oral*: está associada à ingestão de fezes de triatomas previamente infectados pelo parasita, à utilização de utensílios de alimentação contaminados ou ao consumo de carne de animais infectados. Vários casos observados no Brasil, Colômbia, México e Venezuela foram devido ao consumo de caldo de cana contaminado com *T. cruzi*, bem como ao consumo de suplementos de frutas vermelhas contaminados, o que ocorre mais predominantemente com o açaí, muito escolhidos pelos turistas. Isto é devido a higiene inadequada na coleta e manuseio de matérias-primas, antes da maceração [Dias, 2006; Santana *et al.*, 2019].
- *Devido a acidentes de laboratório*: Risco inerente a quem trabalha com os insetos infectados, ambientes com parasitas ou em hospitais que não tomam as medidas biossanitárias adequadas [Cabello e Cabello, 2008].

A doença de Chagas apresenta duas fases, a aguda, que é o estágio inicial, e a fase crônica, essa podendo persistir por toda a vida do paciente. A fase aguda da doença se manifesta em dois estágios. O primeiro caracteriza-se por ser assintomática em quase a totalidade dos casos

nos primeiros dias de infecção do hospedeiro vertebrado pelo triatomíneo. Após um período que compreende a 8-10 dias, ocorre o segundo estágio, no qual o indivíduo infectado apresenta alguns sinais, como o de Romaña (quando a via de entrada é conjuntival) e o chagoma de inoculação, podendo apresentar ainda febre sistêmica, astenia, mialgia, anorexia, cefaleia e miocardite, que é a principal causa de morte nesta fase [Auger *et al.*, 2002; Melnikov, *et al.*, 2005; Moncayo e Ortiz, 2006; Mitelman *et al.*, 2011; Barbosa e Nunes, 2012;].

O sinal de Romaña (Figura 13, à esquerda) se caracteriza por ser um edema indolor na pálpebra inferior e superior de um dos olhos, onde simultaneamente ocorre uma coloração palpebral eritematoso-violácea, congestão conjuntival e linfonodomegalia satélite. O chagoma de inoculação (Figura 13, à direita) consiste em um pequeno nódulo eritematoso que pode surgir em qualquer região do corpo. O aparecimento destes sinais vem acompanhado de febre, astenia, cefaleia, inapetência, linfonodomegalia generalizada e hepatoesplenomegalia, bem como manifestações cardíacas [Auger *et al.*, 2002; Melnikov, *et al.*, 2005; Moncayo e Ortiz, 2006; Mitelman *et al.*, 2011; Barbosa e Nunes, 2012;].



Figura 13: Indícios de infecção pelo *T. cruzi*, por meio vetorial. A esquerda, indivíduo com sinal de romaña e a direita outro indivíduo apresenta chagoma de inoculação, disponível em Instituto de Salud del Estado de México, 2017 (apud <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/parasito-hospedeiro>).

Essa infecção inicial gera uma resposta imunológica intensa, fazendo a parasitemia regredir e inserindo o paciente à fase crônica da doença, que se manifesta após a oitava semana de infecção [Auger *et al.*, 2002; Melnikov, *et al.*, 2005; Moncayo e Ortiz, 2006; Mitelman *et al.*, 2011; Barbosa e Nunes, 2012;].

A fase crônica é dividida em duas; a forma assintomática ou indeterminada, na qual, embora não haja sintomas, observa-se parasitemia [Gastañaga, García, Herraiz e Vidart, 2008]. Em geral esta forma persiste em cerca de 50-70% dos pacientes com a doença enquanto os outros casos podem passar para a forma sintomática 10-30 anos após a infecção¹⁵ [Andrade,

¹⁵ Andrade, Z. A.; Mem. Inst. Oswaldo Cruz, disponível em Patologia – Portal da Doença de Chagas., acessado em: 01 de novembro de 2024.

1999; Marin-Neto, Almeida Filho, Pazin-Filho e Maciel, 2002]. Esta forma é caracterizada por dois tipos de manifestações clínicas: uma cardiovascular e outra gastrointestinal com níveis baixos ou flutuantes de parasitemia. Os sintomas observados em pacientes enfermos no continente americano dependem principalmente do DTU I e II, como pode ser visto na Tabela 1, mostrada acima [Guhl, 2009; Zingales *et al.*, 2012]

A manifestação cardiovascular é definida, principalmente, pelas alterações cardíacas que se justificam através de miocardite progressiva, com a presença de aneurismas ventriculares e comprometimento da função diastólica, além de insuficiência cardíaca e aumento do coração (Figura 14) (Tanowitz *et al.*, 1990; Higuchi, 1995; Andrade, 1999).

As manifestações digestivas são menos frequentes, acometendo aproximadamente 10% dos infectados, desenvolvendo denervação parassimpática intramural com hipertrofia das camadas musculares e perda progressiva de capacidade contrátil; Em geral, observaram que ocorre ao nível do esôfago e cólon [Dias e Coura, 1997; Sanchez-Lermen, Dick, Salas; Fontes, 2007]

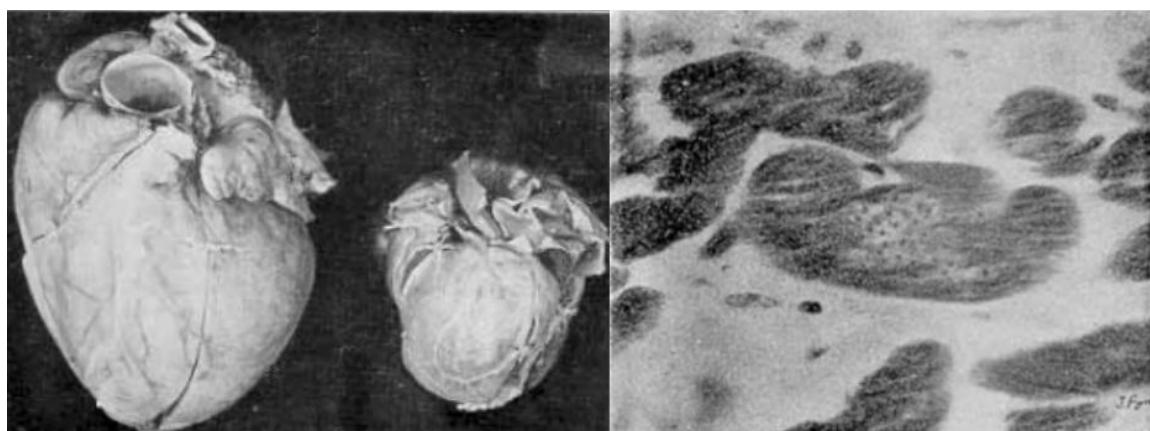


Figura 14: Na primeira imagem à esquerda temos um coração afigido pela doença de chagas, claramente aumentado, ao lado de um coração saudável; à direita imagem radioscópica de coração infectado, com aglomerado parasitário no interior das células cardíacas.

1.1.2 Combate quimioterápico da doença de Chagas

Apesar da história da quimioterapia da DC já ter mais de 100 anos, ela não possui cura. Essa história pode ser dividida em três momentos [Bremer, 1968; De Castro, 1993; Coura e Castro, 2002]: o primeiro compreende o estágio inicial da descoberta da doença, 1909, e se encerra quando da morte de Carlos Chagas (em novembro de 1934) e do lançamento do “Manual de Doenças Tropicais e Infectuosas” (em 1935), escrito por Carlos Chagas em coautoria com seu filho, Evandro Chagas. [Dias, Desso, Thiemann e Oliva, 2009]

A segunda fase, no período de 1936 a 1960, corresponde à avaliação biológica de diferentes substâncias químicas, extratos e misturas de componentes, sendo marcada por resultados controversos e de significado clínico questionável, entre os agentes empregados nesta fase, destaca-se o antisséptico violeta de genciana (1 - Figura 15), que ainda hoje é utilizado como agente profilático em bancos de sangue. [Bremer, 1968; De Castro, 1993; Coura e Castro, 2002; Dias, Desso, Thiemann e Oliva, 2009]

Já a última fase (a partir de 1961), é caracterizada por estudos que demonstraram claramente, através de modelos experimentais de infecção com *T. cruzi* em camundongos, a eficácia de alguns compostos como, por exemplo, a nitrofurazona (2 - Figura 15). [Bremer, 1961; De Castro, 1993; Dias, Desso, Thiemann e Oliva, 2009]. Este mostrou que, com uma dose diária de 100 mg kg^{-1} em esquema terapêutico de prolongada duração (50 dias em média) de nitrofurazona, 95% dos infectados na fase crônica foram curados. Entretanto, nos indivíduos doentes na fase aguda, apesar de bons resultados iniciais, 50% apresentaram remissão [Ferreira, 1961; Coura, Ferreira e Silva, 1961; Cançado, Marra e Brener, 1964; Rassi e Ferreira, 1971].

Nos anos seguintes a essas pesquisas, entre as décadas de 1960 e 1970, surgem dois compostos promissores, que apresentam novas perspectivas para o tratamento da doença de Chagas, tanto pela eficácia na fase aguda quanto pela tolerância. Estes são o nifurtimox (Lampit®, da Bayer), 3-metil-4-(5'-nitrofurilidenoamino)tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido (3 - Figura 15), produzido na década de 1960, e o benzonidazol (Rochagan®, da Roche), *N*-benzyl-2-nitroimidazol acetamida (4 - Figura 15), na década seguinte [De Castro, 1993].

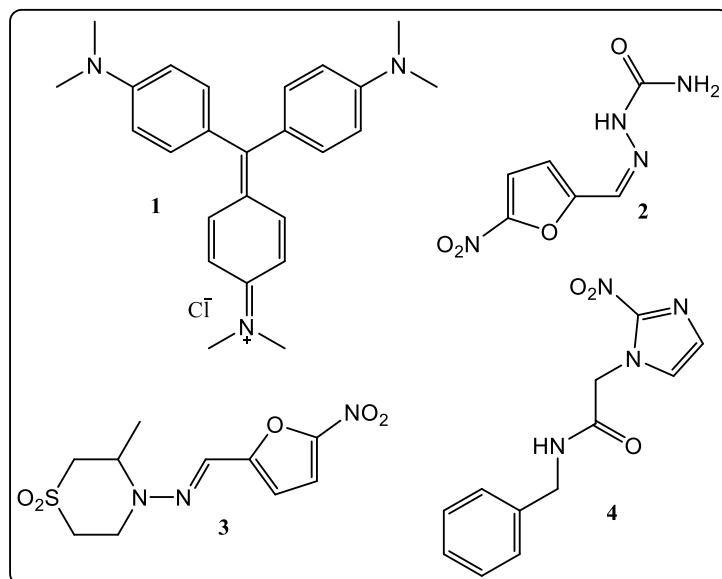


Figura 15: Estruturas químicas das moléculas violeta de genciana (1), nitrofurazona (2), nifurtimox (3) e benzonidazol (4).

O nifurtimox é um nitrofurano e o benznidazol (BZD) um derivado nitroimidazólico e ambos os fármacos possuem atividade significativa somente na fase aguda da DC, mostrando baixa eficácia clínica. Além disso, existem cepas do *T. cruzi* resistentes a estes fármacos [Urbina, 1994]. O nifurtimox possui elevada toxidez, o que causa baixa tolerância dos pacientes que, em geral, o abandonam o tratamento. Isso influenciou na descontinuidade de seu uso no Brasil, tendo o BZD como único fármaco comercializado e desenvolvido no Brasil. O laboratório farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE¹⁶) é o único laboratório público do mundo que produz o BZD e o distribui à população infectada através do SUS.

A ação do referido fármaco é sensível a algumas condições, como a duração do tratamento, a idade e a distribuição geográfica dos pacientes, entre outros. Como já dito, os resultados mais promissores foram observados na fase aguda da doença, onde o uso de BZD na dose de 5-7,5 mg kg⁻¹ (\approx 30 μ mol kg⁻¹) por dia, durante um período de 60 a 90 dias. [Rubio e Donoso, 1969; Schenone *et al.*, 1975; Coura e Castro, 2002; Coura, 2009]. Em indivíduos adultos, na fase crônica da infecção, os melhores resultados foram obtidos no Cone Sul da América do Sul (região sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile) e, apesar dos estudos não serem assertivos, acredita-se que seja devido ao tipo de cepa de *T. cruzi* predominante nesta região [Rubio e Donoso, 1969; Schenone *et al.*, 1972; Schenone *et al.*, 1975; Coura e Castro, 2002]. Se seguidas as condições apresentadas, o BZD pode apresentar entre 50 e 70% de cura na fase aguda, contrastando com valores percentuais inferiores a 20 na fase crônica da doença [Coura e Castro, 2002].

Muito embora o tratamento de escolha seja o BDZ, existe um grande debate sobre a sua real eficácia tendo em conta a frequência de efeitos adversos que apresenta, entre os quais estão os efeitos digestivos (anorexia, vômitos, dores abdominais) que se iniciam na primeira semana de tratamento, sintomas de hipersensibilidade e erupções cutâneas (24-50% dos pacientes), entre outros [Haberland *et al.*, 2013]. Além disso, alterações hematológicas como anemia, leucopenia, trombopenia, agranulocitose e púrpura se apresentam a partir da segunda semana [Viotti *et al.*, 2006; Carabarin-Lima *et al.*, 2011; Duschak 2016]. Portanto, recomenda-se administrar o tratamento complementar com base nos sintomas presentes e até observar a área geográfica do paciente, bem como a cepa responsável pela infecção (existem cepas resistentes),

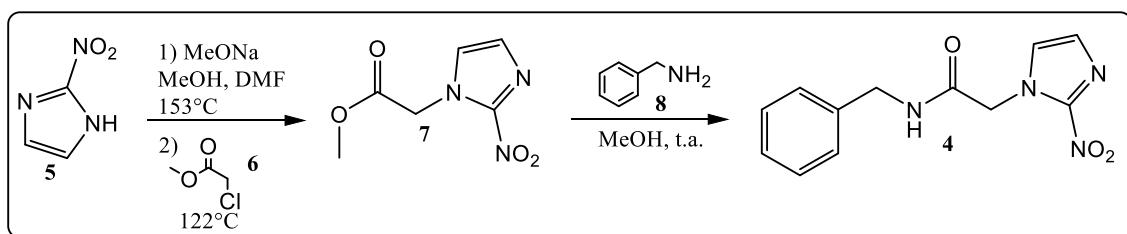
¹⁶ Laboratório farmacêutico de Pernambuco. Disponível em:< <http://www.lafepe.pe.gov.br/category/benznidazol>>. Acesso em: 5 de novembro de 2024.

pois a resposta terapêutica seria influenciada por esses fatores [González, Cuartero, Díez e Fernández, 2014].

1.1.3 Moléculas bioativas no tratamento da DC

O desinteresse das indústrias farmacêuticas (Lowell e Dearl, 2009) pelo desenvolvimento de novas substâncias contra a DC limita o emprego de quimioterapias adequadas ao tratamento desta ao uso do BZD e o nifurtimox, fármacos com mais de 60 anos.

A rota de síntese do BZD, desenvolvida pela indústria farmacêutica Roche, pode ser descrita como a reação entre o 2-nitroimidazol (5) e metóxido de sódio com posterior substituição nucleofílica no cloroacetato de metila (6). Em seguida, o éster (7) é submetido à reação com benzilamina (8) para fornecer o BZD (4) como produto (Esquema 1) (HOFFMAN-LA ROCHE, 1966).



Esquema 1: Rota sintética do BDZ, adaptado de Hoffman-La Roche [Hoffman-La Roche, 1966]

O mecanismo de ação do BZD, assim como do nifurtimox, não é completamente compreendido. Evidências indicam que o nifurtimox (3) e o BZD (4) atuam através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos (Figura 16), onde o grupo nitro ligado ao anel imidazol destes fármacos é reduzido por uma enzima conhecida como nitro-redutase I do protozoário (TcNTR). [Dias *et al.*, 2009]

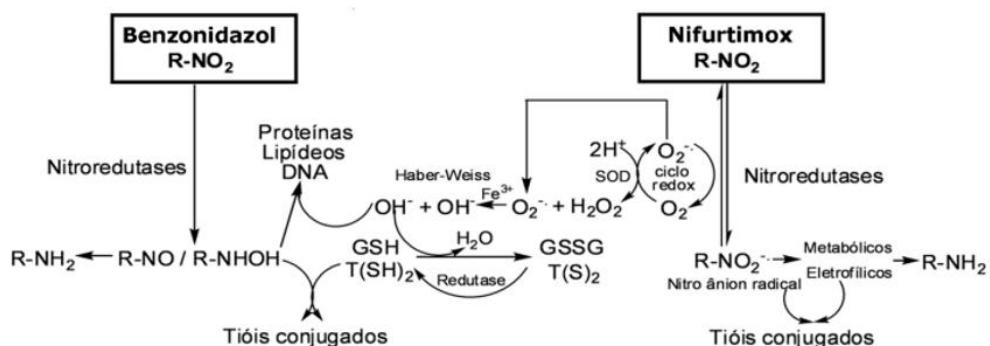


Figura 16: Mecanismo de ação proposto para os fármacos nifurtimox (3) e BDZ (4), adaptado de Dias e colaboradores, de 2009 [Dias *et al.*, 2009]

Este processo, iniciado pela reação catalisada pela NADPH-dependente citocromo P450 redutase (EC 1.6.2.4¹⁷), leva à formação de um intermediário nitro radicalar (R-NO₂^{·-}) com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH) [Docampo *et. al.*, 1981; Moreno *et al.*, 1982; Docampo *et al.*, 1984; Maya *et al.*, 2007].

No caso de 3, o radical nifurtimox reduz o oxigênio molecular (O₂) formando assim o íon superóxido (O₂^{·-}) e regenerando o grupo NO₂ num processo conhecido como ciclagem redox. O íon superóxido formado é captado pela enzima superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) gerando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que, através da reação de Haber-Weiss na presença de íons Fe(III), forma o radical hidroxila (·OH) [Díaz De Toranzo, *et al.*, 1988; Romanha *et al.*, 2002]. A esta espécie tem sido atribuído o efeito tripanocida por mecanismos complexos que envolvem ligação a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T. cruzi*. Por outro lado, o BZD não atua através do ciclo redox e não depende diretamente de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*) [Docampo *et al.*, 1981; Moreno *et al.*, 1982; Docampo *et al.*, 1984; Maya *et al.*, 2007].

O radical nitro formado pelo BZD estaria envolvido com seu efeito tripanocida através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi* (e.g., DNA e citocromo P450) [Toranzo *et al.*, 1988]. É descrito ainda que o BZD aumenta a fagocitose e lisa o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de interferon-gama (IFN-γ) [Romanha *et al.*, 2002], e inibe o crescimento do *T. cruzi* através da enzima NADH-fumarato redutase (EC 1.3.1.6) [Turrens, Watts Jr., Zhong e Docampo, 1996].

Com o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* as pesquisas por novos fármacos para o tratamento da DC têm evoluído sensivelmente nas últimas décadas, por conta dos avanços significativos obtidos nos aspectos biológicos, genéticos e evolucionários acerca do parasita, pois permitiu a identificação de vários genes, muitos deles existentes apenas no parasita e não no ser humano. Isso abre margem para a síntese de novos fármacos com menos ou sem efeitos deletérios para o paciente, além de contribuir com a identificação de diversos alvos biológicos promissores, sendo a maior parte de enzimas. Alguns desses alvos podem ser observados abaixo (Tabela 2) [Duschak e Couto, 2007; Herreros-Cabello, Callejas-Hernández, Gironès e Fresno, 2020; Ramirez, 2020]

¹⁷ A sigla EC representa a Comissão de Enzimas (do inglês, Enzyme Commission) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, e a sequência numérica é referente a sua classificação.

Tabela 2: Rotas metabólicas e alvos macromoleculares para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas, adaptado de Dias e colaboradores [Dias, Dessois, Thiemann e Oliva, 2009].

Alvo, via ou classe metabólica (função)	Enzima, organela ou rota metabólica
Proteases (Múltiplas funções que envolvem desde invasão celular a escape do parasita do sistema imune)	Cisteíno proteases; Serino proteases; Metaloproteínas; Treonino proteases
Biossíntese de esteróis (Essencial para a composição estrutural de membranas, mitocôndria e plasma)	Esterol 14-demetilase; Lanosterol sintase; Esqualeno epoxidase; Esqualeno sintase; D-24(25) esterol metiltransferase; 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase; Farnesilpirofósfato sintase; Farnesiltransferase
Via glicolítica (Produção de energia)	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; Hexoquinase; Fosfofrutoquinase
Biossíntese de lipídeos (Essencial em diversos constituintes celulares)	Alquil-lisofosfolipídeos; Glicosfingolipídeos
Metabolismo dependente de grupos tióis (Mecanismo de defesa contra estresse oxidativo)	Tripanotiona redutase; Tripanotiona sintetase; Triparedoxina peroxidase
Metabolismo de pentose fosfato (Mecanismo de defesa contra estresse oxidativo)	6-Fosfogluconato desidrogenase
Super família de proteínas quinases (Produção de energia)	Arginina quinase; Fosfatidilinositol-3 quinase
Transporte e metabolismo de poliaminas (Defesa contra estresse oxidativo)	Arginina descarboxilase; Glutationil espermidina sintetase
Síntese de nucleotídeos (Precursors da síntese de materiais genéticos)	Purina fosforibosil transferases; Di-hidrofolato redutase; Pteridina redutase; Di-hidro-orotato desidrogenase
Organelas celulares (Funções diversas)	Núcleo e cinetoplasto; Mecanismo de transporte de Na^+/H^+ ; Componentes da membrana e osmorregulação; Glicossomo e síntese de vitamina C
Transferência de ácido siálico (Transferência do ácido a partir de glicoconjungados do hospedeiro e incorporação em moléculas de mucina ligadas à membrana parasitária)	Trans-sialidase
DNA topoisomerase (Replicação do DNA do <i>T. cruzi</i>)	DNA topoisomerase I; DNA topoisomerase II

Na literatura é possível encontrar uma grande gama de estratégias para o planejamento de compostos com atividade “anti-*cruzi*”, incluindo os métodos mais modernos de SBDD (do inglês *Structure Based Drug Design*) e LBDD (do inglês *Ligand Based Drug Design*). O uso conjunto dessas estratégias é aconselhado sempre que possível, para que os resultados de ambas se complementem [Dias, Dessois, Thiemann e Oliva, 2009; Saldívar-González, Prieto-Martínez e Medina-franco, 2017].

Dentre as estratégias mais utilizadas no planejamento de agentes antiparasitários está a investigação de vias bioquímicas para a seleção de alvo dos patógenos, que possam ser moduladas específica ou seletivamente por moléculas, considerando-se a presença ou ausência do alvo no hospedeiro. Várias enzimas vêm sendo estudadas para o desenvolvimento de novos fármacos tripanocidas por diferentes estratégias multidisciplinares, com diferentes níveis de complexidade e de incorporação de métodos e tecnologias de planejamento. [Andricopulo e Montanari, 2005; Guido, Oliva e Andricopulo, 2008]

A via de biossíntese de esteróis é a mais estudada para o desenvolvimento de novos compostos tripanocidas, uma vez que os esteróis são lipídeos derivados de isoprenos produzidos na maioria das células eucarióticas e são essenciais para diversos processos ligados à manutenção da estrutura e função das membranas plasmáticas. Eles apresentam um núcleo esteroide com quatro anéis de carbono fundidos, sendo três com seis átomos de carbono e um com cinco átomos de carbono (9, Figura 17) [Nelson e Cox, 2018].

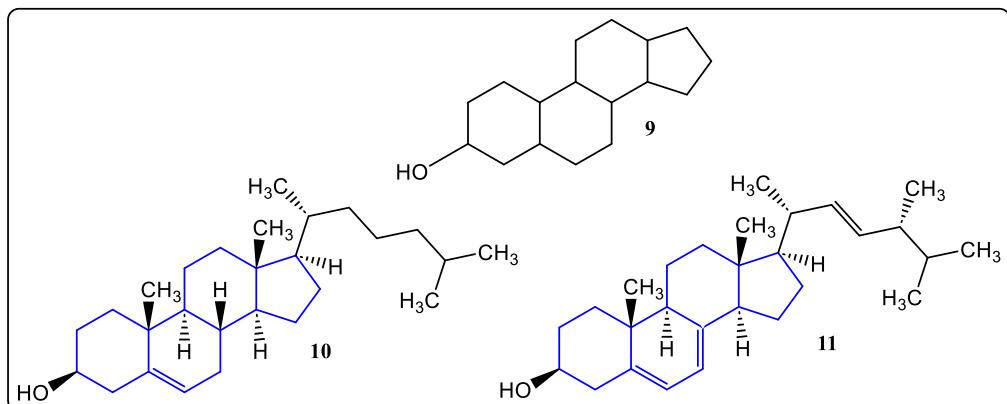


Figura 17: Núcleo do esterol (9), colesterol (10) e ergosterol (11), com o núcleo esterol evidenciado em azul.

Enquanto o ser humano produz colesterol (10, Figura 17), o *T. cruzi* produz ergosterol (11, Figura 17). Ambos são pertencentes à via do esterol e são fundamentais para o crescimento, desenvolvimento e proliferação em todas as fases do ciclo de vida e para sua sobrevivência. Assim, a inibição dessa via metabólica compromete a produção de ergosterol, bem como a integridade da membrana plasmática das células do parasito, portanto são tidos como promissores alvos e estudados para o desenvolvimento de novos inibidores para uso como tratamento da DC, inclusive através do reposicionamento de fármacos, aproveitando inibidores da enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51) usados em doenças fúngicas. Os derivados azólicos são os inibidores da síntese de ergosterol mais representativos, já possuindo inclusive fármacos com ampla comercialização, tais como o fluconazol (12, Figura 18) e o cetoconazol (13, Figura

18) [De Souza e Rodrigues, 2009; França *et al.*, 2014; Macedo, Soares e Vasconcelos, 2024; Bisio, Medina, García-Bournissen e Gulin, 2024].

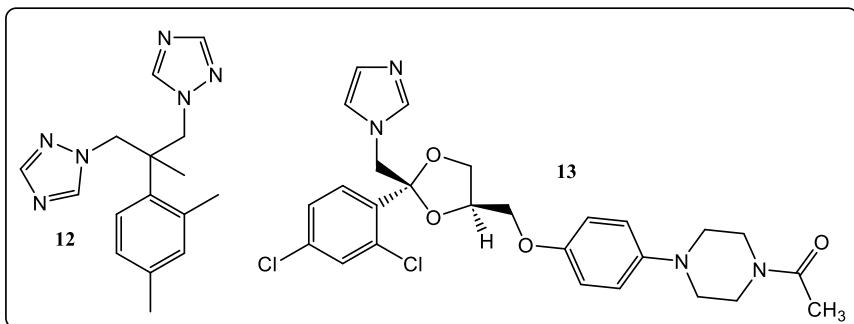


Figura 18: Estrutura dos azocompostos fluconazol (12) e cetoconazol (13)

O produto natural piperina (19a, Fig. 19) atraiu interesse devido às suas excelentes propriedades biológicas; além disso, as características estruturais da piperina permitem uma ampla gama de transformações sintéticas [Srinivasan, 2007; Singh e Choudhary, 2015]. A conjugação dos efeitos tripanocidas conhecidos da piperina com a capacidade da fração triazol de bloquear a atividade do CYP51, um alvo potencial em *T. cruzi* [De Souza, *et. al.*, 2019; Papadopoulou, *et. al.*, 2015], tem sido objeto de estudos científicos conduzidos do grupo do Prof. Marco Edilson Freire de Lima [Franklim, *et. al.*, 2013; Franklim, *et. al.*, 2019]. 1,2,4-triazol-3-tionas substituídas em N₄ (19a-e, Fig. 19) preparadas a partir da piperina, mostraram atividade *in vitro* contra *T. cruzi*, possivelmente devido à capacidade dos *N*-heterociclos de coordenar com o átomo de ferro do grupo heme CYP51 do parasita [Castro, 2021]

Na busca por candidatos a fármacos, a consideração de aspectos relacionados tanto à farmacocinética quanto à farmacodinâmica desde a fase inicial de seu desenvolvimento tem sido defendida tanto por agências reguladoras quanto por organizações de pesquisa farmacêutica como uma forma de melhorar a eficiência e a produtividade na pesquisa e desenvolvimento de fármacos [van der Graaf e Benson, 2011.]

Vários aspectos estão envolvidos na farmacocinética, incluindo a distribuição de fármacos no corpo humano. A albumina sérica humana (ASH) é uma proteína importante relacionada à eficiência de distribuição de fármacos e outras substâncias por todo o corpo humano [Peters, 1985; De Simone, di Mais e Ascenzi, 2021]. As albuminas séricas, uma das proteínas mais solúveis do sistema circulatório, são necessárias na distribuição de muitas substâncias para diferentes órgãos. Assim, a interação de um composto com a albumina resulta em um aumento em sua solubilidade plasmática, em uma diminuição em sua toxicidade e até mesmo proteção contra oxidação [Spinella, Sawhney e Jalan, 2016; Tayyab e Feroz, 2021]. As albuminas séricas

são as transportadoras e distribuidoras de ligantes endógenos, como hormônios e esteroides, e exógenos, como fármacos, metabólitos, ácidos graxos, aminoácido (geralmente triptofano e cisteína) e cátions metálicos (como cálcio, cobre e zinco) [Siddiqui *et. al.*, 2021; Naveenraj e Anandan, 2013; Chaves, Menezes e Iglesias, 2019].

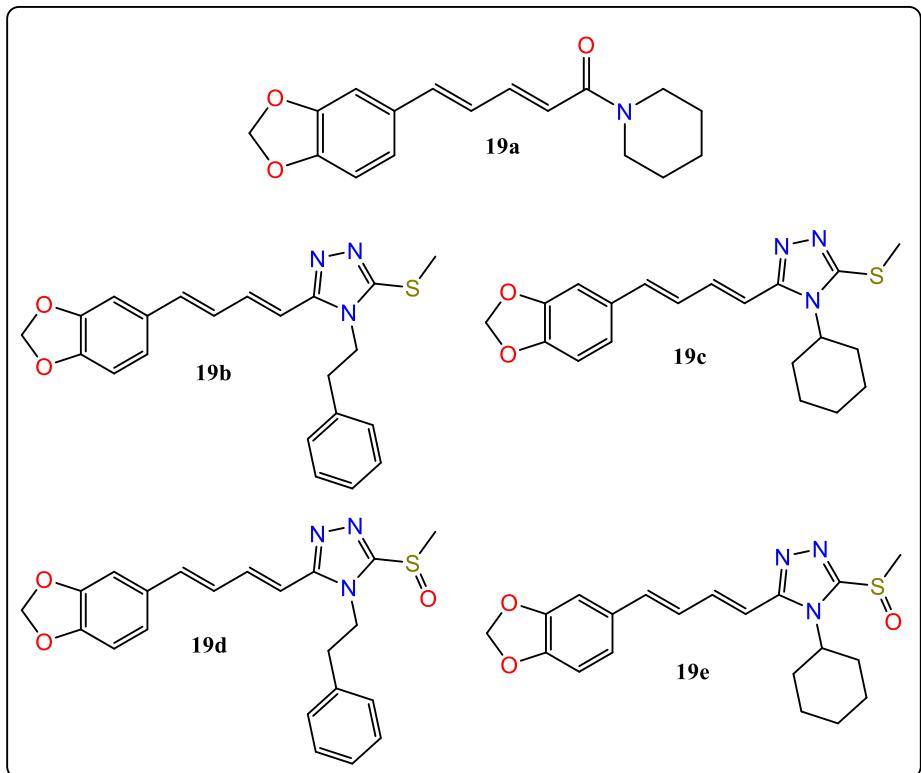


Figura 19: Estrutura química da piperina (19a) e dos triazóis 3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il)-5-(metiltio)-4-fenetyl-4H-1,2,4-triazol (19b); 3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il)-4-ciclohexil-5-(metiltio)-4H-1,2,4-triazol (19c); 3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il)-5-(metilsulfinil)-4-fenetyl-4H-1,2,4-triazol (19d) e 3-((1E,3E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il)-4-ciclohexil-5-(metilsulfinil)-4H-1,2,4-triazol (19e).

Em um estudo de Franklin e colaboradores [Franklim, *et. al.*, 2019], a interação entre albumina sérica humana (ASH) e um composto 1,2,4-triazol ativo contra *T. cruzi* sintetizado por nosso grupo foi investigada usando múltiplas técnicas espectroscópicas e docagem molecular, revelando que ASH é um potencial transportador endógeno para este composto na corrente sanguínea [Franklim, *et. al.*, 2019]. Seguindo este trabalho, uma nova série de derivados de 1,2,4-triazol-3-tionas N₄-substituídos foram preparados (19b-e, Figura 19), e apresentaram boas atividades contra epimastigotas de *T. cruzi* (IC₅₀ na faixa de 31,09–10,41 μ M) e tripomastigotas de *T. cruzi* (IC₅₀ na faixa de 27,59–6,13 μ M) [Rio, *et al.*, 2024].

A fim de verificar o comportamento de ASH como um transportador geral para esses compostos anti-*T. cruzi*, quatro deles foram selecionados desta série (compostos 19b-e, Figura 19) para serem avaliados como ligantes da ASH por diferentes técnicas espectroscópicas,

incluindo absorção ultravioleta (UV), dicroísmo circular (CD), fluorescência estável e resolvida no tempo combinada com cálculos de ancoramento via modelagem molecular. Finalmente, ensaios de deslocamento de fármaco foram conduzidos para identificar a principal cavidade interativa da albumina para os compostos **19b-e**.

1.2 Proteínas

As proteínas são biomoléculas compostas por uma ou mais cadeias polipeptídicas dobradas em uma forma globular ou fibrosa e as diferentes estruturas das destas são o resultado das diferentes combinações dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente (Tabela 3). [Lehninger, Nelson e Cox 1993]

Tabela 3: Os vinte aminoácidos naturais, suas abreviações, radicais, valor de constante de dissociação ácida (pK_a) e ponto isoeletrólico (pI) [Lehninger, Nelson e Cox 1993]

Aminoácido	Comum	Letra	Abreviações		pK_a	Outro (R)	pI
			α -COOH	α -NH ₃₊			
Alanina	Ala	A	2,34	9,69	-	-	6,02
Arginina	Arg	R	2,17	9,04	12,48 (guanidino)	-	10,76
Aspartato	Asp	D	2,09	9,82	3,86 (carboxil)	-	2,97
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 (ϵ -amino)	-	9,74
Metionina	Met	M	2,28	9,21	-	-	5,75
Prolina	Pro	P	1,99	10,60	-	-	6,30
Serina	Ser	S	2,21	9,15	-	-	5,68
Tirosina	Tyr	Y	2,20	9,11	10,07 (fenol)	-	5,66
Treonina	Thr	T	2,63	10,43	-	-	6,53
Triptofano	Trp	W	2,38	9,39	-	-	5,66
Valina	Val	V	2,32	9,62	-	-	5,97

Os aminoácidos apresentam as seguintes propriedades gerais:

- Apresentam atividade óptica, ou seja, desviam a luz polarizada (exceção à glicina);
- As configurações absolutas de açúcares simples e aminoácidos são especificadas pelo sistema D/L. Os α -aminoácidos que constituem as proteínas têm a configuração estereoquímica L. Os D-aminoácidos são encontrados em alguns antibióticos: valinomicina e actinomicina D, e como componente nas paredes de algumas bactérias: peptidoglicano;
- A cadeia lateral (R) determina as propriedades de cada aminoácido.

Os aminoácidos especiais, secundários ou raros são aqueles que ocorrem apenas em certos tipos de proteínas. Normalmente são derivados dos aminoácidos padrões, como por exemplo, 4-hidroxiprolina e 5-hidroxilisina (presente no colágeno), N-metil-lisina (miosina), γ -carboxiglutamato (protrombina) e desmosina (elastina).

Os α -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 ligações de hidrogênio, características hidrofóbicas e reatividade química [Lehninger, Nelson e Cox 1993]

1.2.1 Aminoácidos com cadeias laterais não-polares e alifáticas: *glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina*

Os grupos (em vermelho nas moléculas) 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 α , não contribuindo efetivamente para a existência de 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, Nelson e Cox 1993]

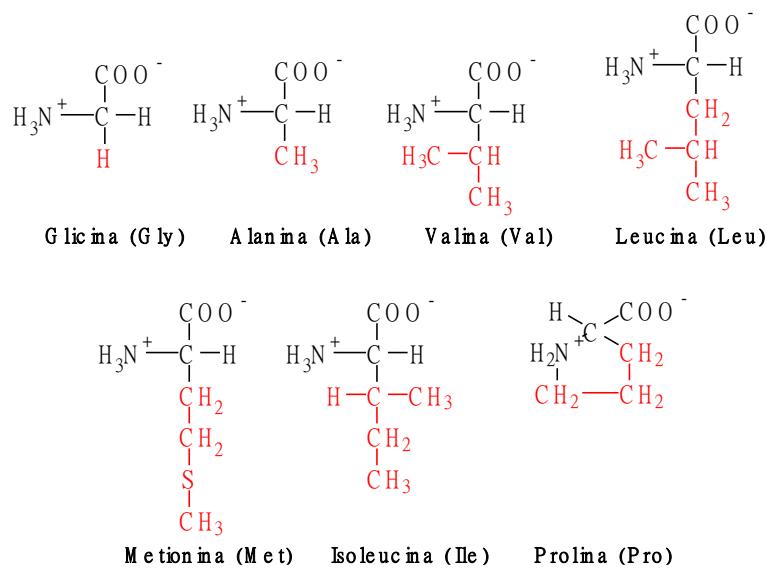


Figura 20: Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais não-polares e alifáticas [Lehninger, Nelson e Cox 1993].

1.2.2 Aminoácidos com cadeias laterais aromáticas: *fenilalanina, tirosina, triptofano*

Os α -aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (Figura 21) 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 π e tipo-T. Em alguns casos, como o da tirosina, que possui uma hidroxila fenólica, pode-se observar a formação de ligações de hidrogênio e de reações de desprotonação, resultando em fenolatos, sendo, por isso, um grupo funcional importante na atividade de algumas enzimas. Já o α -aminoácido triptofano, que possui um anel indólico, apresenta um ligeiro momento dipolar como consequência da sua estrutura química, sendo também capaz de fazer ligações de hidrogênio relativamente fracas. [Lehninger, Nelson e Cox 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, Nelson e Cox 1993]

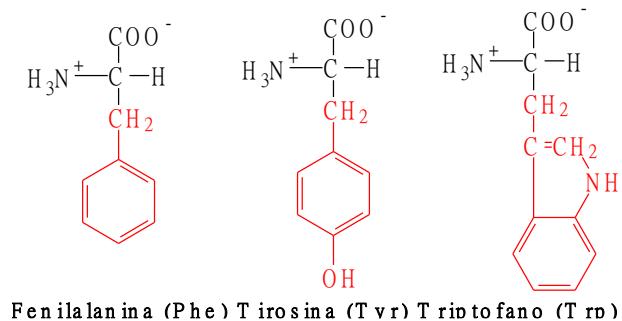


Figura 21: Estrutura de aminoácidos com cadeias laterais aromáticas [Lehninger, Nelson e Cox 1993].

1.2.3 Aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas: serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina

A cadeia lateral R dos α -aminoácidos: serina, treonina, cisteína, asparagina e glutamina (Figura 22) apresenta grupo funcional “hidrogênio prótico” capaz de estabelecer fortes interações por ligação de hidrogênio com a água e, consequentemente, 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 sulfidrila, facilmente polarizável, devido aos seus pares de elétrons livres; e a da asparagina e da glutamina, a seus grupos amida. [Lehninger, Nelson e Cox 1993]

A cisteína é facilmente oxidada para formar um aminoácido dimérico, unido covalentemente, chamado de cistina, no qual duas moléculas de cisteína estão unidas por uma

ligação dissulfeto. Os resíduos unidos por ligação dissulfeto são fortemente hidrofóbicos (apolares). As ligações dissulfeto têm um papel importante na estabilização de estruturas de muitas proteínas, em virtude de formação de ligações covalentes entre diferentes partes de uma molécula protéica ou entre duas cadeias protéicas distintas [Lehninger, Nelson e Cox 1993].

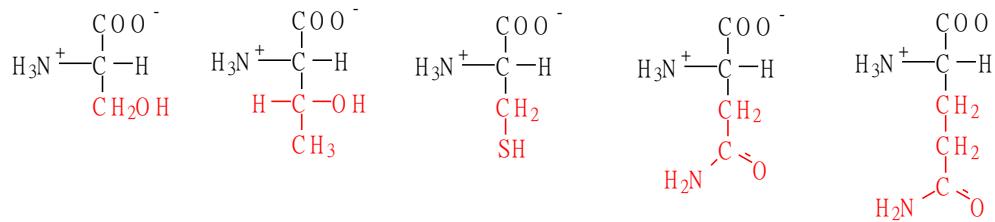


Figura 22: Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas [Lehninger, Nelson e Cox 1993].

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

Em pH fisiológico (pH=7) os α -aminoácido aspartato e glutamato tem uma carga líquida¹⁸ negativa, sendo caracterizados pela presença em sua estrutura de um segundo grupo carboxila (Figura 23) [Lehninger, Nelson e Cox 1993].

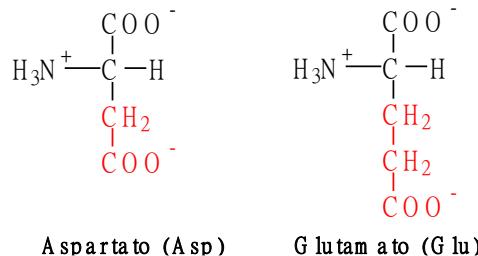


Figura 23: Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente (ácidos) [Lehninger, Nelson e Cox 1993]

1.2.5 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 7 são a lisina e a arginina que apresentam um grupo amônio e um grupo guanidino imida, respectivamente. O α -aminoácido histidina, que contém um grupo imidazol, tem como característica básica possuir uma cadeia lateral com pK_a próximo da

¹⁸ Quantidade de carga desequilibrada na estrutura molecular (molécula, AA, proteína...), podendo ser positiva ou negativa.

neutralidade. Em muitas reações catalisadas por enzimas, um resíduo de histidina facilita a reação ao servir como doador (na forma protonada) ou receptor de prótons [Lehninger, Nelson e Cox 1993].

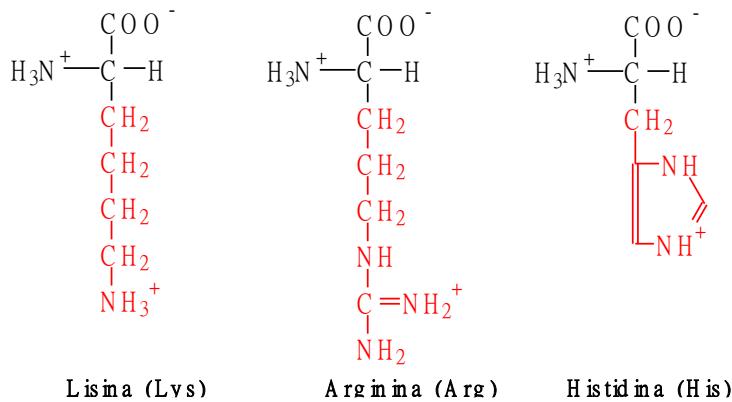


Figura 24: Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente (básicos) [Lehninger, Nelson e Cox 1993].

Os diferentes números e sequências de aminoácidos nas proteínas permitem que elas adotem diferentes estruturas tridimensionais 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] Elas podem ser divididas, quanto a essa organização espacial em globulares e fibrosas, conforme melhor narrado abaixo:

- **Proteínas globulares:** são proteínas em que as cadeias de amino ácidos 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, Nelson e Cox 1993; Stryer, 1995; Dose, 1982].
- **Proteínas fibrosas:** são proteínas em que as cadeias de amino ácidos 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, Nelson e Cox 1993; Stryer, 1995; Dose, 1982].

Pelas condições supracitadas, as estruturas moleculares das proteínas são muito complexas. Por essa razão convém dividi-las em níveis distintos de organização: estruturas

primária, secundária, terciária e quaternária, (Figura 25) [Lehnninger, Nelson e Cox 1993; Stryer, 1995; Dose, 1982].

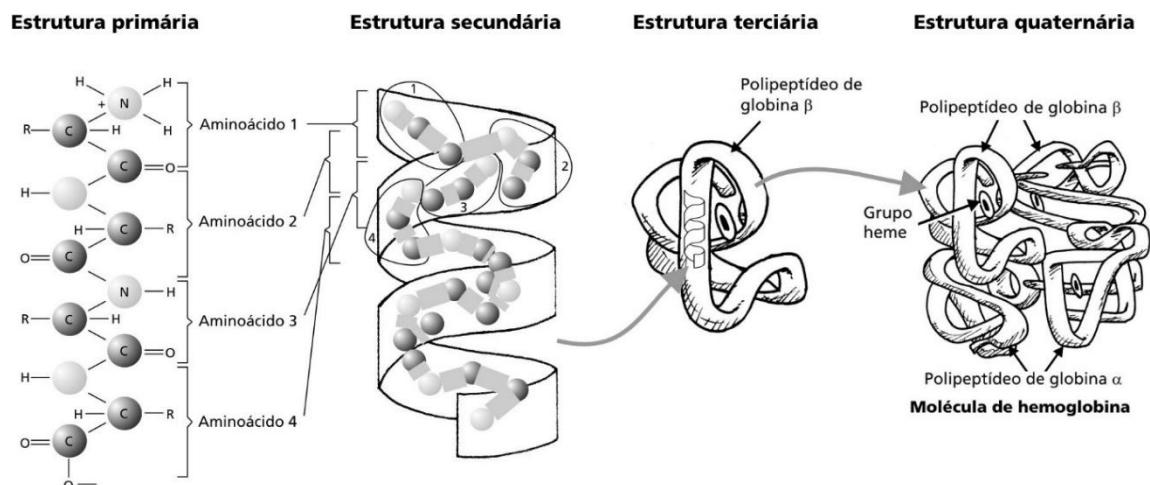


Figura 25: Níveis de organização da estrutura molecular de proteínas [Hemoglobina humana. Níveis de organização: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária - Canal CECIERJ, acessado em 21-09-2024]

- estrutura primária – é a sequência de aminoácidos que compõe as cadeias proteicas (Figura 26);

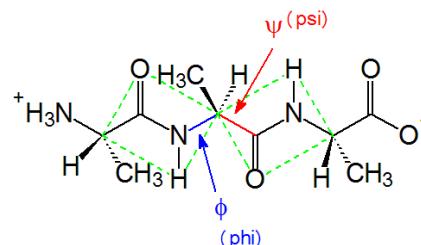


Figura 26: Estrutura primária de uma proteína caracterizada pela formação de uma ligação peptídica

- estrutura secundária – é a conformação da proteína em relação aos ângulos diedros ψ (C_α-N) e ϕ (C-C_α) (Figura 27, à esquerda), a qual é geralmente mantida por ligações de hidrogênio, gerando a hélice- α , folha- β , alças- β e γ e regiões de estruturas desordenadas (Figura 27, à direita);

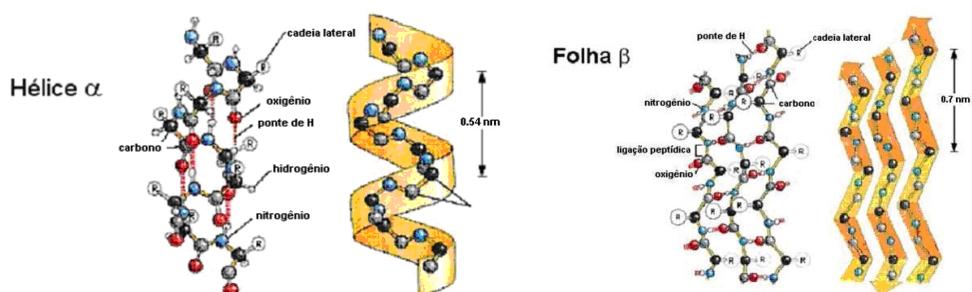


Figura 27: Estrutura secundária para uma proteína tipo hélice- α (à esquerda) e folha- β (à direita) [Lehnninger, Nelson, e Cox 1993]

- estrutura terciária – caracterizada pela disposição tridimensional completa que se forma a partir das forças de atração ou repulsão eletrostática, das ligações de hidrogênio, das forças de van der Waals e das pontes de dissulfeto existentes entre os resíduos de aminoácidos que formam as cadeias (Figura 28a);
- estrutura quaternária – é formada por oligômeros tridimensionais, que podem ser compostos por várias proteínas separadas, mas entrelaçadas por interações que se 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 28b).

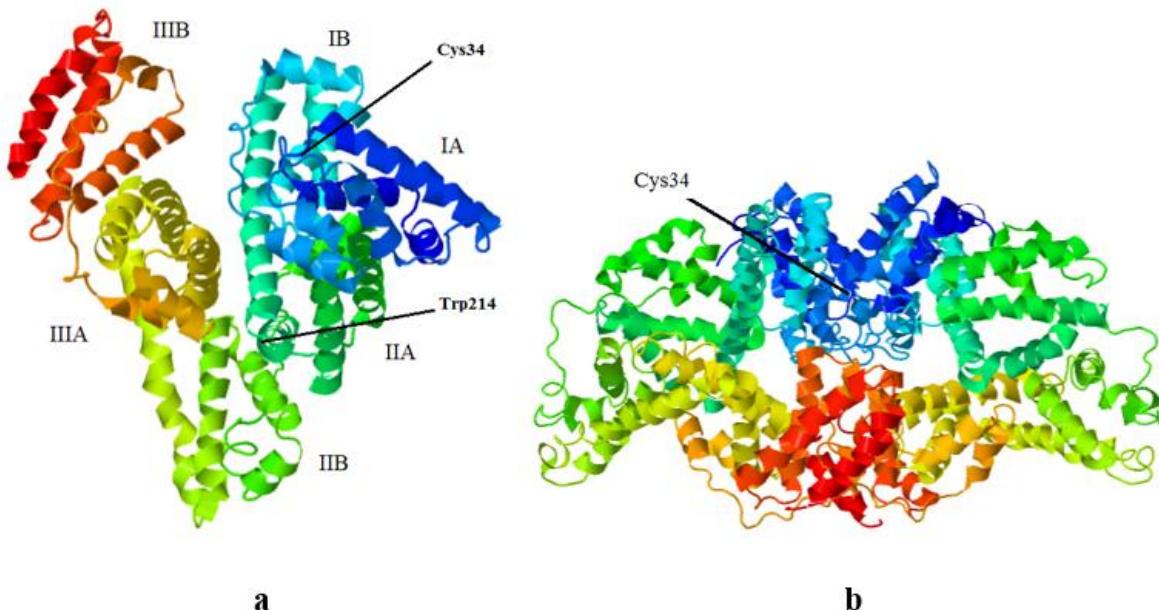


Figura 28: a) Estrutura terciária da ASH, ilustrando a localização dos resíduos de aminoácidos Cys34 e Trp214 e dos subdomínios, codificados por cores: IA-azul escuro; IB- azul claro; IIA, verde escuro; IIB-verde claro; IIIA-amarelo; IIIB-vermelho, [PDB ID,1AO6]; b) Representação da estrutura quaternária da ASH [PDB ID, 3JQZ] com os resíduos de cisteína em destaque (construída a partir das coordenadas 1BM0, disponíveis no PDB –Protein Data Bank)

1.3 Albumina Sérica Humana

A albumina sérica humana (ASH) (Figura 28) 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] Comparada a outras proteínas, ela é relativamente pequena, com massa molecular em torno de 69000 Daltons, arranjada predominantemente em α -hélices sustentadas e unidas por 17 pontes dissulfeto. [Doweiko e Nompleggi, 1991]

Como a albumina sérica humana (ASH), é uma macromolécula multidomínio [Peters, 1995; Evans, 2002; Mendez, 2005; Fanali, 2012], ela possui outras propriedades importantes, tais como, atividade de enolase [Drmanovic 1999; Matsushita 2004], de aril acilamidase [Manoharan, 2006; Masson, 2007; Smith, 1992], de esterase [Sakurai, 2004; Ge, 2013; Ascenzi, 2012; Komatsu, 2012a], atividade antioxidante [Gum, 2004; Faure, 2008; Bar-Or, 2001; Roche, 2008], além de realizar reações de condensação [Benedetti, 2011; Sharma, 2013], e possuir estereoespecificidade [Tsuda, 2001; Georges, 2000; Dubois-Presle, 1995] tendo como propriedade mais importante a atividade semelhante à esterase. [Wang, 2015; Gou, 2016]

O nome albumina deriva do termo alemão antigo albúmen, 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. Mais especificamente, AS é um membro de uma família de proteínas homólogas descritas por características estruturais distintas e propriedades peculiares de interação com um ligante. [Fanali 2012] A ASH pertence a uma família multigênica de proteínas que inclui α -famina, também denominada α -albumina e α -fetoproteína, e a proteína de ligação à vitamina D. [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]

Como já citado, a ASH é uma das menores proteína plasmáticas, no entanto é a mais abundante (~0,6 mM) compreendendo cerca de 50-60% das proteínas plasmáticas totais em humanos (Figura 10). [Berde, 1979; Abou-Zied, 2015; Sugio, 1999; Liu, 2015; Kratz, 2008] A concentração normal dela varia entre 35 e 50 g/L. [Peters, 1995; Choi, 2004; Rabanni e Ahn, 2019] A concentração normal de ASH na saliva é inferior a 0,5 mg/mL e isso é importante pois uma concentração maior de albumina glicada na saliva pode indicar diabetes mellitus tipo 2. [Vaziri, 2009; Rabbani, 2019] A albumina é uma proteína ácida, muito solúvel e extremamente robusta, sendo estável na faixa de pH de 4 a 9, solúvel em 40% de etanol e podendo ser aquecida a 60 °C por até 10 horas, sem sofrer efeitos de desnaturação. [Fasano, 2005; Bertucci, 2002; Kratz, 2008; Liu, 2015]



Figura 29: 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 *pKa* com uma faixa de 4,85-7,49. O grupo imidazol da histidina reage com H⁺ [Watson, 1999; Abou-Zied 2015] possibilitando que ela atue como um tampão de plasma eficaz, devido à presença de muitos resíduos carregados.

Em solução de água deionizada, ela possui ponto isoeletrônico¹⁹ 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, este ponto (pH 5,2) também corresponde ao ponto de carga máxima calculada, com cerca de um total de 100 cargas entre 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. Neste pH, a ASH 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]. Por ser uma proteína aniónica, a ASH é responsável por cerca de metade do intervalo aniónico²⁰ normal. Uma redução na concentração de proteína plasmática causa alcalose metabólica. [Deweiko e Nompleggi, 1991; Varshney *et al.*, 2010] A ASH tem outras funções regulatórias na fisiologia

¹⁹ O ponto isoeletrônico é o pH na qual a carga líquida de uma molécula, incluindo todos os íons ligados, é zero.

²⁰ Também chamado de hiato aniónico ou, em inglês, anion gap, é a diferença entre cátions e anions no sangue. Tendo o cálcio como o principal cátion e bicarbonato e cloreto, os principais anions do plasma, o valor tido como normal do intervalo aniónico ocorre com 140mEq/L de Ca²⁺, e 24 e 105 mEq/L de bicarbonato e Cl⁻, respectivamente.

humana, como a regulação do potencial redox e da pressão coloidosmótica plasmática entre o sangue e os tecidos [Doweiko e Nompleggi, 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 “N” (neutra) e “B” (básicas), sob condições de equilíbrio. Esta transição N-B tem significado fisiológico e é sugerida pelo fato de que, sob concentrações aumentadas de íons Ca^{++} no plasma sanguíneo, o isômero B predomina. [Lejon *et al.*, 2004] Além disso, acredita-se que a função de transporte da albumina seja controlada por meio dessa transição ou semelhante a ela. [Ahmad, Parveen e Khan, 2006] A isomerização N-B é interpretada como “uma flutuação estrutural, um afrouxamento da molécula com maior adaptabilidade conformacional”. [Fanali, Ascenzi e Fasano, 2007; Varshney *et al.*, 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, sob a 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 permanece armazenada no fígado. Para a síntese da proalbumina, um único gene é responsável por traduzi-la em pré-proalbumina no cromossomo [Komatsu, 2012; Liu, Mu e Xing, 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 ligação, a cooperatividade e a modulação alostérica surgem entre os sítios de ligação; 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 ligação, da força de ligação 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 com alta afinidade a ácidos graxos de cadeia média e longa (AG), com constantes 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 et al., 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 Pb (II), Pt (II) e Au (III); liga-se ao Cu (II) e ao Ni (II) de maneira específica e ao Ca (II) e Zn (II) de maneira relativamente não específica e atua como veículo de transporte desses íons metálicos no sangue. [Leboffe, 2020] Mesmo tendo uma forte carga negativa, a ASH se liga fraca e reversivelmente a cátions e ânions. [Varshney, 2010]

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 de compostos terapêuticos (ou seja, absorção, distribuição, metabolismo e excreção) porque a maioria dos fármacos viaja no plasma e atinge os seus tecidos alvo ligados à ASH. [Abou-Zied, 2015; Liang, 2014; Ghuman et al., 2005; Yang, 2012; Gou, 2016]

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, elevadas de albumina na corrente sanguínea é uma medida da “Qualidade de Vida”. [Varshney, 2010]

A estrutura e a dinâmica da ASH são conhecidas por serem influenciadas por diferentes condições ambientais, 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 se ligam a ASH. [Varshney, 2010] Os efeitos alostéricos ocorrem quando a interação de uma substância com um agente ligante altera as interações de uma segunda substância em uma região diferente do mesmo agente. Tais efeitos podem ocorrer durante a ligação ligante-receptor e fármaco-proteína. [Visy, 2002; Christopoulos, 2002; Varshney, 2010]

Estas propriedades, bem como sua absorção preferencial no tecido tumoral e inflamado, sua disponibilidade imediata, sua biodegradabilidade e 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 séptico, 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]

1.3.1 A albumina ao longo do tempo

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 (hipoalbuminemia idiopática) [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 ligação 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 ao 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 O₂ [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]

Em questão de produções na literatura, foi feito uma busca entre repositórios científicos, e a base de dados “scifinder” registra um total de 58469 entradas, entre, artigos, capítulos de livros, patentes, dentre outras, sendo o primeiro registro datando de 1893. A base mostra um interesse constante sobre o tema, inclusive nos anos da recente pandemia da COVI-19, a despeito de muitos outros ramos da ciência que tiveram suas publicações severamente impactadas. Para mostrar esse crescente interesse no tema, foi elaborado o gráfico abaixo (Figura 30), onde é mostrado que somente nos últimos dez anos, são registrados 26121 documentos na referida base. Também foram realizadas buscas, com o mesmo termo, na base de dados “web of science”, onde se obteve 51365 registros no total e 17822, com o mesmo refino. Os dados mostram que a base “scifinder” é uma melhor fonte para o tema, contudo a “web of science” também apresenta números que a garante como uma boa base para pesquisas.

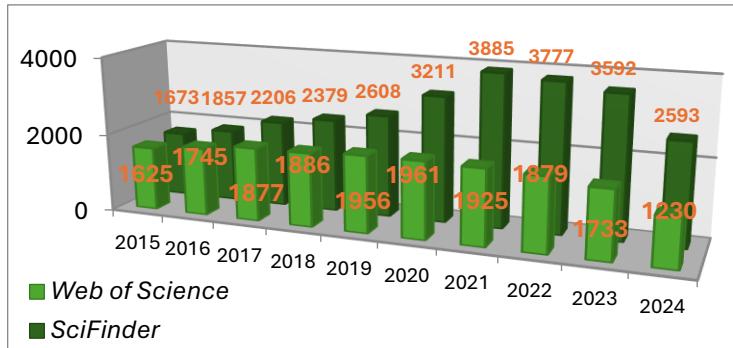


Figura 30: Gráfico que mostram o número de artigos, no intervalo entre 2015 a 2024, utilizando a palavra-chave *human serum albumin*, nas bases de dados *Web of Science* e *SciFinder*

1.3.2 Estrutura Química da ASH

Em 1975, a sequência primária de ASH foi identificada pela primeira vez (Figura 31) e a ASH inteira exibiu um peptídeo de sinal (resíduos 1-18), propeptídeo (resíduos 19-22) e proteína madura (resíduos 23-609). A proteína 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) [Meloun, Moravek e Kostka, 1975; Dugaiczky, Law e Dennison, 1982; Sugio, 1999; Liu, 2015].

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 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 32). 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 $(80 \times 80 \times 30 \text{ \AA})$ e volume de 88.249 \AA^3 [Sugio, 1999]. Toda a estrutura de ASH contém três domínios α -helicoidais homólogos que são estruturalmente semelhantes (Figura 13); domínio I (resíduos 1-195), domínio II (196- 383) e domínio III (384-585). [Fanali, 2012]

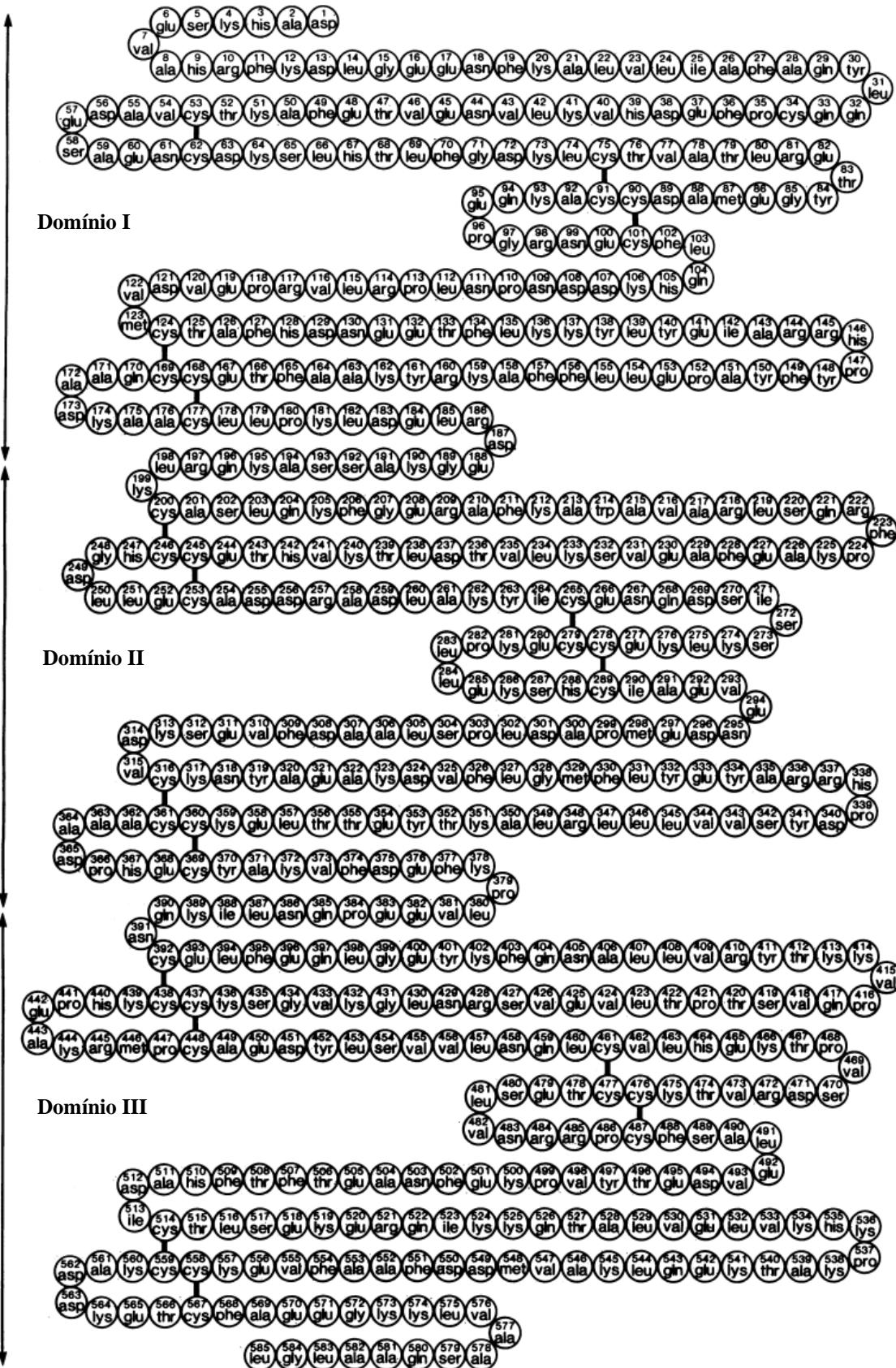


Figura 31: Sequência completa de aminoácidos da albumina sérica humana. O resíduo de cisteína 34 contém o único grupo SH livre da albumina. [adaptado de Dugaiczyk, Law e Dennison, 1982]

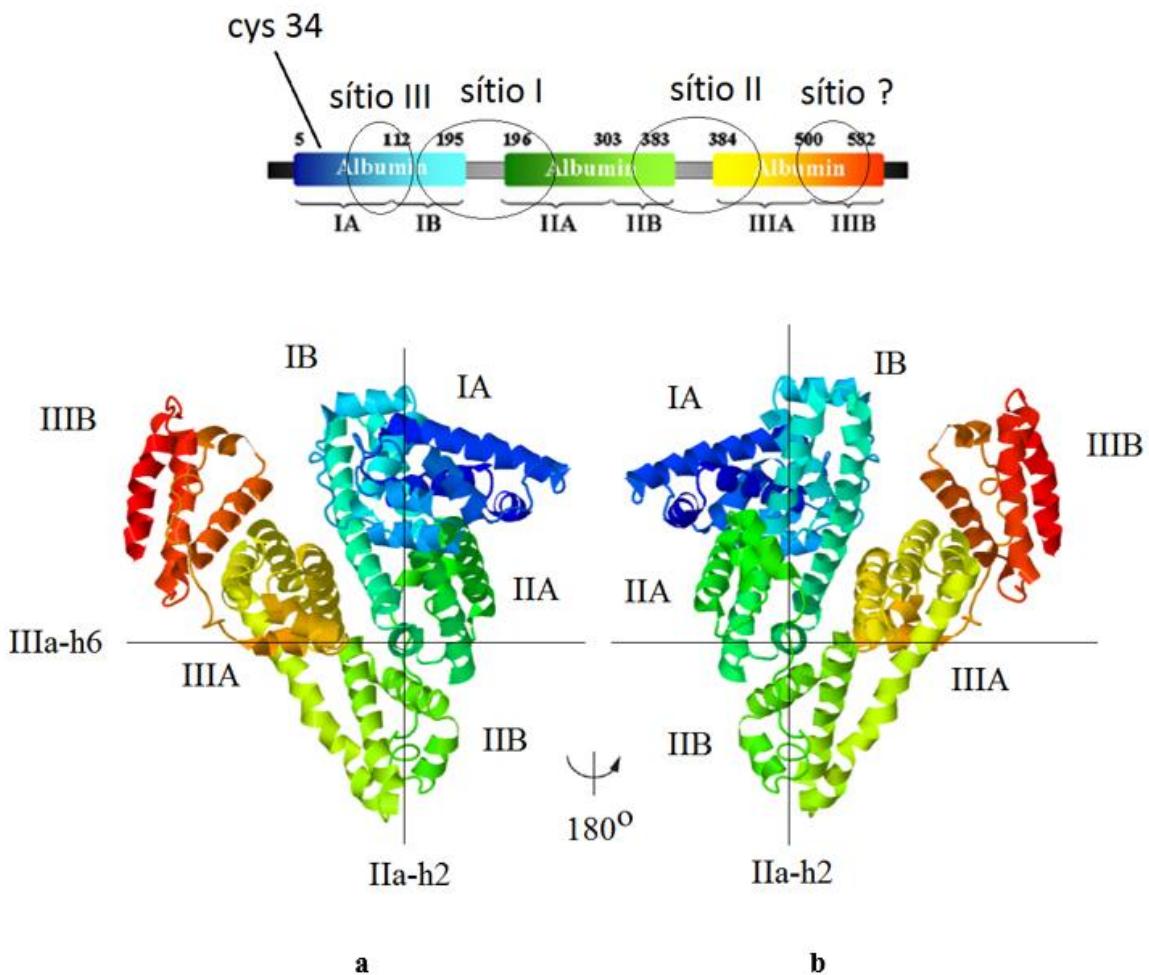


Figura 32: Representação em forma de fita da estrutura tridimensional da ASH e duas perspectivas diferentes (**a** e **b**) com rota relativa de 180° [PDB ID, 1AO6] [Sugio 1999]. Foram usadas como referência relativa as hélices- α IIa-h2 e IIIa-h6. A figura foi preparada usando o programa JSmol.

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 33). A sequência N-terminal da ASH é constituída por N-Asp-Ala-His-Lys-, que apresenta grande afinidade por diferentes metais. [Varshney 2010]

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 34). 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 (Figura 34 - a), [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].

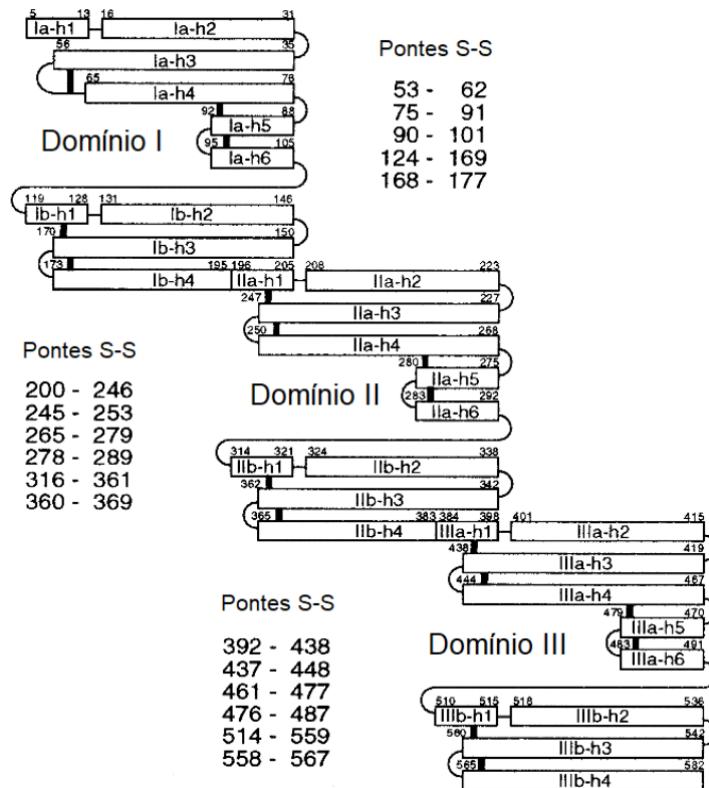


Figura 33: Representação dos subdomínios da ASH bem como suas respectivas hélices- α e pontes de dissulfetos. A sequência de nomenclatura é derivada do trabalho de Minghetti e colaboradores. [Minghetti 1986] [Sugio 1999].

O resíduo de triptofano está localizado na posição 214 no chamado 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 ligação. 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 ligação de compostos bioativos com ASH. [Abou-Zied, 2015]

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] As interações hidrofóbicas, promovidas pelo aumento da entropia resultante do deslocamento de moléculas da água que compõe as camadas de solvatação ao redor dos fragmentos hidrofóbicos, fazem as cadeias laterais hidrofóbicas colapsarem, formando um núcleo bem compactado que contém mais de 80% das

cadeias laterais apolares de uma proteína típica. [Borisover, 1996; Levy, 2006] Estas interações são centrais para o enovelamento de proteínas. Os cristais de proteína, que normalmente contêm quantidades substanciais de água (até 70%), mostram uma ampla gama de ambientes específicos de ligações 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]

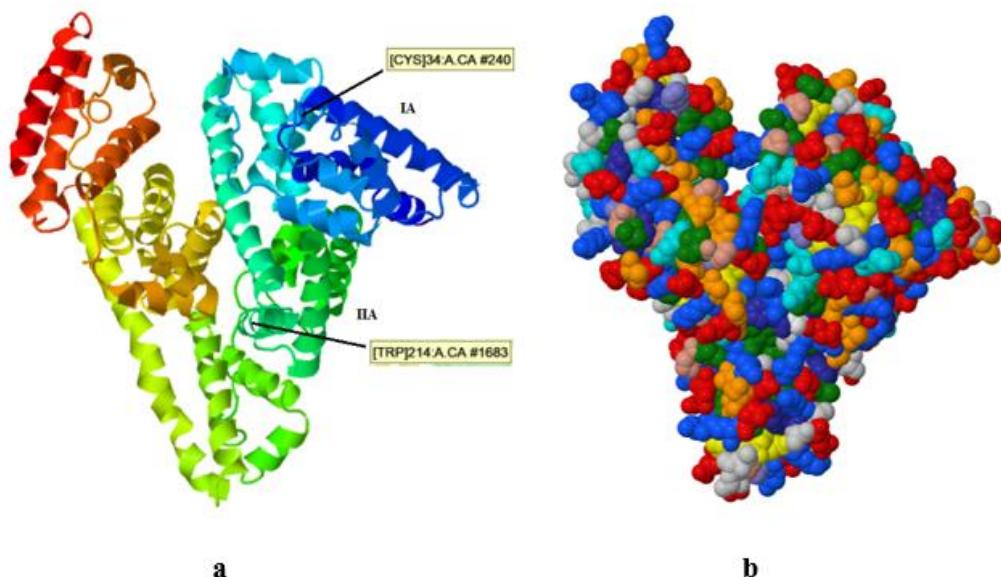


Figura 34: a) Estrutura tridimensional para ASH com destaque para a Cys34 e o Trp214, b) representação da estrutura da ASH mostrando as diferentes classes de resíduos de aminoácidos: azul escuro (Arg e Lys), azul claro (Gln e Asn), vermelho (Glu e Asp), amarelo (Cys), Alaranjado (Ser e Thr), verde, (Leu, Ile e Val), bege (Pro) e azul marinho (Phe e Tyr). [PDB ID, 1AO6] [Sugio, 1999] As figuras foram preparadas usando o programa JSmol.

Numerosos estudos biofísicos também revelaram que a ASH possui várias regiões anfifílicas, consistindo nas regiões formadas por várias hélices- α . A contribuição da anfifilicidade e a flexibilidade das regiões formadas pelas hélices- α para a ASH representa o grande potencial de ligação de vários ligantes com afinidade promissora (10⁻⁴ a 10⁻⁶ M), principalmente para aqueles com propriedades anfifílicas tais como ácidos graxos (AG). Uma análise mais detalhada indica que as principais forças de ligação responsáveis pela 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 ligação para o subdomínio IIIA foram impulsionadas pela entropia, o que implica que as interações hidrofóbicas são os principais fatores que contribuem para a ligação dos ligantes ao sítio de

IIIA. [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, Mu e Xing, 2015].

Estudos cristalográficos de uma variedade de fármacos e complexos de biomoléculas com ASH revelaram o número e a localização de seus sítios de ligação 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 ligação 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]

1.3.3 Sítios de ligação de ácidos graxos

Sob condições fisiológicas, a ASH é o principal transportador de ácidos graxos na forma não esterificada (99%), enquanto as lipoproteínas, como os quilomícrons, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), de baixa densidade (LDL) e 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 e colaboradores com uma série de ácidos graxos com diferentes tamanhos de cadeia mostraram que a ASH acomodava sete moléculas de ácido mirístico, com os respectivos sítios de ligação denominados FA1 a FA7 (Figura 35), tendo sido identificados os principais resíduos de α -aminoácidos que interagem com os respectivos ácidos graxos (Tabela 4). [Curry, 1998] [Bhattacharya, 2000, Wang 2015]

Tabela 4: Principais resíduos de α -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 α -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

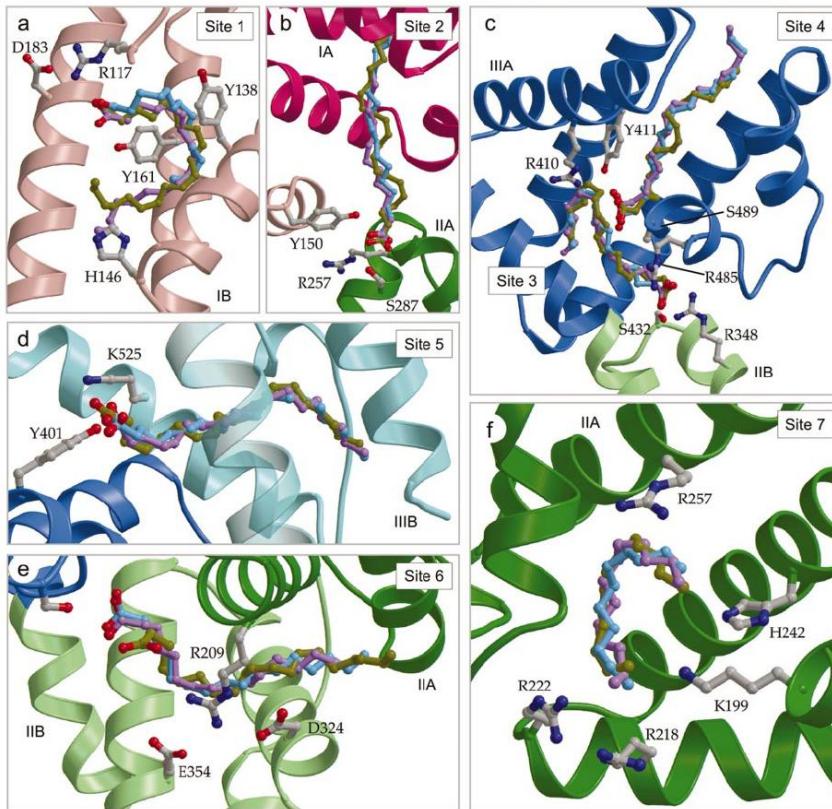


Figura 35: Representação para a estrutura cristalina dos sítios de ligação de ácidos graxos (FAs) mostrando os principais resíduos de α -aminoácidos que estão interagindo com os ligantes. As estruturas mostradas são para C18:0 (azul), C18:1 (violeta) e C20:4 (marrom) ligadas a (a) sítio FA1, (b) sítio FA2, (c) sítios FA3 e 4, (d) sítio FA5, (e) sítio FA6 e (f) sítio FA7. [Petitpas, 2001]

As posições de sítios de ligação de ácidos graxos (FA) foram identificadas para os diferentes subdomínios da ASH. [Dirks, 1951; Wolfbeis, 1987; Salvi, 1997; Kurono, 1992] Posteriormente, verificou-se que os sete sítios comuns de ligação de FAs acomodam tanto os FA de cadeia média e longa, bem como FAs monoinsaturados e poli-insaturados, como mostrado na Figura 36. A maior afinidade de ligação para FAs foi encontrada nos sítios FA2, FA4 e FA5. [Wang, 2015]

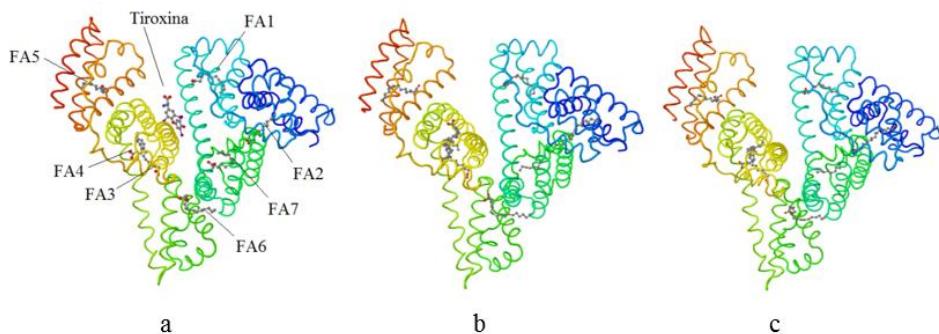


Figura 36: Estrutura cristalina para ASH complexada com três diferentes ácidos graxos. Os ácidos graxos são mostrados na cor amarela. **a)** ácido mirístico complexado com tiroxina (cor azul) [PDB ID, 1HK4] **b)** ácido esteárico [PDB ID, 1E7I] e **c)** ácido parmítico [PDB ID, 1E7H] Todas as figuras foram preparadas usando o programa JSmol

Em publicações posteriores, os estudos para a ligação com ácidos graxos indicaram que estes se ligam a nove sítios de ligação de ácido graxo (FA) presentes em ASH, sendo estes denominados FA1 a FA9, e divididos em sítios de ácido graxo primários (FA1-FA7) e secundários (FA8 e FA9) (Figura 37). [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-III-IIIIB do outro, respectivamente. [Leboffe, 2020] Apesar da estrutura de domínio de repetição da proteína, os sítios de ligação de ácidos graxos exibem uma distribuição surpreendentemente assimétrica. [Varshney, 2010]

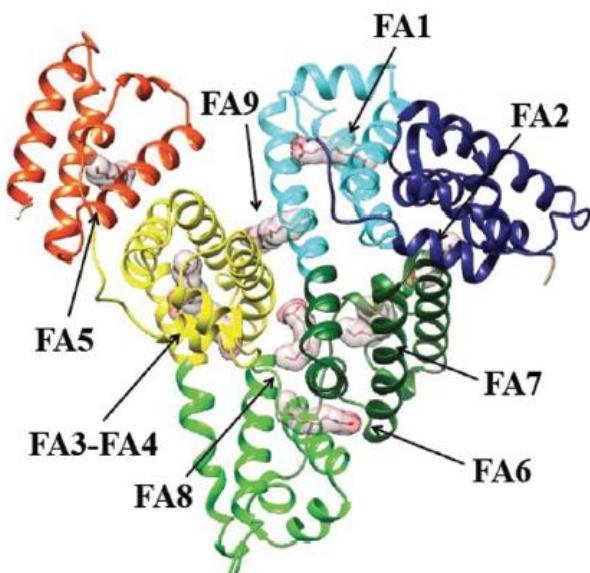


Figura 37: Representação para a cocristalização do ácido cápricos nos sítios de ligação de ácidos graxos FA1-FA7 (primários) e FA8 e FA9 (secundários) (PDB-1E7E). A figura foi preparada usando o programa JSmol.

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 ligação 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 SI de Sudlow (FA7), e FA8 e FA9, que estão localizados na fenda entre os subdomínios IB e IIIA (Figura 37) [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 ligação de ácidos graxos nos sítios FA2 e FA3 (Figura 38). [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 ligação. [Abou-Zied, 2015].

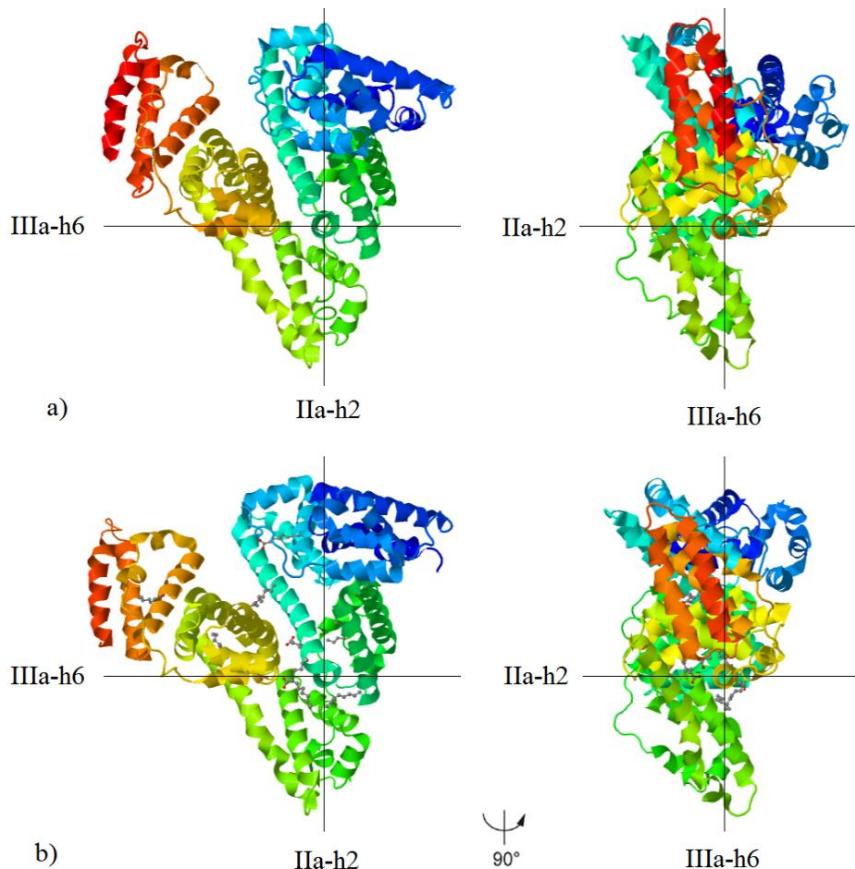


Figura 38: Comparação entre as estruturas cristalinas de: a) ASH nativa [PDB-ID, 1AO6] e b) ASH complexada com ácido cáprico. [PDB ID, 1E7E]. De modo a realizar uma comparação sistemática entre diferentes estruturas cristalinas de ASH, foram tomadas como referência relativa as hélices- α pertencentes aos subdomínios IIa-h2 e IIIa-h6. As estruturas foram construídas usando o programa JSmol

Embora os sítios de ligação pareçam bem adaptadas para acomodar o ácido graxo, a maioria é capaz de se ligar a outros ligantes. [Varshney, 20010] Os lipídios, que são outra classe importante de compostos endógenos, geralmente se ligam ao 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 ligação de fármacos, tendo sido observadas interações cooperativas e competitivas [Varshney, 2010].

Uma descrição mais detalhada dos sítios de ligação para ácidos graxos está mostrada a seguir, onde as moléculas de ácidos graxos (AGs) ligadas a ASH são representadas como bastões (Figura 40). 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]

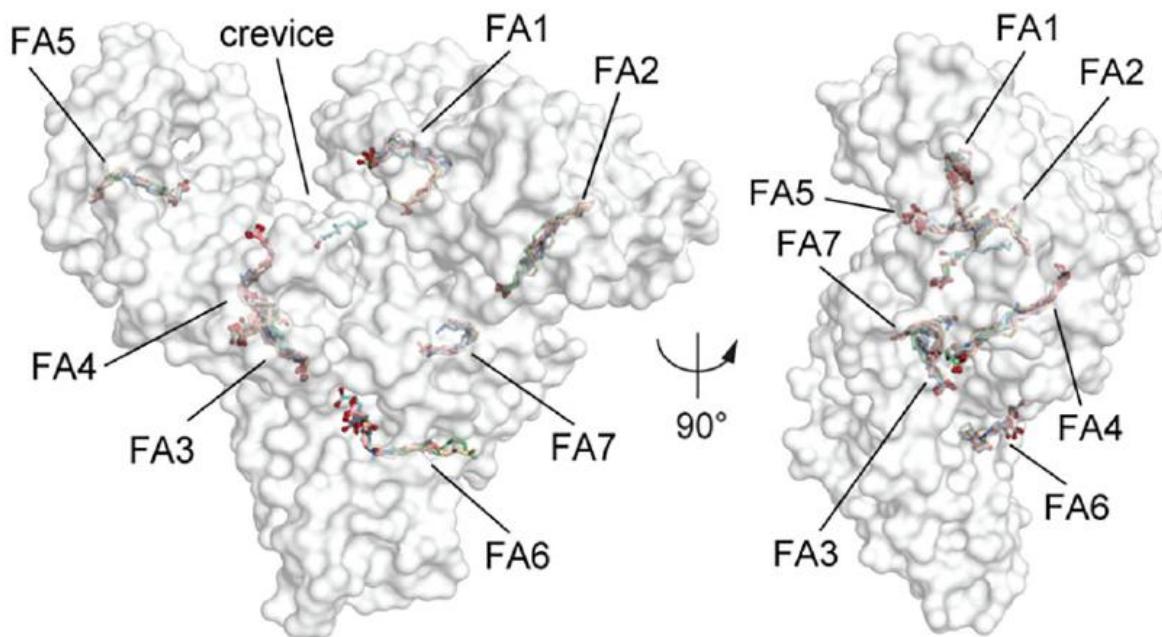


Figura 39: Representação estrutural do modo de ligação de múltiplos ácidos graxos (AGs) para ASH para os diferentes sítios de ligação (FA1 – FA7). A representação da superfície molecular da ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°). [Linciano, 2022]

1.3.3.1 O sítio de ligação de ácido graxo FA1

O sítio FA1 está localizado em uma cavidade em forma de D no centro do subdomínio IB (Figura 40). A cauda dos FAs de cadeia longa é cravada na cavidade, sua ponta fica em contato com His146 na parte inferior da abertura da cavidade, [Bhattacharya, 2000; Leboffe *et al.*, 2020] enquanto a cabeça polar está em contato com o resíduo Arg117 [Linciano 2022]

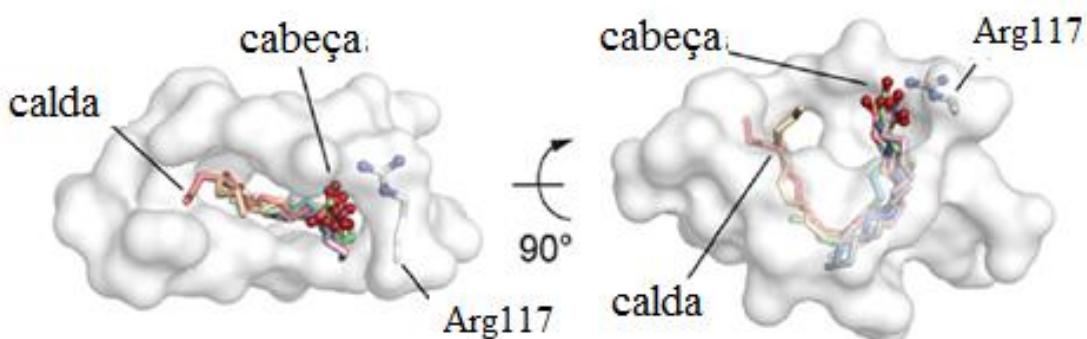


Figura 40: Representação estrutural do modo de ligação no sítio FA1 para múltiplos ácidos graxos complexados com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA1/ ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano 2022].

1.3.3.2 O sítio de ligação de ácido graxo FA2

O sítio FA2, localizado entre os subdomínios IA e IIA [Ghuman et al., 2005; Leboffe *et al.*, 2020], liga-se ao grupo carboxilato de FA por interações de ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr150, Arg257 e Ser287. A cauda do FA se estende linearmente dentro da cavidade hidrofóbica gerada pelos subdomínios IA e IIA [Bhattacharya, 2000a; Leboffe *et al.*, 2020]. FA2 é um dos locais menos acessíveis de ASH. Além de FA, apenas anestésicos foram relatados ligando-se nesta cavidade (Figura 41) [Ghuman et al., 2005; Leboffe *et al.*, 2020, Bhattacharya 2000b; Linciano, 2022]

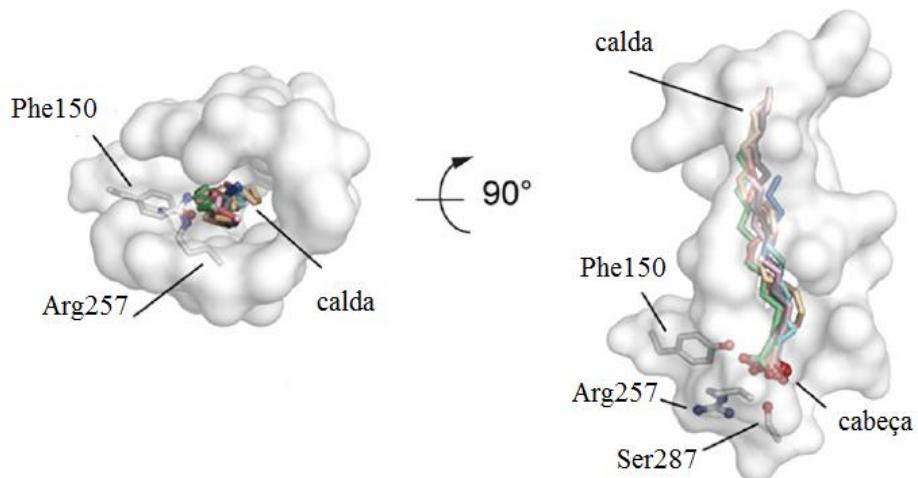


Figura 41: Representação estrutural do modo de ligação no sítio FA2 para múltiplos ácidos graxos complexados com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA2/ ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano 2022].

1.3.3.3 Os sítios de ligação de ácidos graxos FA3-FA4

Os Sítios FA3-FA4 (também chamada de sítio II de Sudlow) são localizados no subdomínio IIIA e ligam-se a dois ácidos graxos de cadeia longa (Figura 42). No sítio FA3 que se encontra em uma cavidade curva, o grupo carboxilato do FA faz ligação de hidrogênio com Ser342 e Arg348, localizados no subdomínio IIB, e com o resíduo Arg485, localizado dentro do subdomínio IIIA. O sítio FA4 é preferido por carboxilatos aromáticos em uma conformação estendida sendo que nesse caso, o grupo carboxilato (cabeça) de FA está ligado aos resíduos Arg410, Tyr411 e Ser489 localizados no subdomínio IIIA, enquanto a cadeia apolar (cauda) se projeta no túnel hidrofóbico do subdomínio IIIA [Ghuman et al., 2005; Leboffe *et al.*, 2020; Curry 2009; Bhattacharya ;2000].

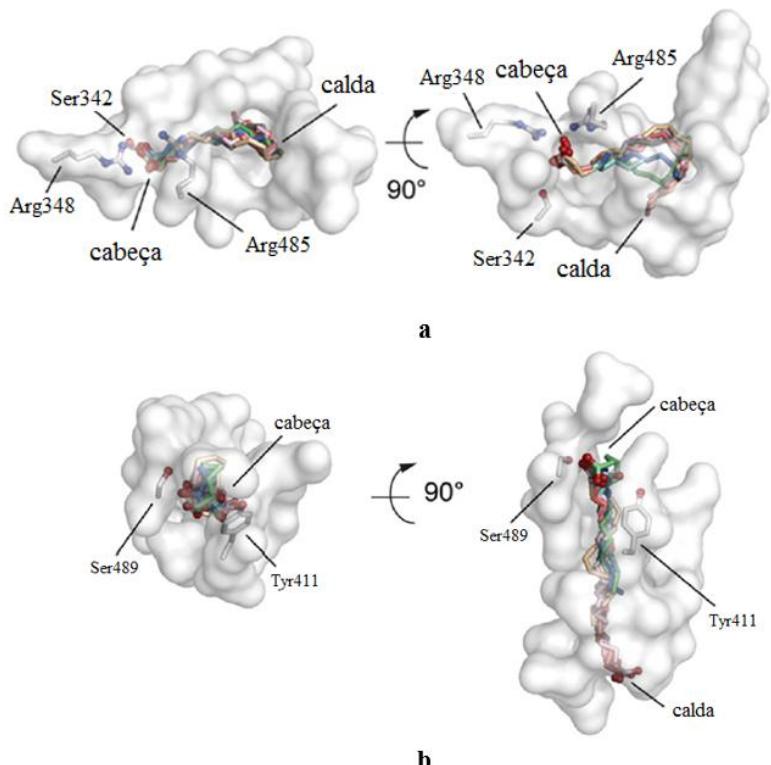


Figura 42: Representação estrutural do modo de ligação nos sítios a) FA3 e b) FA4 para múltiplos ácidos graxos complexados com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA3-4/ ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano, 2022]

1.3.3.4 O sítio de ligação de ácido graxo FA5

O sítio FA5, localizado no subdomínio IIIB, acomoda pequenos ligantes e se liga a uma única molécula de FA. O grupo carboxilato FA (cabeça) interage com Tyr401 e Lys525, enquanto a cauda de metileno entra no túnel da matriz proteica [Ghuman *et al.*, 2005; Leboffe *et al.*, 2020; Curry 2009; Bhattacharya ;2000]. As duas únicas classes de fármacos que cocristalizam com ASH neste local são os anestésicos e os AINEs (Figura 43). [Leboffe *et al.*, 2020]

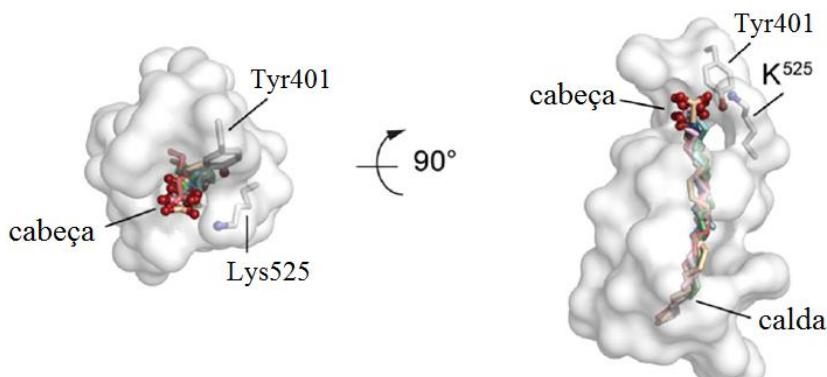


Figura 43: Representação estrutural do modo de ligação no sítio FA5 para múltiplos ácidos graxos complexados com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA5/ ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano 2022].

1.3.3.5 O sítio de ligação de ácido graxo FA6

O sítio FA6 está localizado na interface entre os subdomínios IIA e IIB [Ghuman *et al.*, 2005]. Ao contrário dos sítios FA1-FA5, a cavidade do FA6 carece de resíduos que estabilizam eletrostaticamente o carboxilato do FA, sendo a interação dominada pela porção alifática composta pelos resíduos Arg209, Lys351 e Ser480. Isso concorda com a baixa afinidade dos FAs para o sítio FA6 [Bhattacharya 2000; Ghuman *et al.*, 2005; Leboffe *et al.*, 2020]. Notavelmente, duas moléculas do ácido cáprico de cadeia curta se ligam ao FA6 em uma disposição calda-calda (Figura 44) [Bhattacharya 2000; Ghuman *et al.*, 2005; Leboffe *et al.*, 2020]. As duas únicas classes de fármacos que cocristalizam com ASH neste local são os anestésicos e os AINEs. No FA6, o anestésico hidrofóbico halotano ocupa o sítio de ligação canônico do FA, enquanto os AINEs mais polares se ligam em uma porção diferente do sítio, destacando assim a presença de um subsítio adicional [Leboffe *et al.*].

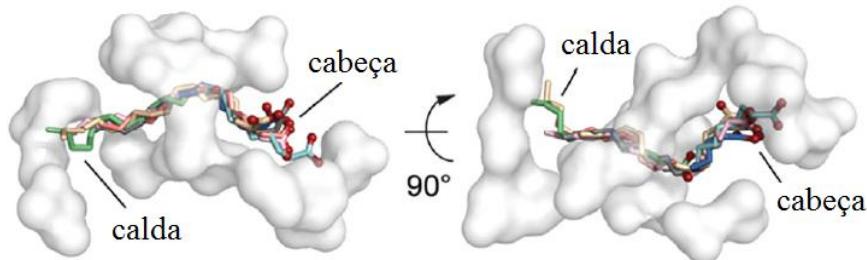


Figura 44: Representação estrutural do modo de ligação no sítio FA6 para múltiplos ácidos graxos complexados com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA6/ ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano 2022].

1.3.3.6 O sítio de ligação de ácido graxo FA7

O sítio FA7 (também chamado de sítio I de Sudlow) está localizado no subdomínio IIA. Embora mais compacta que a cavidade de ligação FA3-FA4 análoga no subdomínio IIIA [Ghuman *et al.*, 2005; Leboffe *et al.*, 2020, Curry 2009, Peters 1995], o sítio FA7 é capaz de se ligar a vários ligantes, de acordo com a noção comum de que este é o sítio de ligação primário de ASH [Fanali 2011, Zhu 2008]. [Leboffe2020] O carboxilato do FA é estabilizado por Arg257, ligando desta forma os sítios FA2 e FA7. Os FAs se ligam ao FA7 em uma conformação dobrada e isso pode estar na raiz da baixa afinidade dos FAs por essa fenda (Figura 45) [Bhattacharya 2000, Ghuman *et al.*, 2005; Leboffe *et al.*, 2020]. Na presença de miristato, foi observada a co-ligação de vários fármacos ao sítio FA7, sugerindo que o FA induz uma mudança conformacional do sítio I de Sudlow. Isso leva à formação de três subsítios não

sobrepostos que hospedam diferentes classes de fármacos (nomeadamente, anestésicos, anticoagulantes, antineoplásicos, anti-retrovirais e AINEs) [Leboffe *et al.*, 2020]

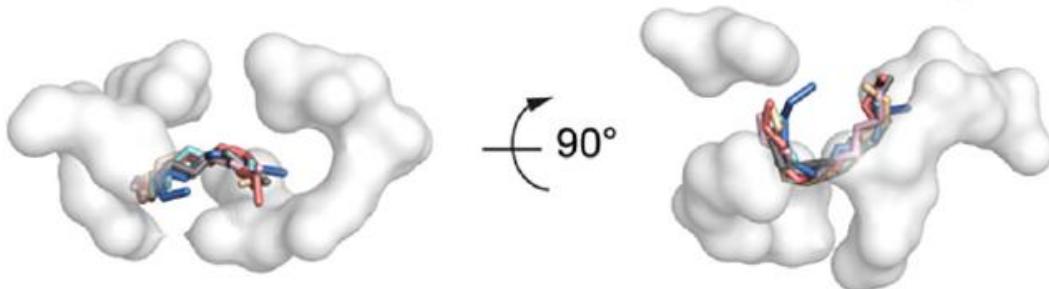


Figura 45: Representação estrutural do modo de ligação no sítio FA7 para múltiplos ácidos graxos complexados com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA7/ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano 2022].

1.3.3.7 Os sítios de ligação dos ácidos graxos FA8 e FA9

Os sítios FA8 e FA9 estão posicionados na base e no topo, respectivamente, da fenda delimitada pelos subdomínios IA-IB-IIA de um lado e pelos subdomínios IIB-III-IIIIB do outro. Os bolsos FA8 e FA9 acomodam apenas FAs de cadeia curta, como ácido cáprico. Em FA8, o carboxilato do ácido cáprico se liga a Lys195, Lys199, Arg218 e Ser454, colocados em um lado da cavidade, enquanto a cauda de metileno do FA ligada a FA6 contribui para a formação da extremidade hidrofóbica da cavidade FA8 [Ghuman *et al.*, 2005; Bhattacharya 2000, Petipas 2003]. Uma ponte salina conectando Glu187, localizado no domínio I, e o resíduo Lys432, colocado no domínio III, contribui para estabilizar o FA dentro do sítio FA9 (Figura 46) sendo que apenas os anestésicos foram relatados como ligando-se na fenda interdomínio I-III [Bhattacharya 2000].

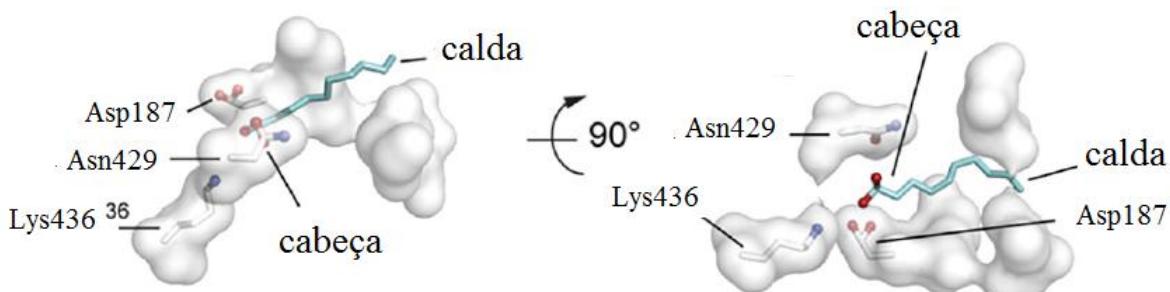


Figura 46: Representação estrutural do modo de ligação no sítio FA9 para o ácido cáprico complexado com ASH. A representação da superfície molecular de cada sítio de ligação de FA9/ASH é mostrada em duas orientações (rotação de 90°) [Linciano 2022]

1.3.4 Os Sítios de ligação primários para compostos endógenos e exógenos

Em contraste aos ácidos graxos, muitos fármacos se ligam preferencialmente a um conjunto de sítios de ligação formado por diferentes regiões de ligação primárias 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 ligação primária está presente no subdomínio IB, denominado de sítio SIII (Figura 21), o qual foi posteriormente identificado como o principal local de ligação de um fotoisômero de bilirrubina, [Zunszain, 2008] da hemina, [Zunszain, 2003; Wardell, 2002], de uma sulfonamida [Buttar 2010] e do antibiótico esteroidal ácido fusídico. [Zunszain, 2008; Zsila, 2013]

Carter e colaboradores afirmaram que o subdomínio IB (Sítio III) é a terceira maior região de ligação a fármacos da ASH, cuja importância não foi reconhecida anteriormente por Sudlow (Figura 47). [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, consequentemente, pode levar a mudanças do modo de interação da ASH, impactando fortemente seu perfil farmacocinético. [Kratochwil, 2002; Curry, 2009; Carter, 1994; Zsila, 2013]

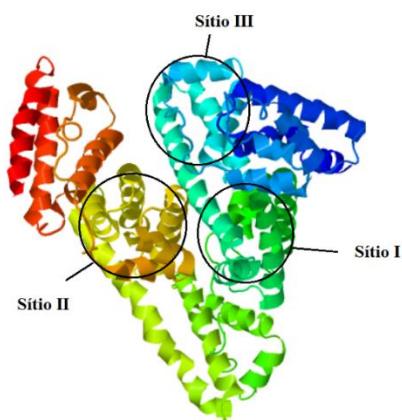


Figura 47: Estrutura cristalina de ASH indicando as regiões de ligação primária de fármacos endógenos exógenos: sítio SI, sítio SII e sítio SIII [PDB ID, 1AO6] A estrutura foi preparada usando o programa JSmol.

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 *et al.*, 2020] Os sítios SI e SII de Sudlow também são

conhecidos como sítio da varfarina e do ibuprofeno, os quais foram descritos como compostos modelo que interagem nas regiões de ligação com os resíduos (Tyr150, Lys195, Lys199, Arg222, Leu238, Arg257 e Ala291) e (Leu 37, Arg410, Tyr 411, Lys414, Val433, Leu453 e Ser489) (Figuras 48a e 48b respectivamente), enquanto que o sítio SIII é conhecido como sítio do ácido salicílico, o qual interage com os resíduos dos α -aminoácidos Arg186, Lys190, Gly189, Phe149, His146 e Tyr161 (Figura 48c). [Rabbani, 2019; Leboffe *et al.*, 2020]

Deve-se notar também que a existência de mais de dois sítios de ligação de fármacos na ASH foi considerada por Kragh-Hansen na década de 1980, sugerindo quatro sítios de ligação primária separados para varfarina, digitoxina, diazepam e vermelho de fenol [Kragh-Hansen 1981; Kragh-Hansen 1985; Zsila 2013].

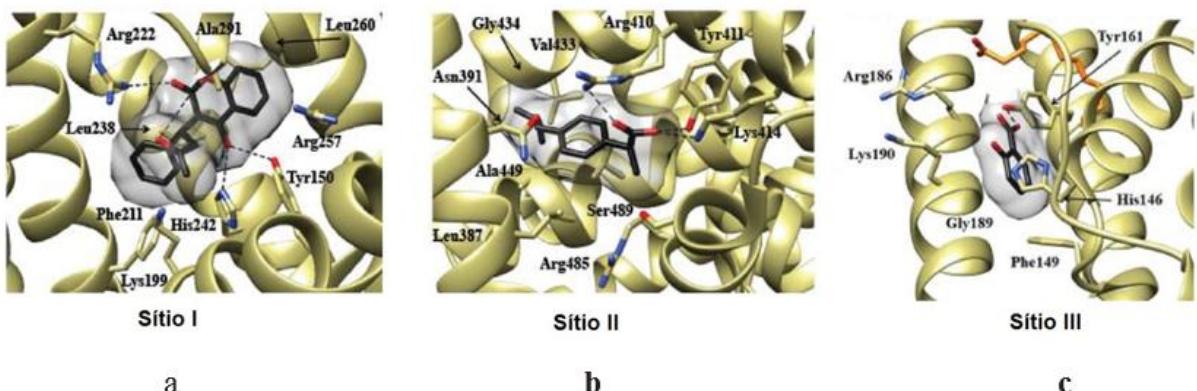


Figura 48: Representação da complexação nos sítios primários de ligação de fármacos endógenos e exógenos com ASH a) sítio I ou sítio da varfarina, b) sítio II ou sítio do ibuprofeno e c) sítio III ou sítio do ácido salicílico [Leboffe *et al.*, 2020].

Muitos trabalhos na literatura empregaram amplamente métodos de ligação competitiva para investigar a seletividade dos sítios de ligação primário (SI, SII e SIII) com diferentes compostos bioativos, tendo sido apontado o papel importante das moléculas de água presas dentro dos sítios de ligação no reconhecimento molecular e na ligação 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 ligação. Após a deformação do estado inicial da ASH, mais moléculas de água ficam presas dentro dos sítios de ligação, o que causa algum inchaço impedindo a recuperação total do seu estado nativo. [Varshney, 2010; Abou-Zied, 2015]

Além dos estudos de competições de ligação, as alterações induzidas nos espectros de dicroísmo circular (DC) para o complexo biliverdina-ASH e hemina-ASH indicam interações de ligação allostérica entre o sítio SIII (IB) e os sítios SI e SII de Sudlow. Esses achados complementam o antigo quadro focado principalmente na ligação allostérica entre os subdomínios IIA e IIIA e chamam a atenção para a complexa rede allostérica interdomínios de

ASH, na qual as regiões de ligação 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 ligação. [Ghuman *et al.*, 2005; Buttar, 2010; Yang, 2007; Petitpas, 2001; Ryan, 2011; Zsila, 2013]

1.3.4.1 O sítio ligação I de Sudlow (subdomínio IIA)

O sítio SI de Sudlow é uma bolsa de ligação relativamente grande caracterizado como uma região conformacionalmente adaptável e pode ser separada em três subsítios não sobrepostos. De modo geral podemos classificar em um subsíti de indometacina (IMN) [Ghuman *et al.*, 2005], um subsíti salicílico (SAL) localizado na parte interna do sítio SI [Yang, 2007], e um subsíti 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT) localizado próximo à abertura do sítio SI [Zhu 2008] [Rabanni e Ahn, 2019]. Este sítio liga-se com grande afinidade preferencialmente a compostos heterocíclicos relativamente volumosos com uma carga negativa normalmente deslocalizada, sendo o ligante protótipo para este sítio a droga anticoagulante varfarina (Figura 48a, estou falando da de cima). [Leboffe *et al.*, 2020]. Além daqueles que nomeiam os subsítios, é possível encontrar na literatura muitos compostos que se ligam ao sítio SI de SudLow, tais como ácido mirístico e ácido tri-iodobenzóico (PBD 1BKE) [Curry, Mandelkow, Brick e Franks, 1998], Azapropazona (PDB 2BX8) [Ghuman *et al.*, 2005] e o diclofenaco (PDB 4Z69) [Zhang *et al.*, 2015].

Vários resíduos carregados de ASH, incluindo Lys195, Arg218, Arg222 e Glu292, estão localizados na abertura do sítio I de Sudlow. [Ghuman *et al.*, 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 a entrada do sítio SI de Sudlow, com a Lys195 e a His242 (Figura 49). A Lys199 projeta-se para o centro do sítio de ligação, e desempenha um papel fundamental na ligação de fármacos ao subdomínio IIA de ASH (sítio SI de Sudlow), e muitas vezes forma ligação de hidrogênio ou pontes salinas quando os fármacos são ligados. [Bertucci, 1998; Ghuman *et al.*, 2005; Díaz 2001; Li, 2014; Gou, 2014; Petitpas, 2003; Gou, 2016] O sítio de ligação tem uma

capacidade de ionização que é importante considerar quando se utilizam fármacos que se ligam ao sítio SI de Sudlow. [Abou-Zied, 2015; Gou, 2016]

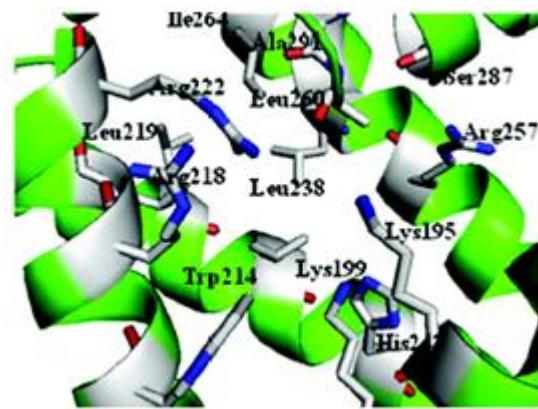


Figura 49: Representação da estrutura cristalina do ambiente próximo a Lys199 para a estrutura nativa da ASH. [Gou, 2016]

O interior da cavidade do sítio SI de Sudlow é predominantemente apolar e contém um aglomerado de resíduos de α -aminoácidos hidrofóbicos (Phe211, Leu198, Trp214, Leu219, Leu238) [Ghuman *et al.*, 2005; Rabbani, 2019], enquanto em direção ao fundo do sítio são encontrados os resíduos de α -aminoácidos polares Tyr150, His242 e Arg257. [Artali, 2005; Abou-Zied, 2015] Na presença de miristato, foi observada a co-ligação de vários fármacos ao sítio SI de Sudlow (Tabela 5), sugerindo que a presença de ácido graxo induz mudanças conformacionais no sítio SI de Sudlow. [Zhu, 2008; Leboffe *et al.*, 2020]

1.3.4.2 O sítio ligação II de Sudlow (subdomínio IIIA)

O sítio de ligação SII de Sudlow tem uma cavidade de ligação menor que sítio SI de Sudlow e também possui caráter hidrofóbico, podendo assim se associar a compostos de mesma característica. [Rabbani, 2019] O sítio de ligação SII de Sudlow é considerado o principal para um grande número de fármacos, tais como o Halotano (PDB 1E7B) [Bhattacharya, Curry e Franks, 2000], Diazepam(PDB 2BXF) [Ghuman *et al.*, 2005] e o Cetoprofeno (PDB 7JWN) [Czub, Stewart, Shabalin e Minor, 2022]. Fármacos que normalmente contém uma carga negativa localizada são preferenciais, tal como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), anestésicos e ansiolíticos, sendo o ibuprofeno o protótipo do ligante para o sítio II de Sudlow (Figura 48b). [Leboffe *et al.*, 2020] A ligação 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 ligação e também fornecem ligações de hidrogênio ou pontes salinas para a ligação com moléculas de fármacos que, juntamente com os resíduos de α -aminoácidos Phe488 e Ser489, compõem a entrada do sítio SII. [Ghuman et al., 2005; Wang, 2015] O interior do sítio SII de Sudlow para a complexação com ibuprofeno é formado por um conjunto de α -aminoácidos predominantemente hidrofóbicos: Leu387, Ile388, Leu430 e Val433. [Ghuman et al.; Leboffe et al., 2020]

1.3.4.3 Sítio de ligação III, de fármacos

Na literatura há uma quantidade bastante representativa de compostos bioativos que se ligam ao sítio de ligação SIII e podemos citar como exemplo o AZAPROPAZONA (PDB 2BX8) [Ghuman et al., 2005], NAPROXENO (PDB 2VDB) [Lejon, Cramer e Nordberg, 2008] e o Ketoprofeno (PDB 7JWN) [Czub, Stewart, Shabalin e Minor, 2022] (Tabela 7). O sítio de ligação SIII pode ser descrito como uma cavidade no subdomínio IB sendo os compostos hemina, bilirrubina e miristato representando os ligantes prototípicos. [Leboffe et al., 2020]. A ligação simultânea de uma molécula de ácido graxo (FA) e uma molécula de fármaco (como no caso de azapropazona, naproxeno e ácido salicílico) ao sítio SIII bem como o fato de que diferentes classes de fármacos (antibióticos, antineoplásicos, anti-retrovirais e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)) se ligam de formas diferentes no Sítio III, é consistente com a presença de subsítio adicional [Ghuman et al., 2005; Petitpas, 2001; Ryan, 2011; Bhattacharya ,2000; Ryan 2011b; Lejon ,2008; Zhu 2008; Curry 1998; Zsila; 2013; Kaneko, 2011; Leboffe et al., 2020]

Conforme mostrado na Figura x, dois subsítios principais estão localizados na cavidade. Em particular os compostos volumosos, como no caso do ácido fusídico [PDB ID], se ligam ao sítio SIII nas proximidades da Tyr161 e interagem com os resíduos Leu115, Val116, Tyr138, Phe157 e Phe165, envolvidos no reconhecimento do composto heme e de FAs, enquanto compostos menores, como o AZT, são encontrados ligados perto do resíduo His146 interagindo com Arg114, Arg 186 e Lys190 A [Leboffe et al., 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 Mais 2015; Leboffe et al., 2020]

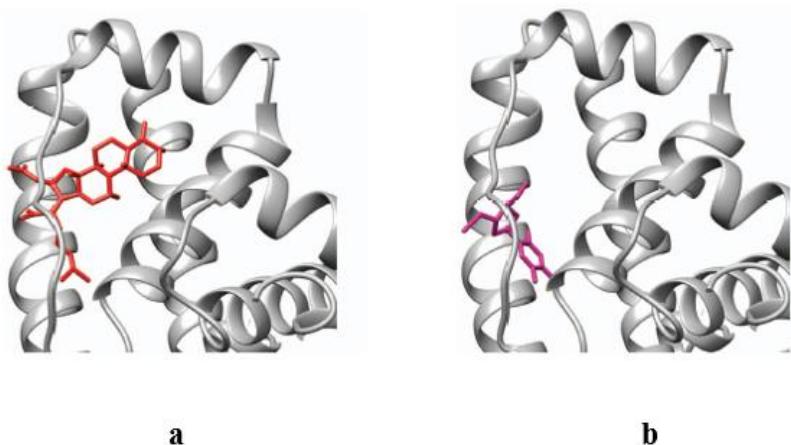


Figura 50: Representação estrutural para complexação no sítio SIII de ASH com: a) ácido fusídico e b) AZT [Leboffe *et al.*, 2020].

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, doxorrubicina, daunorrubicina, teniposido, suramina, inibidores de tirosina quinase, anticoagulantes (dicumarol), vários esteróides (ácidos biliares e carbenoxolona), ANIEs, substâncias naturais (ácido aristolóquico, ácido glicirretínico) e corantes sintéticos (laranja de metila e azocarmim B). [Zsila, 2013]

1.3.4.4 Mecanismos de competição sítio I e sítio II

Em concentrações relativas mais altas, os ânions de ácidos graxos de cadeia média frequentemente deslocam os ligantes do sítio SII de Sudlow por competição, enquanto o efeito de deslocamento dos ligantes no sítio SI de Sudlow é provavelmente muito pequeno. O efeito de melhoria dos ânions de ácidos graxos de cadeia longa na ligação de certos ligantes do sítio SI de Sudlow foi originalmente explicado pela indução de mudanças conformacionais na molécula de albumina tornando o sítio SI mais adequado para a ligação do ligante. Por exemplo, o 2,3,5-triiodobenzoato (TIB) se liga nos sítios SI e SII na ausência de ácido mirístico, [Carter 1992] mas, na presença dele, TIB se desloca do sítio SII e se religa em um novo sítio de ligação induzido pelo miristato no subdomínio IB. [Curry, 1998; Varshney, 2010].

1.3.5 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 reagir com 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 51). 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 Cys34 é uma característica única de uma proteína extracelular e é responsável por aproximadamente 90% da concentração de tiol no plasma sanguíneo. [Kratz, 2014]

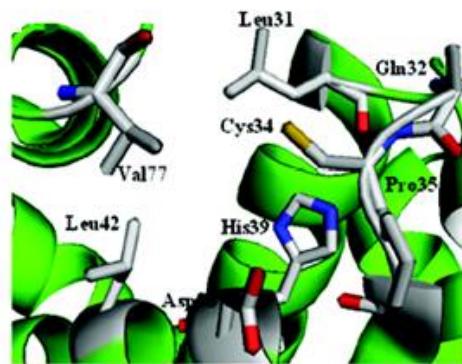


Figura 51: Representação da estrutura cristalina do ambiente que próximo a Cys34 para a estrutura nativa da ASH [PDB ID 1AO6] [Gou 2016].

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 um $pK_a \sim 5$ [Peters, 1995], e previne a formação de dimerização de ASH por ligação 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]

1.3.6 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 ligação do fármaco aos sítios SI e sítio 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] Yang e colaboradores resolveram a estrutura do complexo ASH/aspirina e forneceram evidências sólidas para o mecanismo estrutural da atividade da Lys199. [Yang, 2007; Wang, 2014] Mais recentemente, De Simone e colaboradores, mostraram atividade pseudoenzimática da ASH por intermédio da Lys199, com a liberação concomitante de salicilato e a modificação da estrutura secundária da ASH (Figura 52) [Liyasova, Schopfer e Lockridge, 2010; De Simone, di Masi e Ascenzi, 2021].

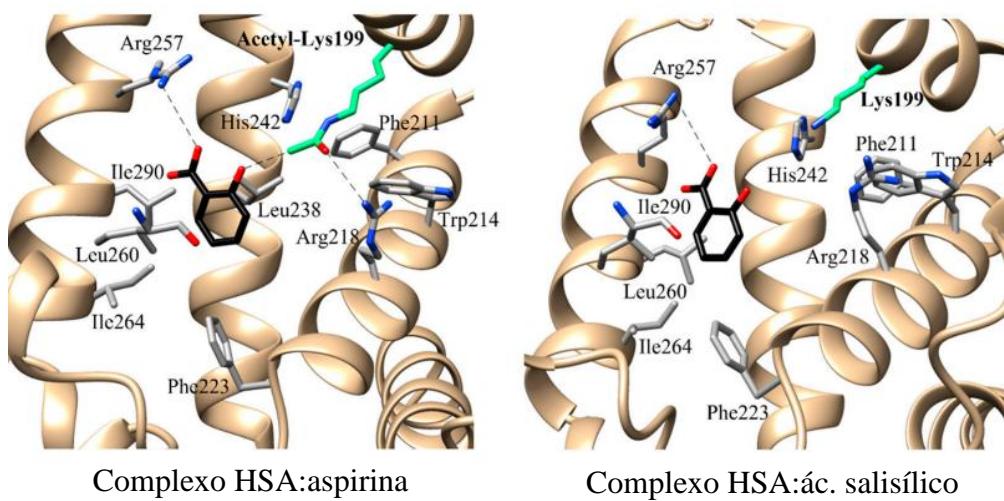


Figura 52: Ambiente estrutural do complexo ASH:aspirina (PDB ID: 2I2Z) [Yang *et al.*, 2007] e do aduto ASH:ácido salicílico (PDB ID: 2I30) [Yang *et al.*, 2007]. Os resíduos de acetil-Lys199 e Lys199 são mostrados em verde. As ligações de hidrogênio são mostradas em linhas tracejadas azuis. O ácido salicílico é representado em bastões (preto), adaptado de De Simone, di Masi e Ascenzi, 2021.

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 ligações 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]

1.3.7 Módulo de ligação à ASH semelhante à proteína G

A ASH também apresenta sítios de ligação que permitem a sua interação com outras proteínas e, como exemplo, podemos citar a ligação ASH-Módulo GA. O módulo GA (módulo de ligação à 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 se liga 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 53). [Cramer, 2007; Lejon, 2004; Varshney, 2010]

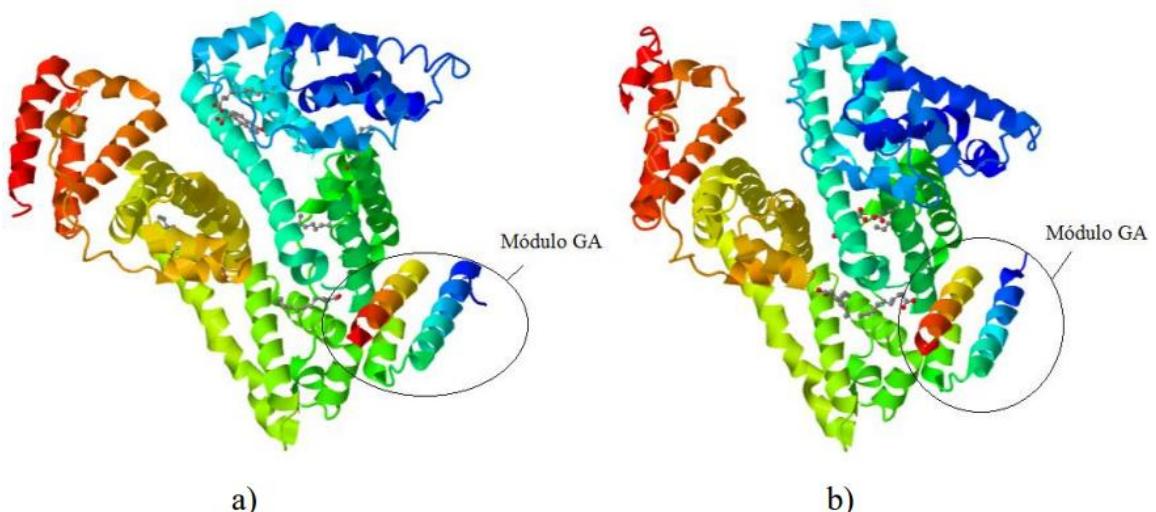


Figura 53: Representação da estrutura cristalina da ASH complexada com: a) módulo GA [PDB-ID, 1TF0] e b) s-naproxeno e o módulo GA [PDB-ID, 2VDB]. As estruturas foram preparadas usando o programa JSmol.

1.3.8 Ligação de metais com ASH

Embora a maioria dos ligantes para a albumina sejam hidrofóbicos ou aniónicos, metais pesados também são conhecidos por se ligarem à proteína [Dockal Carter e Ruker, 2000; Simard, *et al.*, 2005]. Sabe-se que muito poucos fármacos catiônicos também se ligam à ASH [Varshney *et al.*, 2010]. De forma geral é aceito que a porção N terminal de ASH (N-Asp-Ala-His-Lys-) possui alta afinidade para Cu(II), Ni(II), Hg(II), Au(I) e Ag(II), ligando de forma específica e com afinidades mais fracas para Ca(II) e Zn(II) que se ligam de maneira relativamente não específica; a ASH atua como veículo de transporte desses íons metálicos no sangue (Figura 54) [Kratz, 2014]. O resíduo Cys34 também desempenha papel fundamental, como dito antes, na ligação de metais como Pt(II), Pb(II) e Au(III) [Kratz, 2014]. O Cu(II) e o Ni(II) merecem consideração especial entre os metais porque a maioria das albuminas de

mamíferos os liga de forma mais forte e específica do que outros cátions. ASH também foi relatada possuir uma capacidade relativamente fraca e inespecífica de ligação ao ferro. [Loban 1997] No entanto, é improvável que isso seja significativo em circunstâncias normais no plasma, porque o ferro se liga quase que exclusivamente à transferrina, uma proteína de ligação específica de ferro. [Varshney *et al.*, 2010; Kratz, 2014]

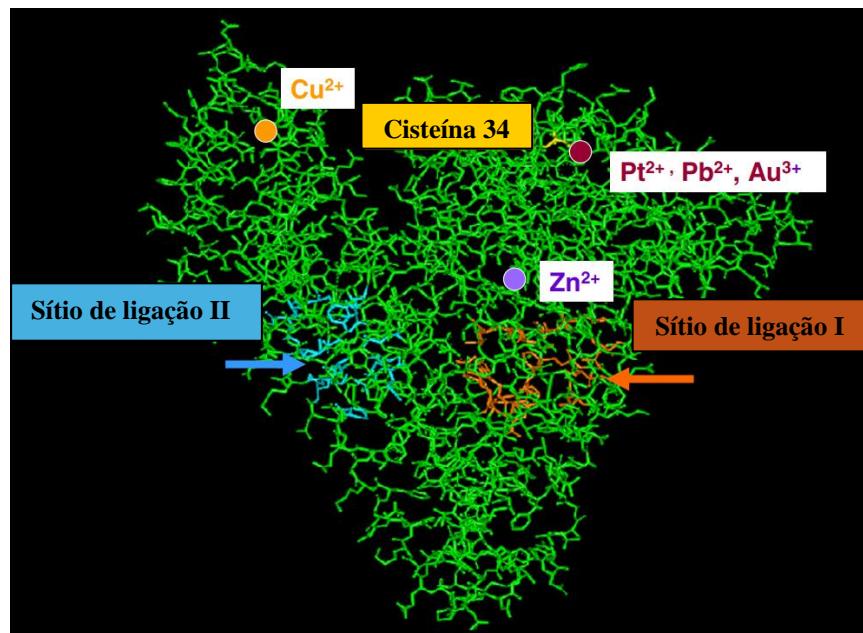


Figura 54: Representação da estrutura cristalina de ASH indicando as regiões de complexação com metais Cu^{2+} , Pt^{2+} , Pb^{2+} , Au^{3+} , e Zn^{2+} bem como sítio de ligação SI e SII em marrom e azul, respectivamente, além da cisteína 34, isolada, em amarelo. Adaptado de Kratz [Kratz 2014].

1.3.9 A reação de glicação da ASH

Muitas proteínas são modificadas por carboidratos. Tal reação é denominada glicação. No sistema circulatório, a glicose ou derivados reagem não enzimaticamente com uma ampla variedade de proteínas para formar adutos estáveis. A glicação geralmente ocorre em grupos presentes na superfície da proteína, tipicamente entre resíduos de lisina, arginina e cisteína com a glicose, levando à formação reversível de uma base de Schiff, que pode se rearranjar quimicamente em produtos mais complexos (produtos de Amadori) e, eventualmente, resultar na formação extrema de produtos de glicação avançada. [Wang 2015; Rabanni e Ahn, 2019] Comparado com a maioria das proteínas, a ASH é um alvo altamente sensível para glicação devido ao seu longo tempo de meia-vida (cerca de 18 dias) e alta concentração [Peters, 1996; Schalkwijk *et al.*, 2002]. Conforme identificado anteriormente, os resíduos de lisina (Lys199, 281, 439 e 525) são modificados por glicação não enzimática [Lu, *et al.*, 1998; Kusugi *et al.*, 2007]. Muitos pesquisadores relataram que Lys525 é o sítio de glicosilação não enzimática

predominante, responsável por 30% da glicação total *in vivo* [Lu, et al., 1998; Kusugi et al., 2007]. Outro importante sítio para a glicação é a Lys199, mas com menor participação, representando apenas 5% da glicação total [Bunn e Higgins, 1981]. Outros resíduos de lisina mas com menor propensão à glicação são: Lys 12, 51, 233, 276, 317, 323, 378 e 545 (Figura 55) [Rabanni e Ahn, 2019].

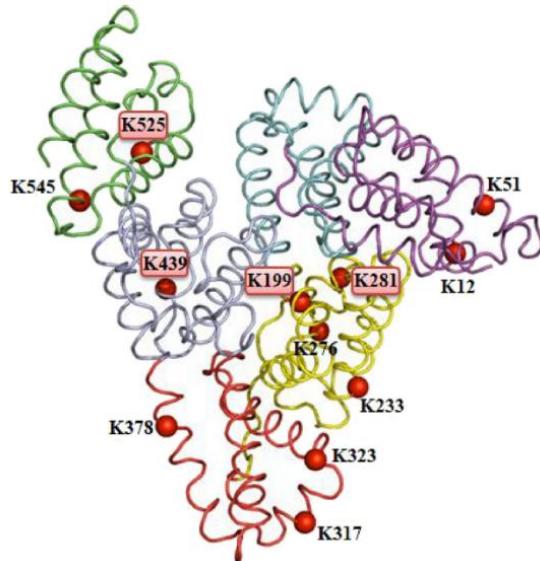


Figura 55: Os locais de glicação da ASH para resíduos de lisina são mostrados pela esfera de cor vermelha. O o sítio de glicação não enzimática predominante é Lys525 e os locais de glicação predominantes são Lys 199, 281, 439 de ASH mostrados pela caixa destacada em rosa. Os outros resíduos de Lys propensos à glicação são Lys 12, 51, 233, 276, 317, 323, 378 e 545. Esta imagem foi gerada a partir de PDB id: 1AO6 usando o pacote PyMOL [Rabanni e Ahn, 2019].

A glicação envolve a abertura do anel de glicose, que reage com grupos amino primários da proteína [Robb 1989]. Através dos estudos estruturais, o mecanismo molecular de glicação de Lys195 no sítio SI de Sudlow da ASH é proposto da seguinte forma: um resíduo vizinho, Lys199, está localizado em um ambiente hidrofóbico, o que reduz seu pK_a e o torna um forte doador de prótons. Quando a glicose entra no sítio SI de Sudlow, se localiza próximo ao resíduo Lys199. Após a abertura do anel da glicose, o carbonol C1 da glicose se afasta de Lys199 e é capturado pelo resíduo Lys195. O grupo amino de Lys195 reage com o C aldeídico (C1) da forma aberta de glicose em uma reação de adição nucleofílica, formando uma ligação covalente entre eles [Wang 2013; Rabanni e Ahn, 2019].

1.3.10 Albumina como carreador de fármacos

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 ligação à 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 liga-se principalmente a fármacos hidrofóbicos; no entanto, a seletividade dos sítios de ligação é determinada principalmente pelos resíduos de albumina carregados ou polares que estão presentes na vizinhança das cavidades hidrofóbicas. [Abou-Zied, 2015] Ligações fortes podem diminuir a concentração de fármacos livres no plasma, enquanto uma ligação fraca pode levar a um tempo de vida curto. A ligação ao ASH tem um grande impacto na transferência de fármacos para os tecidos. [Pirnau, 2008; Abou-Zied, 2015]

Dois comportamentos de ligação foram descritos, denominados como ligação restritiva e permissiva. Na ligação restritiva, apenas a fração do fármaco que está livre no líquido extracelular está disponível para ser transferida para os tecidos. Isso corresponde a compostos de forte ligação com cinética de dissociação lenta. A ligação permissiva é caracterizada por uma ligação que não restringe a quantidade de fármaco que é inserida nos 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 ligação 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 de interesse farmacológico. [Kratz, 2014]

Para o tratamento de câncer, além da capacidade de atuar como um carreador, também tem 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, pela 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 α -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 ser ligados fisicamente através de um ligante ou grupo de ligação de proteína a ASH; **b)** fármacos, pró-fármacos ou polipeptídeos que podem ser ligados covalentemente através de um ligante ou grupo de ligação 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 se ligam fisicamente ou são fundidos com albumina substituindo o fragmento Fc da imunoglobulina G (Figura 56). [Kratz, 2012]

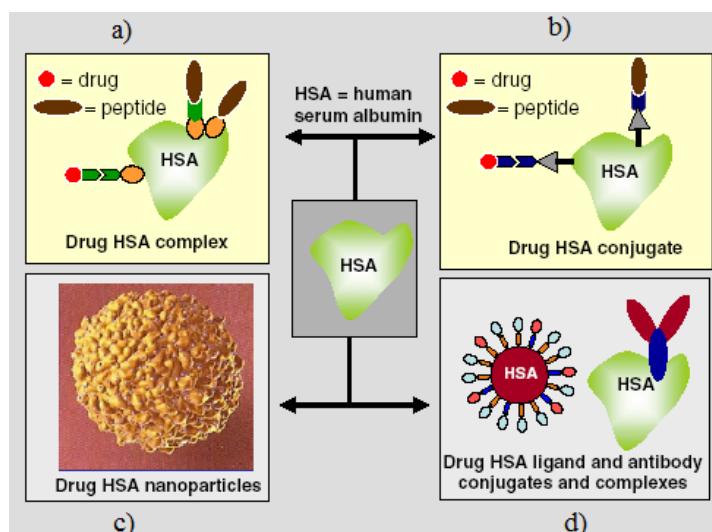


Figura 56: Representação esquemática dos processos mecanísticos empregando ASH como carreador de compostos bioativos [Kratz 2012].

1.3.10.1 Conjugados ASH-Fármaco Derivados de Interações Não Covalentes

Devido à promissora ligação de ligantes hidrofóbicos à ASH, a estratégia para aumentar a afinidade de ligação de uma molécula do fármaco com ASH pela introdução de uma parte hidrofóbica adicional à estrutura da molécula do fármaco tornou-se um método de grande sucesso no projeto de pró-fármacos [Liu, Mu e Xing, 2015]. A empresa farmacêutica dinamarquesa *Novo Nordisk* foi a primeira a explorar a longa meia-vida da ASH de aproximadamente 19 dias para melhorar o perfil farmacocinético e a adesão da insulina para o

tratamento do diabetes. O princípio consiste em anexar um ácido graxo à insulina (ligação do ácido mirístico ao aminoácido lisina na posição B29), que posteriormente se liga aos sítios de ligação de ácidos graxos presentes na ASH [Kratz 2014]. O Levemir® (insulina detemir) foi aprovado em 2004 para o tratamento de diabetes mellitus 1 e 2 e é administrado por via subcutânea como uma solução solúvel em água com um perfil farmacocinético previsível e prolongado com duração de ação de aproximadamente 26 h [Kratz 2014]. Estratégia semelhante foi aplicada a uma série de moléculas de Pt(IV) modificadas com a cadeia de ácidos graxos na posição axial [Zheng, et al., 2014], e uma série de derivados de Ru(III) à base de piridina foram preparados para aplicações antitumorais. [Webb, et al., 2013; Lipponer, Vogel e Keppler, 1996; Liu, Mu e Xing, 2015]

Em alguns casos, a ligação de ASH, se muito forte, também poderia impedir o reconhecimento de moléculas de fármacos das enzimas ou proteínas alvo e, portanto, comprometeu muito a eficácia do tratamento. [Yang, Ma e Zhang, 2006; Yang et al., 2013; Digilio *et al.*, 2014]. Nesse sentido foi proposta uma estratégia baseada na diminuição da força de ligação da albumina ligante que poderia impedir o reconhecimento de moléculas de fármacos aos sítios alvo. [Yang, Ma e Zhang, 2006; Yang et al., 2013; Digilio *et al.*, 2014; Liu 2015] Por exemplo, Mao et al. sintetizaram muitos análogos de diflunisal de modo a diminuir sua força de ligação com a ASH de tal forma que estes poderiam ser deslocados do sítio de ligação pela substituição por ácidos graxos [Gou 2016].

1.3.10.2 Conjugados de fármacos proteicos à base de ASH derivados de ligação covalente

A ASH representa numerosos grupos funcionais acessíveis devido à presença de abundantes resíduos de aminoácidos altamente reativos, incluindo ácido aspártico (36), ácido glutâmico (61), lisina (59) e cisteína (35), etc [Sleep, 2014]. Portanto, vários tipos de complexos ASH-fármaco podem ser facilmente alcançados por reações de acoplamento bem estabelecidas entre as moléculas do fármaco e esses grupos funcionais reativos que estão presentes na estrutura da proteína ASH. [Liu, Mu e Xing, 2015]

I) Cisteína em ASH para Ligação Covalente com Moléculas de Fármacos

No final da década de 1990, Kratz e colaboradores foi o primeiro a desenvolver um novo conceito de pró-fármaco, através da reação específica entre moléculas de fármacos conjugados a um grupo de ligação que reage seletivamente com o grupo tiol na cisteína (Cys34) da ASH

(Figura 57). Assim, o grupo maleimida tem sido frequentemente selecionado como o grupo de ligação ao tiol devido à sua reação seletiva e quantitativa com a Cys34 que ocorre dentro de 3 min de incubação em plasma sanguíneo humano a 37°C. [Caiolfa et al., 2000; Gou et al., 2016]. Um conjugado de doxorrubicina-ASH foi desenvolvido pela conjugação de maleimida contendo doxorrubicina (pró-fármaco DOXOEMCH renomeado aldoxorrubicina) que se liga a Cys-34 em ASH nativa após administração intravenosa [Kratz et al., 2000; Kratz et al., 2007]. A pró-fármaco aldoxorrubicina contém um ligante hidrazone sensível ao ambiente ácido, que permitia a liberação de doxorrubicina em organelas ácidas intracelulares (por exemplo, endossoma tardio, lisossomo etc.) [Liu, Mu e Xing, 2015]

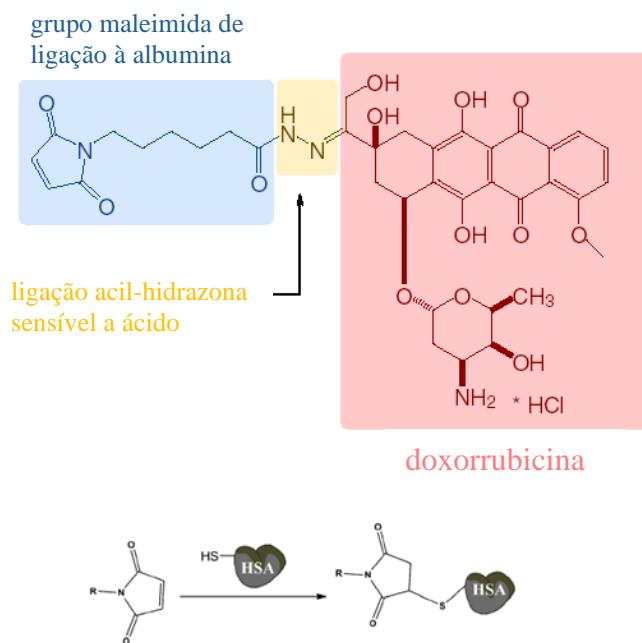


Figura 57: Mecanismo proposto para o processo de acoplamento de doxirrubicina com meleimida na Cys34 da ASH, adaptado de Liu e colaboradores [Liu, Mu e Xing, 2015]

Projeto semelhante também foi aplicado em fármacos à base complexos metálicos de Pt(IV) [Hettick, 2011] e Ru(II)-areno [Hanif, 2012] bem como outras fármacos orgânicos anticancerígenos, como metotrexato [Warnecke et al., 2007; Fiehn et al., 2008], clorambucil [Kratz et al., 1998], paclitaxel [Elsadek et al., 2010] e antibiótico derivado de Streptomyces zelensis CC-1065 [Wang et al., 2008] [Gou 2016]. Essa metodologia foi expandida sendo aplicada tambem a estruturas polipeptídicas [Liu, Mu e Xing, 2015; Kratz 2014].

II) Pró-fármacos baseados em resíduos de lisina

A obtenção de pro-fármacos através da ligação covalente com resíduos de lisina tem como uma das estratégias a formação de um grupo hidrazone. Essa metodologia emprega o uso de

fármacos contendo um grupo aldeído livre, que se conjuga aos resíduos de lisina de ASH modificados com grupos hidrazina, formando assim grupos hidrazone. Posteriormente as ligações hidrazone podem ser clivadas em condições ácidas, e isso fornece um meio para a liberação direcionada do fármaco no ambiente ácido dos lisossomos dentro da célula tumoral. Como exemplo podemos citar os estudos utilizando Ru(II)-areno 1,3,5-triaza-7-fosfadamantano ou complexos RAPTA, (do inglês ruthenium-arene, PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfaticiclooctano) (Figura 58) [Ang et al., 2007]. Usando a mesma estratégia de pró-fármaco, uma série de novos complexos de rutênio-areno da fórmula geral $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-areno})(\text{L})]\text{Cl}$ também foram ligados à ASH [Stepanenko et al., 2011; Gou 2016]

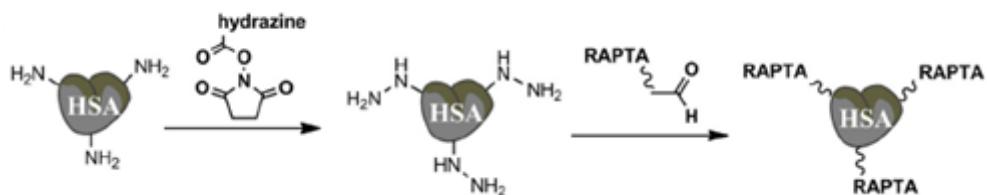


Figura 58: Mecanismo proposto para o processo de acoplamento através da estratégia de formação de um grupo hidrazone junto as lisinas (Lys) da ASH [Gou 2016].

Dentro da mesma lógica de ligação covalente foi usando o método do éster de *N*-hidroxisuccinimida (NHS), que possibilita o acoplamento direto do fármaco aos resíduos de lisina da ASH. Como exemplo podemos citar a reação de acoplamento do composto MTX-ASH que foi o primeiro conjugado fármaco-albumina utilizado em estudos clínicos [Bures, Bostík, Motycka, Spundová e Rehák, 1988]. Essa mesma técnica foi utilizada para o acoplamento paclitaxel-ASH apresentando boa atividade biológica [Dosio et al., 1997].

Liu e cols. (2010) produziram um novo conceito em design de pró-fármacos, ou seja, fármacos com potenciais grupos de saída (ligantes doadores Cl/S) onde o pró-fármaco é substituído principalmente por ligantes doadores N/O presentes na albumina [Liu et al., 2010]. Como exemplo podemos citar os estudos de Yang e col. que investigaram o mecanismo de ligação de complexado de $[\text{RuCl}_5(\text{Indazol})]^{2-}$ com ASH [Yang et al., 2013]. Demais estudos revelaram que $[\text{RuCl}_5(\text{Indazol})]^{2-}$ liga-se aos subdomínios IB e IIA (Figura 59). No subdomínio IIA, os resíduos His242 e Lys199 de ASH deslocam os grupos de saída (ligante Cl^-) de $[\text{RuCl}_5(\text{Indazol})]^{2-}$, coordenando assim com Ru. No subdomínio IB, é o resíduo de His146 que substitui um ligante Cl^- de $[\text{RuCl}_5(\text{Indazol})]^{2-}$ e coordena com Ru para formar um complexo estável. Os resultados sugeriram que podemos projetar pró-fármacos anticancerígenos contendo metal que se ligam aos subdomínios da ASH IB e IIA. [Zhang et al., 2014] [Gou 2016]

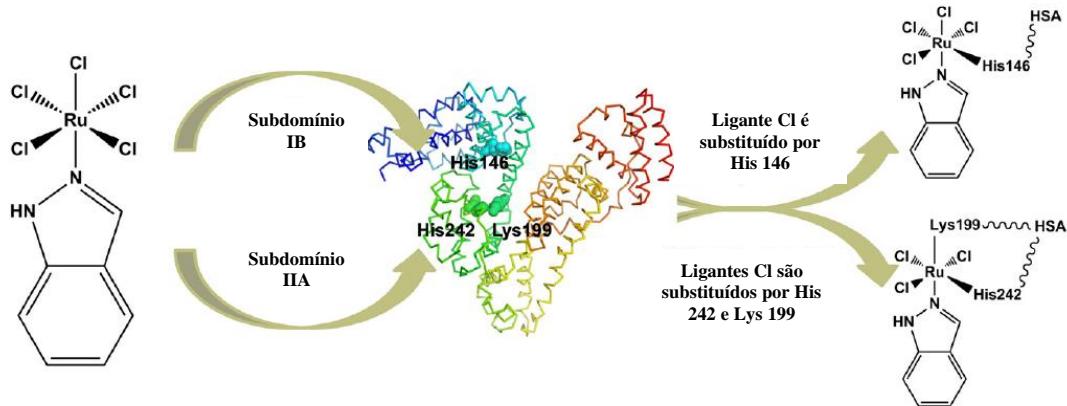


Figura 59: Mecanismo proposto para o processo de produção de pró-fármacos, ou seja, fármacos com potenciais grupos de saída (ligantes doadores Cl/S) onde o pró-fármaco é substituído principalmente por ligantes doadores N/O presentes na albumina. Adaptado de Gou et al., 2016.

1.4 A espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência e sua aplicação em experimentos de supressão

1.4.1 Estudos de fluorescência de proteínas

Nas aplicações bioquímicas de fluorescência sempre se utiliza a fluorescência intrínseca. Em proteínas, os três aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano são os responsáveis pelo processo de emissão e, dentre esses, o triptofano é o fluoróforo com o maior rendimento quântico de fluorescência. As proteínas possuem normalmente um número reduzido de Trp em sua estrutura, o que facilita a interpretações dos dados espectrais. [Lakowicz, 2006]

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

O triptofano pode ser suprimido por adição de supressor externo ou por grupos próximos dentro da proteína. Um fator que dificulta a interpretação de fluorescência de proteínas é a presença de aminoácidos de fluorescência múltipla, na maioria das proteínas. O ambiente de cada resíduo é distinto e as propriedades espectrais de cada resíduo são geralmente diferentes. Entretanto, o espectro de absorção e emissão de resíduos de triptofano em proteínas recobre a maioria dos comprimentos de onda úteis e é difícil separar contribuições de cada triptofano em uma proteína multi-Trp. Mesmo as proteínas com um único triptofano 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 da desativação multi-exponencial de Trp em água está agora largamente entendida como consequência da presença de isômeros conformacionais 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 triptofano e também tirosina 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 pode ser sempre usada para estudar dobramento de proteínas (ou proteína dobrável) e reações de associação [Lakowicz, 2006].

Sumarizando, o crescente entendimento da fotofísica do grupo indol, a habilidade de se alocar o resíduo triptofano 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 a partir de triptofano quanto aos detalhes de seu ambiente local tem providenciado muitas oportunidades para se estudar função, dinâmica e enovelamento de proteínas [Lakowicz, 2006].

1.4.1.1 Propriedades Espectrais dos Aminoácidos Aromáticos

Como supracitado, tirosina, fenilalanina e triptofano são os aminoácidos responsáveis pela emissão de fluorescência nas proteínas. Eles apresentam diferentes coeficientes de absorvidade molar (ε), que é dado em $M^{-1} \cdot cm^{-1}$, e rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_f) que é adimensional, variando de acordo com os diferentes comprimentos de onda (λ), na absorção (λ_{abs}) e na emissão (λ_{em}), medidos em nanômetros (nm), conforme mostrado abaixo (Tabela 5). O processo de emissão de fluorescência das proteínas é normalmente dominado pelo resíduo do triptofano que absorve em comprimento de onda deslocado para o vermelho quando comparado com tirosina e fenilalanina (Figura 60) exibindo alto coeficiente de extinção molar,

sendo que normalmente a energia absorvida pela fenilalanina e tirosina é transferida para o triptofano na mesma proteína [Lakowicz, 2006].

Tabela 5: Coeficientes de absorvidade molar e rendimento quântico de fluorescência para Phe, Tyr e Trp em solução aquosa neutra a 23°C, adaptado de Lakowicz (2006).

Aminoácido	λ_{abs} (nm)	λ_{em}	ε ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	ϕ_f
Fenilalanina, Phe	257	282	200	0,03
Tirosina, Tyr	274	303	1400	0,14
Triptofano, Trp	280	340	5600	0,13

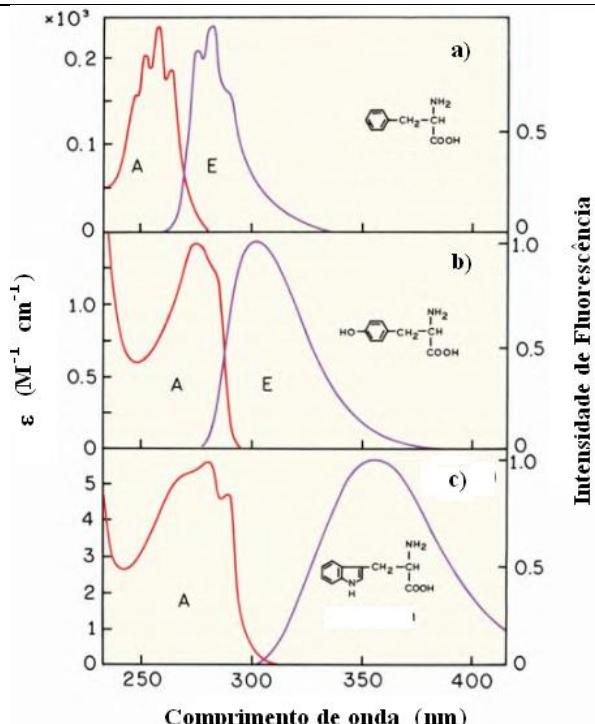


Figura 60: Espectro de absorção (em vermelho, indicado pela letra “A”) e emissão (em azul, indicado pela letra “E”) de fluorescência para os aminoácidos **a)** fenilalanina, **b)** tirosina e **c)** triptofano, adaptado de Lakowicz, 2006.

A fenilalanina exibe seus espectros de absorção e emissão deslocado para o azul quando comparado com os demais resíduos fluorescentes ($\lambda_{abs} = 257$ e $\lambda_{em} = 282$ nm). Já para o resíduo de tirosina os processos de absorção e emissão se encontram em uma situação intermediária ($\lambda_{abs} = 274$ e $\lambda_{em} = 303$ nm) e é relativamente insensível à polaridade do solvente. Os espectros de absorção e emissão do triptofano estão deslocados para o vermelho e em água apresentam os valores $\lambda_{abs} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 340$ 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 41) não é excitada na maioria dos experimentos. Além disso, o rendimento quântico de fluorescência da fenilalanina é pequeno, em torno de 0,03 (Tabela 5), assim, a emissão deste resíduo proteico é raramente observada. A absorção de proteína em 280 nm se deve tanto aos resíduos de tirosina quanto de triptofano. A 23°C em solução aquosa neutra, o rendimento quântico de fluorescência de tirosina e triptofano é de 0,14 e 0,13, respectivamente. Em comprimentos de onda maiores que 295 nm, a absorção é predominantemente a partir do triptofano. [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 valores de 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 que 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 contribuir para o baixo rendimento quântico de fluorescência por parte da tirosina e da fenilalanina pode ser atribuído a processos de transferência de energia que podem ocorrer por vários mecanismos, como transferência de energia de Förster. No caso específico do triptofano 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 61) e emissão distintos que são diferentemente sensíveis à polaridade do solvente (Figura 62). [Lakowicz, 2006]

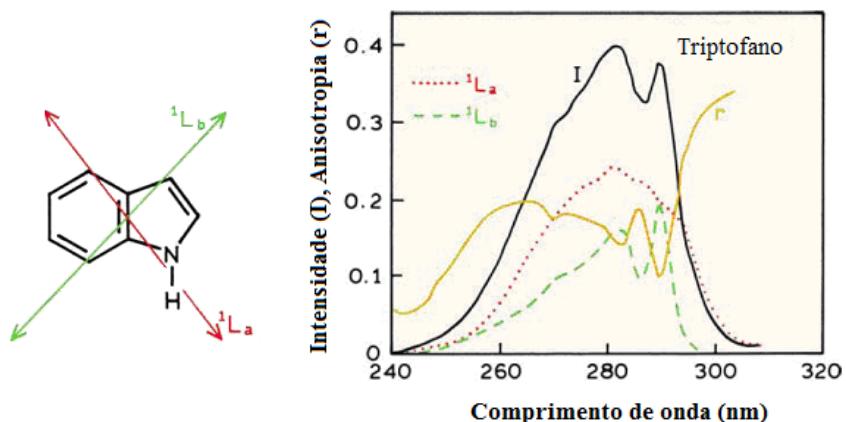


Figura 61: Espectro de anisotropia de absorção do triptofano como função da orientação do resíduo indólico em relação às bandas $^1\text{L}_\text{a}$ e $^1\text{L}_\text{b}$ [modificado de Lakowicz (2006)]

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

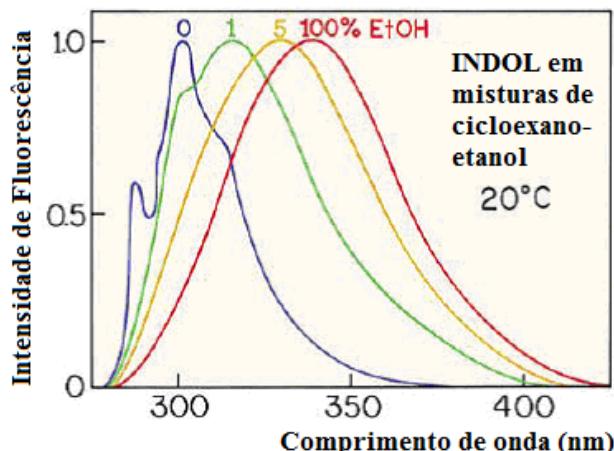


Figura 62: Espectro de emissão de fluorescência do resíduo indólico do triptofano em diferentes ambientes químicos [modificado de Lakowicz (2006)]

1.4.2 Absorção de luz no ultravioleta-visível (UV-Vis)

A absorção de luz não-polarizada é descrita pela absorbância (A) e é definida pela Equação 1 [Fasman *et al.*, 1996; Woody *et al.*, 1995].

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (1)$$

Onde: A: absorbância; I_0 : intensidade da luz incidente; I: intensidade após a luz percorrer uma distância l no meio.

Segundo a lei de Lambert-Beer (Equação 2) [Pace *et al.*, 1995], pode-se determinar o coeficiente de extinção molar, ou coeficiente de absorção molar, ou absorvidade molar (ϵ) pela equação 2 [Pace *et al.*, 1995].

$$A = \epsilon cl \quad (2)$$

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

Efeitos de deslocamento na banda de absorção máxima da ASH próximo a região de $\lambda_{\text{max}} = 280$ nm referente a transição $\pi\pi^*$ que está diretamente ligado ao resíduo cromofórico do triptofano, 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, quando comparado com o espectro de absorção da proteína livre, indicam um ambiente químico mais hidrofóbico, enquanto o oposto, um deslocamento batocrômico está diretamente associado a um ambiente químico próximo ao resíduo do triptofano como sendo mais hidrofílico. [Lakowicz, 2006]

1.4.3 Absorção de luz circularmente polarizada: Dicroísmo circular

O dicroísmo circular (DC) é uma técnica sensível que possibilita monitorar mudanças conformacionais em proteínas, [Yue *et al.*, 2008a; Yue *et al.*, 2008b] sendo geralmente usado para a determinação da estrutura secundária de macromoléculas [Kelly, Tess e Prince, 2005; Cheng *et al.*, 2009]. O DC é particularmente útil para o estudo de moléculas quirais e macromoléculas, tais como proteínas, carboidratos, dendrímeros, etc., compostos esses que possuem unidades oticamente ativas, ou seja, podem exibir sinal na espectroscopia de DC. 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: $DC = A_E - A_D$ (Equação 3). [Fasman, 1996; Hecht, 1998; Woody, 1995]

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

Onde: DC: dicroísmo circular; A_E : absorbância para a luz circularmente polarizada para a esquerda; 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 extinção molar para a direita ou para a esquerda, ε_D e ε_E , respectivamente.

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

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_E - \varepsilon_D = (A_E - A_D)/cl \quad (4)$$

Onde: $\Delta\varepsilon$: dicroísmo circular molar (em L/cm.mol); ε_E : coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a esquerda (em L/cm.mol); ε_D : coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a direita (em L/cm.mol).

Por definição, a luz linearmente polarizada é composta de dois componentes circularmente polarizados de mesma intensidade. A espectroscopia de dicroísmo circular refere-se à absorção diferencial da luz circularmente polarizada para a direita e para a esquerda. A luz circularmente polarizada é obtida quando os vetores correspondentes às componentes elétrica e magnética da radiação eletromagnética, ao se somarem, geram uma componente que altera a sua direção de maneira circular ao longo do seu eixo de propagação. Em cada um desses componentes, o vetor eletromagnético gira na direção de propagação. Observando-se perpendicularmente a variação no tempo do vetor elétrico da luz polarizada circularmente para uma amostra que apresente dicroísmo circular, percebe-se que a ponta deste vetor segue uma hélice, girando no sentido horário para a direita e anti-horário para a esquerda (Figura 63) [Esteves e Costa, 2014].

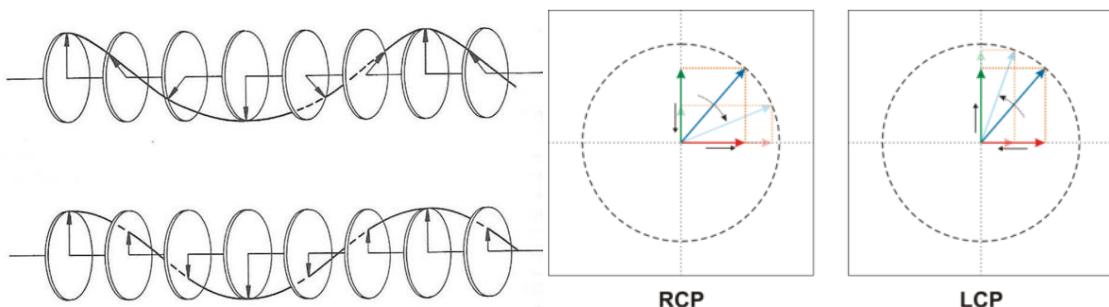


Figura 63: Representação esquemática da polarização circular da radiação eletromagnética. Nas duas figuras a direita, a seta em vermelho corresponde à componente elétrica, a seta em verde à componente magnética e a seta em azul corresponde à soma dos vetores. As demais setas indicam como variam as componentes elétrica e magnética em função do tempo, adaptado de Esteves e Costa, 2014.

Todos os instrumentos comerciais de DC (Figura 64), medem a variação de absorbância (ΔA , Equação 4), contudo, por razões históricas, os aparelhos de DC são calibrados para

elipticidade (θ) (Equação 5). [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf]; Fasman, 1996; Woody, 1995]

$$\theta = \frac{180 \ln 10 \Delta A}{4\pi} = 32,98 \Delta A \quad (5)$$

Onde: θ : elipticidade {em deg (graus)}; ΔA : variação de absorbância.

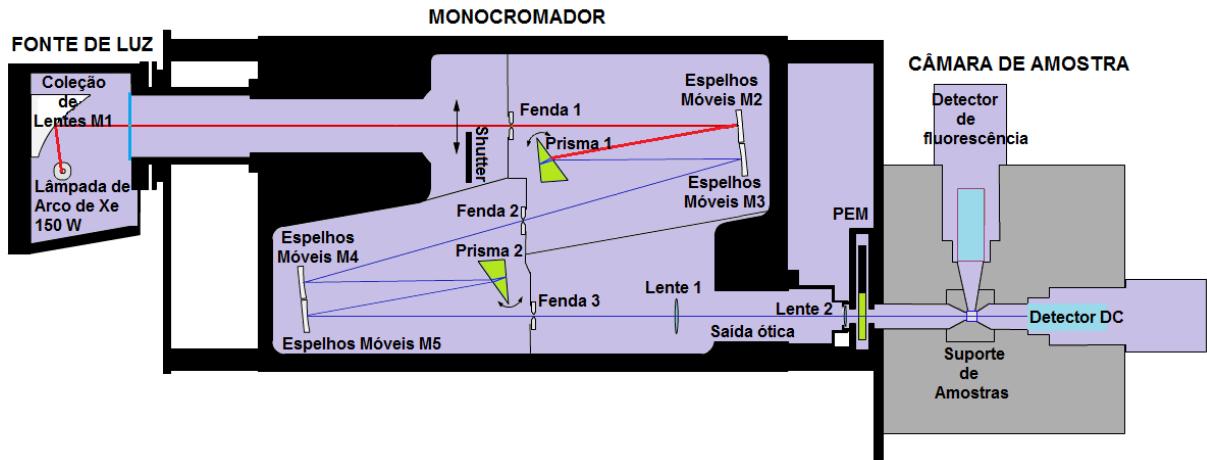


Figura 64: Representação esquemática de um aparelho de dicroísmo circular, onde são mostrados os componentes básicos para sua operação, adaptado de <http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy/5-cd-spectrometer-performance>

E para eliminar os efeitos do caminho ótico e da concentração, a elipticidade (θ) é expressa na forma de elipticidade molar (θ_m), (Equação 6) [Fasman, 1996; Hecht; 1998; Woody, 1995; www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf].

$$\theta_m = \frac{100\theta}{cl} = 3298\Delta\varepsilon \quad (6)$$

Onde: θ_m : elipticidade molar (em deg.cm².dmol⁻¹); θ : elipticidade (em deg); c : concentração da espécie que absorve a luz; l : distância que a luz percorre no meio (em cm); $\Delta\varepsilon$: dicroísmo circular molar (em L/cm.mol).

Para avaliar a estrutura secundária de proteínas globulares são feitas medidas na região do ultravioleta, sendo que valores negativos máximos de elipticidade (θ) em 208 nm e 222 nm indicam a presença de uma estrutura predominantemente na conformação hélice- α , enquanto que bandas negativas em 215 nm e 225 nm sugerem a presença de estrutura em folha- β (Figura 65) [Johnson, 1988; Venyaminov e Yang, 1996; e Cordeiro, 2005].

Existem algumas vantagens na utilização desta técnica como, por exemplo: experimentos simples e rápidos; 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*. [adaptado de www.chem.uzh.ch/zerbe/CD-Spectroscopy.pdf]

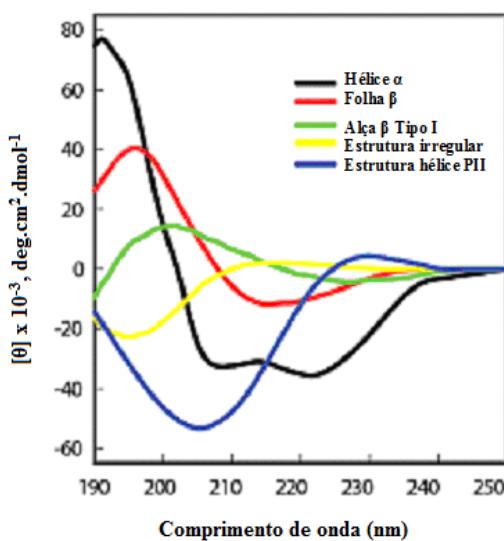


Figura 65: Espectros de dicroísmo circular representativos de estruturas secundárias de proteínas, adaptado de www.chem.uzh.ch/zerbe/CD-Spectroscopy.pdf.

1.4.3.1 Cálculos da porcentagem de estrutura hélice- α

Estimativas acerca do % de hélice- α para a estrutura secundária de ASH na ausência e na presença de supressor podem ser estimadas usando as Equações 7 e 8 [Chen *et al.*, 1972; Khan *et al.*, 2002; Stan *et al.*, 2009]. Os valores experimentais de elipticidade molar (θ_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 MRE₂₀₈ e MRE₂₂₂ (Equação 7) [Khan *et al.*, 2002; Stan *et al.*, 2009].

$$MRE = \frac{\theta}{10nlC_p} \quad (7)$$

Onde: MRE : elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual ($\text{deg.cm}^2/\text{dmol}$); θ : elipticidade observada (mdeg); n : número de amino ácidos residuais ou resíduos de amino ácido (582 para ASH); l : comprimento ótico da cubeta (1 cm); C_p : concentração molar de ASH ($1,00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$).

$$\alpha - \text{Helix\%} = \left[\frac{(-MRE_{208} - 4000)}{(33000 - 4000)} \right] \cdot 100 \quad (8a)$$

$$\alpha - \text{Helix\%} = \left[\frac{(-MRE_{222} - 2340)}{30300} \right] \quad (8b)$$

Onde: MRE_{208} : elipticidade residual significativa em 208 nm ($\text{deg.cm}^2/\text{dmol}$); MRE_{222} : elipticidade residual significativa em 222 nm ($\text{deg.cm}^2/\text{dmol}$); $\alpha\text{-\% hélice}$: percentual de α -hélice na estrutura da ASH

Essas bandas negativas em torno de 208-209 nm e 222-223 nm (na região do ultravioleta) são características da estrutura hélice- α de proteína [Stan *et al.*, 2009] e correspondem às transições $n-\pi^*$ que ocorrem na sua estrutura secundária (no caso, a ASH) [Chen *et al.*, 1972;

Yang *et al.*, 2002 e Yue *et al.*, 2008b]. Posteriormente, os valores de MRE₂₀₈ e MRE₂₂₂ são substituídos na Equação 8 (a e b) [Chen *et al.*, 1972; Yang *et al.*, 2002 e Yue *et al.*, 2008b; Khan *et al.*, 2002; Stan *et al.*, 2009] e assim usados para calcular os valores de percentual de hélice- α na estrutura secundária da ASH (% hélice- α).

1.4.4 A Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência pode fornecer informações sobre uma ampla gama 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 entre ligantes e proteínas. Luminescência é a emissão de luz de qualquer substância e ocorre a partir de estados eletronicamente excitados; ela é formalmente dividida em duas categorias – fluorescência e fosforescência – dependendo da natureza do estado excitado [Valeur e Berberan-Santos, 2002; Lakowicz, 2006; Turro *et al.*, 2008].

A fluorescência ocorre a partir de estados excitados singlete, quando o elétron no orbital excitado é emparelhado (por spin oposto) ao elétron no orbital do estado fundamental. Seu retorno ao estado fundamental é permitido por spin e ocorre rapidamente pela emissão de um fóton. As taxas de emissão de fluorescência são tipicamente 10^8 s^{-1} , de modo que um tempo de vida típico de fluorescência é próximo de 10 ns (10^{-8} s) [Turro *et al.*, 2008].

A fosforescência é a emissão de luz a partir de estados excitados tripletos, nos quais o elétron no orbital excitado tem a mesma orientação de spin que o elétron do estado fundamental. As transições para o estado fundamental são proibidas e as taxas de emissão são lentas (10^3 a 100 s^{-1}), de modo que os tempos de vida da fosforescência são tipicamente de milissegundos a segundos [Lakowicz, 2006]. A fluorescência normalmente ocorre a partir de moléculas aromáticas. Algumas substâncias fluorescentes (fluoróforos) são mostradas na Figura 66.

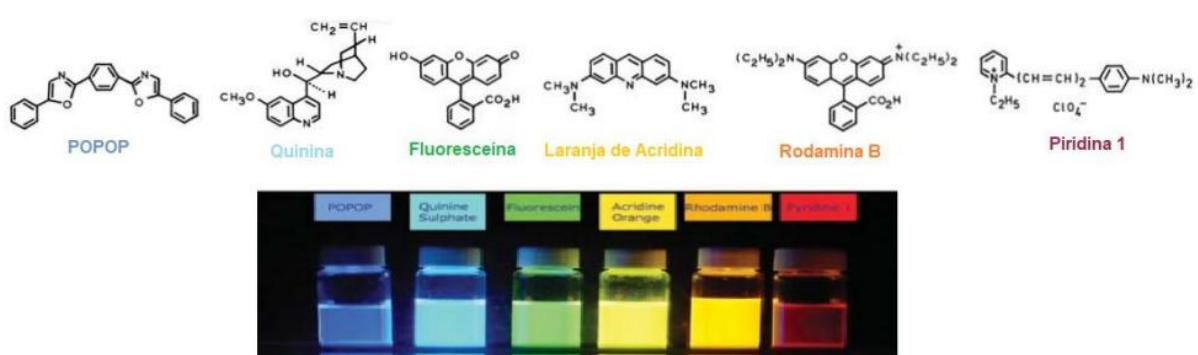


Figura 66: Compostos fluorescentes em diferentes regiões do visível do espectro eletromagnético, adaptado de Lakowicz, 2006.

Um espectro de emissão de fluorescência é um gráfico da intensidade de fluorescência versus comprimento de onda (nm) ou número de onda (cm^{-1}) (Figura 67). Para obtenção deste tipo de espectro é realizado o processo de excitação em um determinado comprimento de onda (na região de absorção) 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 detecção de alta sensibilidade. [Lakowicz, 2006]

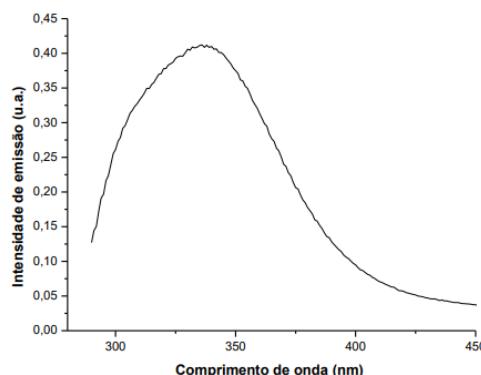


Figura 67: Espectro de fluorescência da ASH a uma concentração de 10^{-5} mol/L

Os processos que ocorrem entre a absorção e a emissão da luz podem ser ilustrados pelo diagrama de Jablonski. Os diagramas de Jablonski são usados em uma variedade de formas, e ilustram vários processos moleculares que podem ocorrer em estados excitados. (Figura 49).

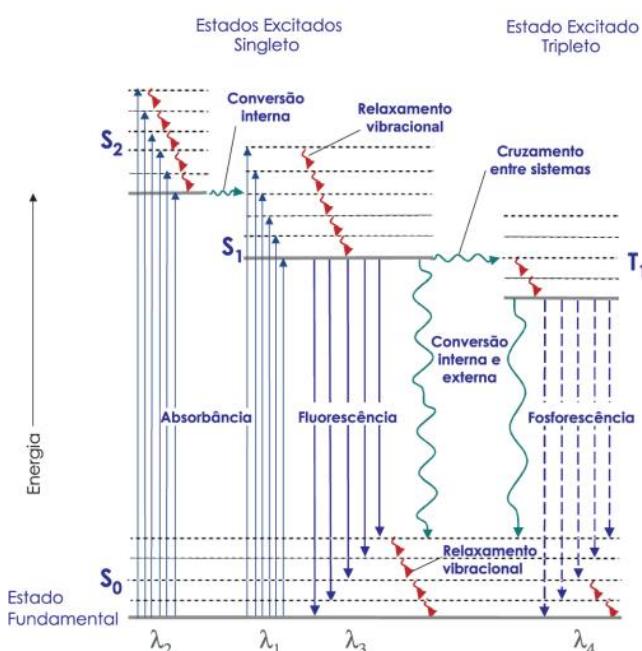


Figura 68: Diagrama de Jablonski, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após uma molécula absorver um fóton com energia da faixa ultravioleta ou visível. S_0 é o estado eletrônico fundamental, S_1 e T_1 são os estados excitados singletos e triplexos de menor energia, respectivamente. S_2 é um segundo estado excitado singletos. As setas retas representam os processos envolvendo fótons, e as setas onduladas são as transições não-radioativas (que não emitem radiação) [Sotomayor *et al.*, 2008]

Como pode ser ilustrado através da figura 68, no diagrama de Jablonski o estado fundamental, o singlete de mais baixa energia e o segundo estados eletrônicos excitado são representados por S_0 , S_1 e S_2 , 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, em geral vários processos ocorrem. Um fluoróforo geralmente é excitado para algum nível vibracional mais alto de S_1 ou S_2 . Com algumas raras exceções, moléculas em fases condensadas relaxam rapidamente para o nível vibracional mais baixo de S_1 . Esse processo é chamado de conversão interna e ocorre dentro de 10^{-10} a 10^{-12} s, geralmente, podendo ser menos. Como os tempos de vida da fluorescência são tipicamente próximos de 10^{-10} a 10^{-8} s, a conversão interna em via de regra é completa antes da emissão. Assim, esta emissão de fluorescência vem a resultar de um estado excitado termicamente equilibrado, ou seja, o estado vibracional de menor energia de S_1 [Turro, 2008].

Moléculas no estado S_1 também podem sofrer uma conversão de spin para o primeiro estado tripleno T_1 . A emissão de T_1 é denominada fosforescência e geralmente é deslocada para comprimentos de onda mais longos (menor energia) em relação à fluorescência. A conversão de S_1 para T_1 é chamada de cruzamento intersistema. Moléculas contendo átomos pesados como bromo e iodo são frequentemente fosforescentes. Os átomos pesados facilitam o cruzamento entre sistemas e, assim, aumentam os rendimentos quânticos de fosforescência [Turro, 2008].

Outra propriedade geral da fluorescência é que o mesmo espectro de emissão de fluorescência normalmente é observado independentemente do comprimento de onda de excitação. Isso é conhecido como regra de Kasha, embora Vavilov tenha 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. Esses níveis de energia vibracional têm espaçamento semelhante aos do estado S_1 . O espectro de emissão mostra o mesmo espaçamento de energia vibracional que o espectro de absorção (Figura 69) [Lakowicz, 2006].

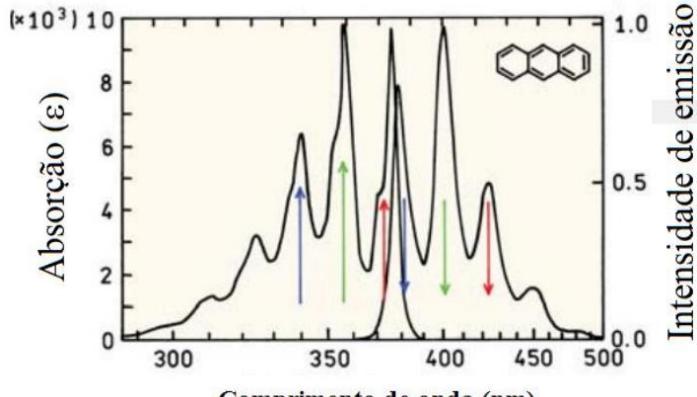


Figura 69: Regra da imagem especular e fatores de Franck-Condon. Os espectros de absorção e emissão para antraceno, adaptado de Lakowicz, 2006.

1.4.4.1 Tempo de Vida e Rendimento Quânticos 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 a relação entre o número de fótons emitidos e absorvidos. Logo, substâncias com os maiores rendimentos quânticos, aproximando-se da unidade, 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 e, portanto, a informação disponível de sua emissão. Os significados de rendimento quântico e tempo de vida são melhor representados por um diagrama de Jablonski simplificado (Figura 70) [Lakowicz, 2006].

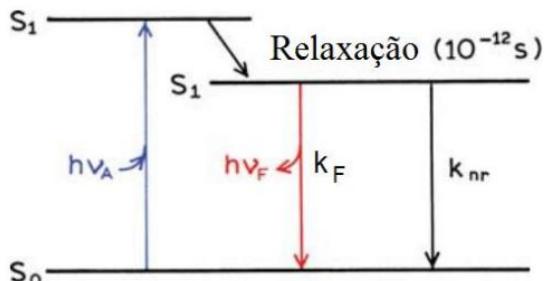


Figura 70: Diagrama de Jablonski simplificado para ilustrar o significado de rendimentos quânticos e tempos de vida. [modificado de Lakowicz, 2006]

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 Q , é dada pela equação (10). [Lakowicz, 2006]

$$Q = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} \quad (9)$$

O rendimento quântico pode estar próximo da unidade se a taxa de decaimento não radioativo for muito menor que a taxa de decaimento radiativo, ou seja, $k_{nr} < k_F$. Notamos que o rendimento energético da fluorescência é sempre menor que a unidade por causa das perdas de Stokes. 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. O tempo de vida para fluoróforos, como exemplificado na Figura 69, é dado pela equação abaixo (equação 10):

$$\tau = \frac{1}{K_F + K_{nr}} \quad (10)$$

A emissão de fluorescência é um processo aleatório, e poucas moléculas emitem seus fôtons precisamente em $t = \tau$. O tempo de vida é um valor médio do tempo gasto no estado excitado. Para um único decaimento exponencial 63% das moléculas decaíram antes de $t = \tau$ e 37% decaíram em $t > \tau$. O tempo de vida do fluoróforo na ausência de processos não radiativos é chamado de tempo de vida intrínseco ou natural (equação 11), [Lakowicz, 2006]

$$\tau_n = \frac{1}{K_F} \quad (11)$$

Em princípio, o tempo de vida natural τ_n pode ser calculado a partir dos espectros de absorção, coeficiente de extinção e espectros de emissão do fluoróforo. A taxa de decaimento radiativo k_F pode ser calculada usando a equação (12):

$$K_F \cong 2,88 \cdot 10^9 n^2 \frac{\int F(\bar{v}) d\bar{v}}{\int \frac{F(\bar{v}) d\bar{v}}{\bar{v}^3}} \int \frac{\varepsilon(\bar{v})}{\bar{v}} d\bar{v} = 2,88 \cdot 10^9 n^3 \langle \bar{v}^3 \rangle^{-1} \int \frac{\varepsilon(\bar{v}) d\bar{v}}{\bar{v}} \quad (12)$$

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

O tempo de vida natural τ_n pode ser calculado a partir do tempo de vida medido (τ) e do rendimento quântico pela equação (13) [Lakowicz, 2006].

$$\tau_n = \tau / Q \quad (13)$$

Muitos fluoróforos bioquímicos não se comportam de forma tão previsível quanto os compostos aromáticos não substituídos. Portanto, muitas vezes há pouca concordância entre o valor de τ_n calculado a partir da equação 13 e aquele calculado a partir de seus espectros de absorção e emissão (equação 11). Essas discrepâncias ocorrem por uma variedade de razões

desconhecidas e conhecidas, como uma fração dos fluoróforos localizados próximos aos grupos de extinção, o que às vezes ocorre para resíduos de triptofano em proteínas. O rendimento quântico e a 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 taxa de conversão interna ou uma baixa taxa de emissão [Lakowicz, 2006].

1.4.5 Os mecanismos de supressão de fluorescência estática e dinâmica

A intensidade da fluorescência pode ser diminuída por uma ampla variedade de processos. Essas diminuições de intensidade são chamadas de supressão que pode ocorrer por diferentes mecanismos. Estes incluem reações de estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, transferência de elétrons entre outras. Na maioria dos casos a supressão ocorre pela formação de complexos com o supressor/fluoróforo no estado fundamental chamado de *Supressão Estática* ou por um processo colisional que ocorrem pelo encontro do supressor e o fluoróforo no estado excitado chamado de *Supressão Dinâmica* (Figura 71) 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 em 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 e Wu, 2010; Xu, Liu e Wen, 2008; Zhang *et al.*, 2009].

Já supressão dinâmica refere-se a qualquer processo não radiativo no qual o extintor interage com o estado excitado do fluoróforo [Braslavsky, 2007] e, portanto, resulta em uma mudança na intensidade da fluorescência em estado estacionário e no tempo de vida da fluorescência. [Weert e Stella, 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 acceptor através do acoplamento dipolo-dipolo não radiativo ou a transferência de elétrons fotoinduzida, que não requerem contato direto entre o fluoróforo e o supressor.

De acordo com essas definições, a extinção estática e dinâmica pode ser distinguida pela medição dos tempos de vida da fluorescência. Somente se o tempo de vida diminuir, a extinção dinâmica estará presente. [Weert e Stella, 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 nas intensidades de fluorescência. Também pode ocorrer supressão como resultados 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 (é possível aumentar e diminuir). [Weert, 2010]

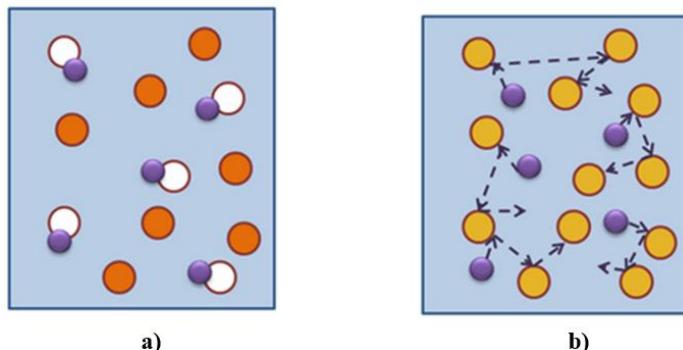


Figura 71: Mecanismos de supressão de fluorescência: **a)** mecanismo estático e **b)** mecanismo dinâmico, adaptado de Lakowicz, 2006.

Tanto o processo de supressão colisional como o estático podem ser ilustrados no diagrama de Jablonski modificado (Figura 72) associado a equação cinética (Esquema 2).

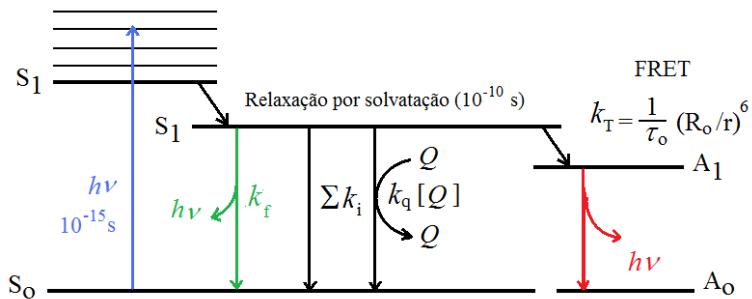
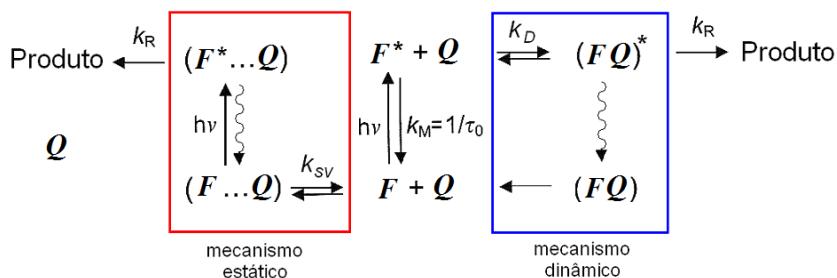


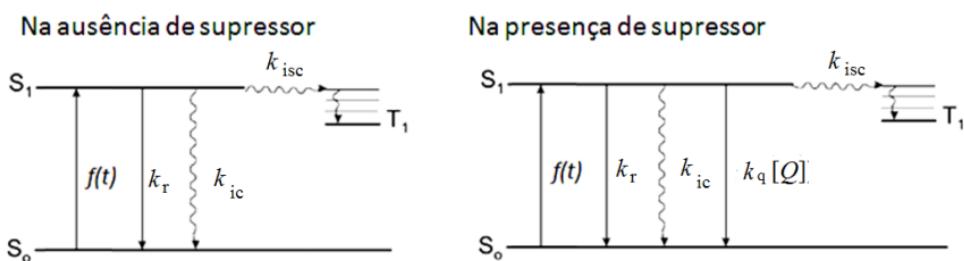
Figura 72: Diagrama de Jablonski (energia) para o processo de desativação do estado excitado de uma molécula por diferentes mecanismos, adaptado de Lakowicz, 2006.



Esquema 2: Equação cinética das transações eletrônicas, adaptado de Lakowicz, 2006.

1.4.5.1 O processo de supressão – A Equação de Stern-Volmer

I) A supressão dinâmica: o fluoróforo é devolvido 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 3) [Valeur e Berberan-Santos, 2002].



Esquema 3: Esquema do processo de supressão dinâmica, na presença e na ausência de supressor, adaptado de Valeur, 2002.

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

$$\frac{d[F]}{dt} = f(t) - k_M [F]_0 = 0$$

Equação 14

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

Equação 15

$$k_M = k_r + k_{ic} + k_{isc} = k_r + k_{nr} = 1/\tau_0$$

$$\frac{F_0}{F} = k_M + \frac{k_q [Q]}{k_M} = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

Equação 16

F_0 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 17),

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (17)$$

Onde nesta expressão, K_{sv} é a constante de supressão de Stern-Volmer, k_q é a constante de supressão bimolecular, τ_0 é o tempo de vida não suprimido (natural) e $[Q]$ é a concentração do

supressor. A constante de supressão de Stern-Volmer K 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 é baixo. Valores maiores de K são encontrados se o fluoróforo estiver livre em solução ou na superfície de uma biomolécula.

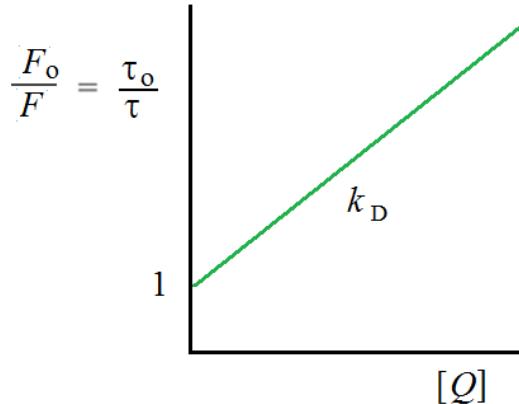
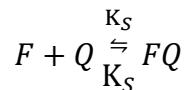


Figura 73: Gráfico de Stern-Volmer para o processo de supressão dinâmico, adaptado de Lakowicz, 2006

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

II) A supressão estática: ocorre pela formação de complexos não fluorescentes com supressores (Esquema 4). Quando este complexo absorve luz, ele retorna imediatamente ao estado fundamental sem emissão de um 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. Essa constante é dada pela equação 18:



Esquema 4: Equilíbrio da supressão estática para a formação de complexos não fluorescentes com supressores

$$K_S = \frac{[F-Q]}{[F][Q]} \quad (18)$$

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 19

$$[F]_0 = [F] + [F - Q] \quad (19)$$

substituindo na equação 18, temos:

$$K_S = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F_0]}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (20)$$

rearranjando a equação 20, obtemos:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S [Q] \quad (21)$$

Observe que a dependência de F_0/F em $[Q]$ é linear, o que é idêntico ao observado para supressão dinâmica, exceto que a constante de supressão agora é a constante de associação (Figura 59) [Valeur, 2002; Lakowicz, 2006].

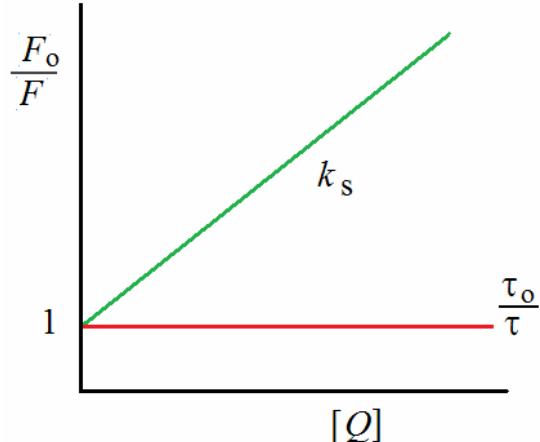


Figura 74: Gráfico de Stern-Volmer para o processo de supressão estática, adaptado de Lakowicz, 2006

Tanto a supressão estática quanto a dinâmica requerem contato molecular entre o fluoróforo e o supressor (Esquema 2).

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

III) Mecanismo combinado estático/dinâmico: leva ao desvio da linearidade em direção ao eixo y (Figura 75) sendo este então melhor descrito pela equação 21 (Esquema 5):

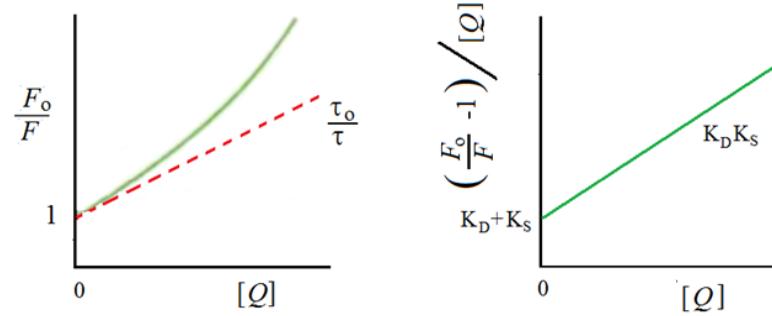
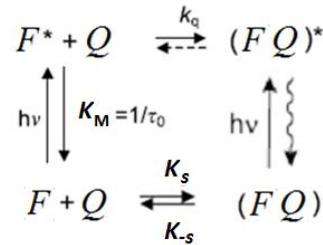


Figura 75: Gráfico de Stern-Volmer e Stern-Volmer para o processo de supressão estático/dinâmico para a mesma população de fluoróforo, adaptado de Lakowicz, 2006



Esquema 5: Mecanismo combinado estático/dinâmico

Neste caso a equação de Stern Volmer pode ser assim descrita como:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{app}[Q] \quad (22)$$

Onde K_{app} pode ser descrito como:

$$K_{app} = \left[\frac{F_0}{F} - 1 \right] \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q] \quad (23)$$

IV) Sistemas contento mais de um fluoróforo: sendo que um deles parcialmente ou totalmente inacessível o desvio da linearidade leva a curva se deslocar em direção ao eixo X (Figura 76):

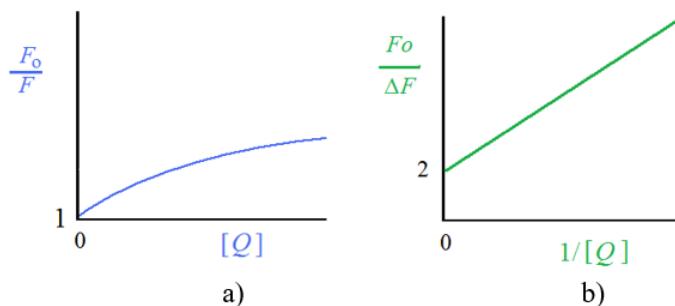
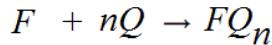


Figura 76: a) Stern-Volmer; b) Stern-Volmer modificado para a supressão de um sistema contendo mais de um fluoróforo, adaptado de Lakowicz, 2006

Para o caso em particular, onde o supressor pode atuar em um sistema contendo mais de um fluoróforo (Esquema 6), sendo que estes têm a mesma capacidade de formação de uma ligação com a molécula do supressor, não é observado nenhum desvio da linearidade dos resultados dos estudos de supressão (Figura 77). No entanto, os resultados obtidos segundo a nova equação de Stern-Volmer, tem a capacidade de indicar a constante de ligação k_b e o número de sítios de ligação n .



Esquema 6: Esquema de supressão para mais de um fluorófilo, adaptado de Lakowicz, 2006

Onde temos que:

$$K_b = [Q_nF]/[Q]^n[F] \quad (24)$$

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

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_a + n \log [Q] \quad (25)$$

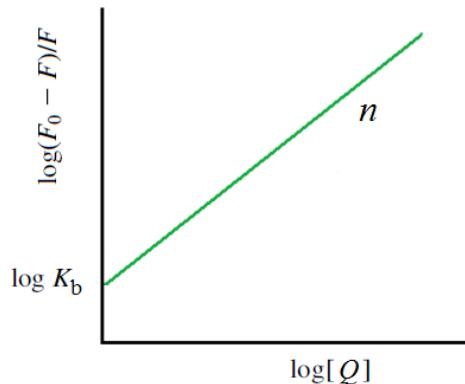


Figura 77: Gráfico para a supressão de um sistema contendo mais de um fluoróforo, com a mesma capacidade de formação de uma ligação com a molécula do supressor. [modificado de Lakowicz, 2006]

1.4.5.2 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 ligação obtidas e o número de sítios de ligação são diferentes quando considerados os diferentes modelos ou

equações. A escolha de um modelo baseado em extinção de fluorescência adequado para estudar a interação entre fármacos e proteína é um ponto problemático em toda pesquisa e pensando nisso foi elaborada uma tabela (tabela 6) onde estão descritas as principais equações e um resumo das condições teóricas específicas de cada método.

As diferentes definições apresentadas para a equação de Stern-Volmer (Tabela 6) têm sido amplamente empregadas no estudo da interação de compostos bioativos com inúmeros sistemas proteicos. No entanto, em um estudo crítico, Weert e colaboradores [weert, 2010, Weert e Stella, 2011] descreveram uma série de hipóteses que podem ser levantadas em consideração para melhorar a interpretação dos resultados tanto do ponto de vista experimental como das análises teóricas que estão diretamente ligadas aos modelos matemáticos propostos, e apontam para várias armadilhas que cada método empregado pode estar sujeito [weert, 2010, Weert e Stella, 2011].

Tabela 6: 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; Ka é a constante de ligação; n número de sítios de ligação.
Lineweaver–Burk/Stern–Volmer modificada $(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_a^{-1} F_0^{-1} [Q]^{-1}$	Supressão estática Ka é a constante de ligação.
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; Ka é a constante de ligação.
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; KSV e Ka são as constantes de supressão dinâmica e estática; segunda ordem em relação a [Q].
Regressão logarítmica dupla modificada $\lg \left[\frac{F - F_0}{F_{max} - F} \right] = n \lg K_a + n \lg \left[\frac{[Q] - (F - F_0)[P]}{F_{max} - F_0} \right]$	Ka é a constante de ligação aparente; n local de ligação; Fmax é a fluorescência máxima residual.
Levine $nk_a - k_a f = \frac{f}{(R - f)[P]}$	Complexo inibidor–proteína 1:1, Ka e a capacidade de ligação; ajustada pelo método dos mínimos quadrados.
Regressão de logaritmo duplamente modificada $\frac{\lg(F - F_0)}{F} = n \lg K_a + n \lg \left[\frac{[Q] - (F - F_0)[P]}{F_0} \right]$	Ka é a constante de ligação aparente; n é o número de sítios de ligação, [P] concentrações totais de proteína
Scatchard $v = \frac{n}{P}$	v é o número de moles de inibidor ligado por mole de proteína; n é o número de sítios de ligação.

$$\nu = \frac{nK_a[Q]}{1 + K_a[Q]}$$

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 ligação; r é a distância entre proteína e o extintor e R_0 é a 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 ligação de cada molécula de ligante causa o mesmo efeito de extinção na intensidade de fluorescência; K_a é a constante de associação; Q é a porcentagem corrigida de supressor; Q_{\max} , a supressão máxima; $[Q_t]$ é a concentração total de supressor; $[P_t]$ é a concentração total de proteína e n é a estequimetria de ligação; $\beta = Q/Q_{\max}$ and $[Q] = [Q_t] - n[P_t]$,

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

Para explicar as várias questões, bem como para mostrar a metodologia correta, é necessário começar com os fundamentos da ligação de ligantes. Para uma ligação simples de ligante com estequimetria (1:1), a constante de associação (ou ligação) (K_a) é dada por:

$$K_a = \frac{[PL]}{[P]^*[L]} \quad (26)$$

onde $[PL]$ é a concentração do complexo proteína-ligante, $[P]$ é a concentração de proteína e $[L]$ a concentração de ligante. Quando a ligação do ligante causa a formação de um complexo proteína-ligante não fluorescente, então a constante de associação é dada por:

$$K_a = \frac{F_0 - F}{F^*[L]} \Rightarrow \frac{F_0 - F}{F} = K_a^*[L] \Rightarrow \frac{F_0}{F} = 1 + K_a^*[L] \quad (27)$$

Onde F_0 é a fluorescência da proteína na ausência de ligante, e F a fluorescência em um determinado concentração do ligante. A equação 27 é a conhecida equação de Stern-Volmer, mas com a constante de Stern-Volmer agora igual à constante de associação. [weert, 2010, Weert e Stella, 2011]

Armadilha 1: Fluorescência residual do complexo

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 27 que se refere à contribuição de fluorescência pelo complexo:

$$\frac{F_0 - F}{F - F_c} K_a^*[L] \quad (28)$$

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 equação 28 aos dados experimentais a equação de Stern-Volmer modificada (equação 28). A equação de Stern-Volmer modificada foi explicitamente derivada para um processo de extinção dinâmica, no qual há uma contribuição constante de fluorescência da fração não extingível. No entanto, isso não é válido para um processo de extinção 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 .

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a} + \frac{1}{K_a^* f_a^* [L]} \quad (29)$$

onde f_a é geralmente definido como a fração de fluoróforos que é acessível ao supressor. Para uma extinção 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.

Um ajuste mais apropriado na maioria dos casos deve levar em conta a fluorescência complexa residual, conforme a equação abaixo [Beckett, 2011; Condict e Kasapis, 2022]

$$F = F_0 - \frac{\left((Q_h + Q_S + K_D) - \left(\frac{(- (Q_h + Q_S + K_D))^2 - 4 \cdot Q_h \cdot Q_g}{2} \right)^{0,5} \right)}{Q_h} \quad (30)$$

onde, F_{Bound} é a fluorescência do hospedeiro totalmente complexado, Q_h é a concentração molar da molécula hospedeira, Q_g é a concentração molar da molécula convidada e K_D é a constante de dissociação. [Beckett, 2011; Condict e Kasapis, 2022]

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

A concentração de ligante que deve ser inserida nas equações 17 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 $[L]_{free} \approx [L]_{added}$. 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, Raub e Kézdy, 1995; Weert, 2010]

O erro potencial introduzido por esta armadilha é mais importante para a equação de Stern-Volmer modificada (equação 28). 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 ligação

A Equação 26 pode ser modificada para incluir a ligação do ligante a vários locais na proteína introduzindo a estequiometria n:

$$K_a = \frac{[PL_n]}{[P]^* [L]^n} \quad (31)$$

Como n é uma incógnita, não é possível realizar uma regressão linear usando a equação 26, 27 e 28, a solução mais simples para linearizar as equações é tomar o logaritmo, conforme exemplificado abaixo usando a Eq. 26:

$$\frac{F_0 - F}{F} = K_a * [L]^n \Rightarrow \log K_a + n \log [L] \quad (32)$$

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 32 a questão mencionada anteriormente $[L]_{\text{free}}$ vs $[L]_{\text{added}}$ tem que ser levada em consideração. Para resolver esse problema da concentração $[L_{\text{livre}}]$ x $[L_{\text{add}}]$ pode se usar uma derivatização da equação 32:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = n \log K_a + n \cdot \log \left([L_{\text{added}}] - \frac{F_0 - F}{F_0} * [P_t] \right) \quad (33)$$

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

$$[L_{\text{free}}] = [L_{\text{added}}] - \frac{F_0 - F}{F_0} * [P_t] \quad (34)$$

A equação 34 pode ser usada em duas condições; quando o complexo deve ser não fluorescente (armadilha 1). Ou, e mais importante, a equação 34 só pode ser usado se a estequiometria de ligação for 1:1. Isso desafia todo o propósito de usar a equação 25 (duplo log).

No entanto, a equação 34 pode ser usada para contornar os problemas com a concentração de supressor livre desconhecida para a equação 25, mas precisará ser modificado para uso nas equações 21, 22 e 29 de acordo com esta nova equação abaixo (equação 35):

$$[L_{free}] = [L_{added}] - \frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} * [P_t] \quad (35)$$

As equações 33 e 34 também mostram que com $[Q_{added}] \gg [P_t]$, $[Q_{added}] \approx [Q_{livre}]$.

Outros métodos podem ser usados, como a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) ou o método de variação contínua (comumente conhecido como gráfico de Job), que pode fazer uso de mudanças na fluorescência após a complexação. Resumidamente, o gráfico de Job consiste em manter uma concentração total constante, enquanto varia a razão molar do ligante e do receptor. Assumindo que o complexo produz um parâmetro mensurável, por exemplo, uma mudança na fluorescência ou na absorbância, então o pico da mudança observada indicará a estequiometria preferencial para a interação molecular (Olson e Bühlmann, 2011). [

$$F_c = (F_0 \cdot P) + (F_L \cdot L) - F_M \quad (36)$$

onde F_c é a mudança na fluorescência, F_0 é a fluorescência da proteína não ligada, P é a razão da proteína para a concentração total da amostra, F_L é a fluorescência do ligante não ligado, L é a razão do ligante para a concentração total da amostra e F_M é a fluorescência medida [Condict, 2022]. É claro que também existem limitações para o gráfico de Job que requer que a constante de dissociação seja igual ou idealmente uma ordem de grandeza menor que a concentração molar total dos dois reagentes [Ingham, 1975].

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 (equação 36) [Lakowicz, 1999; Weert, 2010]:

$$F_{corr} = F_{obs} * 10^{\frac{A_{exc} + A_{em}}{2}} \quad (37)$$

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 37 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 e Lenci, 2013; Condict, 2022]

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

$$F_{corr} = \frac{F_{obs}}{10^{-Ad}} \quad (38)$$

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 *et al.*, 1983].

Armadilha 5: Extinção estática devido a alterações estruturais

A ligação do ligante pode alterar a conformação da proteína e, assim, alterar o microambiente local ao redor do(s) fluoróforo(s) intrínseco(s), o que significa que (parte) da extinção observada pode realmente ser causada por essas mudanças. Isso complica algumas análises posteriores, onde os fluorófilos assumem FRET como o mecanismo de extinção. [Weert, 2010]

Armadilha 6: Extinção estática devido à formação do complexo no estado fundamental

A formação do complexo no estado fundamental geralmente resulta em uma perda completa da fluorescência 'nativa', devido à formação de um novo sistema eletrônico com diferentes características de absorção. Essa hipótese de formação de um complexo no estado fundamental não pode ser usada no contexto do FRET [Weert, 2010].

Armadilha 7: Extinção estática devido à formação de um complexo de estado excitado/FRET

A formação de um complexo de estado excitado pode resultar na transferência de parte da energia excitada do fluoróforo (o doador) para um aceptor. O ligante pode atuar como tal aceptor, mas então a fluorescência do doador deve se sobrepor à absorbância do aceptor. Caso a absorbância na região de sobreposição entre espectro emissão esteja abaixo de (0,02) pode-se questionar a precisão dos cálculos de sobreposição usados para determinar a distância de Förster [Weert 2010].

1.5 A modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de novos fármacos

A modelagem molecular são aplicáveis desde átomos isolados a biomacromoléculas e compreende um número de ferramentas e métodos computacionais e teóricos que tem como objetivo entender e antecipar o comportamento de sistemas reais, e que são usadas para descrever e prever estruturas moleculares, propriedades do estado de transição, equilíbrio de reações, propriedades termodinâmicas, dentre outras, abrangendo alguns estudos, tais como, estudos de minimização da energia de moléculas, análise conformacional e simulações de dinâmica molecular.

A modelagem molecular pode auxiliar o processo conhecido como desenvolvimento de fármacos auxiliado por computadores (CADD, do inglês Computer-Aided Drug Design). Por envolver o uso de métodos computacionais, possui custo relativamente baixo, necessitando em geral no investimento somente nos computadores e, eventualmente, no acesso a programas. Apesar do baixo investimento é capaz de encurtar o tempo total desse processo. É possível utilizá-la em diversas etapas do desenvolvimento de um fármaco, como na identificação de candidatos a substâncias ativas (hits), otimização da atividade e melhora de perfis farmacocinético e farmacodinâmico [Prieto-Martínez, López-Lpoez, Juárez-Mercado e Medina-Franco, 2019; Batista, Farias, Simões e Nascimento-Júnior, 2022]

O método CADD para a proposição de novos fármacos pode seguir duas estratégias distintas. Uma centrada no planejamento de fármacos tendo como base a estrutura de um alvo

específico (SBDD, do inglês Structure Based Drug Design) ou a estratégia LBDD (do inglês Ligand Based Drug Design), onde o foco é a estrutura dos ligantes. Sempre que possível, é desejável usar mais de uma abordagem para chegar a conclusões consensuais, combinando as estratégias [Saldívar-González, Prieto-Martínez e Medina-Franco, 2017; Nascimento, Aquino e Silva-Júnior, 2022].

A modelagem pode ser usada para a triagem virtual, procedimento que permite indicar, dentre vários candidatos a ligantes, quais apresentariam potencialmente maior atividade sobre determinado alvo [Scotti *et al.*, 2007]. Dessa maneira, as pesquisas para a síntese de compostos bioativos, testes *in vitro* e *in vivo* podem ser feitos apenas com os candidatos que apresentaram melhor resultado nessas análises, alcançando-se assim economia de tempo e recursos.

A busca por programas gratuitos deve ser observada sempre que possível, assim potencializando o uso em projetos de CADD. Existem programas gratuitos e com reconhecida qualidade disponíveis a serem usados no planejamento ou na triagem virtual de substâncias [Gonzalez-Medina, Naveja, Sanchez-Cruz e Medina-Franco, 2017; Muhammed e Aki-Yalcin, 2024]

1.5.1 Diferentes métodos de modelagem molecular

Podemos dividir os métodos de modelagem molecular em dois grupos genéricos: os métodos clássicos, que abrangem a mecânica molecular e a dinâmica molecular; e os métodos quânticos, que incluem os métodos *ab initio*, Teoria Funcional da Densidade (DFT) e os semi-empíricos. Na escolha do método mais adequado, deve-se levar em consideração quais propriedades serão avaliadas, a precisão desejada e a capacidade computacional disponível para a realização dos cálculos [Sant'Anna, 2009].

É importante ressaltar que a modelagem molecular, para os fins práticos da Química Medicinal, deve estar sempre associada a resultados experimentais, isso porque é necessário que haja o trabalho de uma equipe multidisciplinar, em que os métodos computacionais serão empregados de modo integrado para facilitar e otimizar todo o processo de desenvolvimento de compostos bioativos, tendo em vista a grande complexidade de todo esse processo [Sant'Anna, 2009]

1.5.1.1 Docagem em modelagem molecular (*Docking*)

A docagem molecular (também conhecida por outros nomes, como *molecular docking*, atracamento, ancoramento, ancoragem e acoplamento) tem sido bastante explorada no processo

de descoberta de fármacos, incluindo triagem virtual em larga escala, estudo de hipóteses de modos de interação, otimização de ligantes, dentre outros [Batista, Farias, Simões e Nascimento-Júnior, 2022]

A docagem molecular é bastante utilizada dentro da estratégia SBDD, pois a técnica que permite avaliar interações promissoras entre possíveis ligantes e sítios de interação de alvos conhecidos (geralmente enzimas e receptores celulares), permitindo a proposição das geometrias de interação de complexos ligante/proteína. Ela possibilita a previsão das orientações e conformações (poses) de moléculas (ligantes) mediante suas interações com sítios de um alvo, formando assim complexos estáveis ligante-alvo [Sant'Anna, 2009; Khamis, Gomaa e Ahmed, 2015].

As poses (conformações e orientações) do ligante são encontradas por algoritmos de busca, e a classificação dessas soluções é considerada em termos de afinidade pelo sítio de ligação via funções de pontuação (ou funções de escore), fornecidos pelos programas [Amutha, Sangeetha e Muthukumaran, 2021; Barreiro e Fraga, 2015; Silakari e Singh, 2021]. Por sua vez, os valores numéricos obtidos pelas funções de pontuação são decorrentes da modelagem das interações, que ocorrem durante a formação de complexos estáveis [Sant'Anna, 2009; Amutha, Sangeetha e Muthukumaran, 2021].

Essa classificação pode ser obtida de diferentes formas, como calculando-se quantidades que se aproximam da energia livre de ligação para cada pose de ligante, mas com muitas simplificações, como o uso de uma estrutura alvo rígida (ou semirrígida) e previsões simplistas de entropia, entre outros. Entretanto, mesmo com tais aproximações, algumas funções de pontuação são capazes em alguns casos de funcionar muito bem quando comparadas a procedimentos que são muito mais exigentes computacionalmente [Casbarra e Procacci, 2021; Batista, Farias, Simões e Nascimento-Júnior, 2022].

Em relação aos algoritmos de busca, se tem pelo menos duas categorias: sistemática e estocástica [Morris e Lim-Wilby, 2008]. Os algoritmos de busca “*sistemáticos*” são determinísticos, modelam o espaço de busca em intervalos limitados (predefinidos). Os algoritmos *estocásticos* amostram o espaço de busca por alterações aleatórias nas variáveis de estado até que o critério de término seja atendido [Barreiro e Fraga, 2015; Morris e Lim-Wilby, 2008].

Entre os métodos estocásticos, podem ser destacados os algoritmos genéticos (AG) [Morris e Lim-Wilby, 2008; Li, *et al.*, 2015], que recebe esse nome por mimetizar o processo de

evolução natural e que são bastante eficientes na resolução de problemas com grande número de variáveis [Linden, 2006]. O AG otimiza as soluções encontradas em um processo contínuo e a rotina é concluída após o desenvolvimento de um número adequado de gerações, parâmetro que pode ou não ser definido pelo usuário [Da Costa Filho e Poppi, 1999; Batista, Farias, Simões e Nascimento-Júnior, 2022].

Os dois fatores que podem dificultar a descrição das interações entre o ligante proposto e a proteína são a flexibilidade das estruturas da molécula deste ligante e da proteína, pois estes sofrem mudanças conformacionais durante a interação, e as moléculas de água que cercam tanto o ligante como o sítio de interação da proteína e que devem ser deslocadas quando as duas moléculas vão interagir. Esses parâmetros podem ser incluídos no modelo, mas representam um custo computacional adicional que deverá ser considerado na análise da relação custo/benefício do modelo disponível que será adotado [Sant'Anna, 2009].

Um programa de docagem tido como ideal deve ter a capacidade de reproduzir o modo de interação de ligantes identificado experimentalmente, geralmente por cristalografia de raios-X ou criomicroscopia eletrônica. Para testar isso, é feito um procedimento de *redocagem* em que o ligante é removido da estrutura cristalográfica do complexo ligante-proteína, e novamente inserido no sítio ativo utilizando-se o programa de docagem. Faz-se então uma comparação entre os modos de ligação experimental e de docagem, determinando-se a raiz do desvio médio quadrático (RMSD - do inglês, *root mean square deviation*), sendo que a predição do modo de interação é considerada bem-sucedida quando o RMSD está abaixo de um valor, usualmente de 2,0 Å [Verdonk *et al.*, 2003], embora um critério mais realista seria o uso da resolução da estrutura experimental.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como meta central estudar a interação entre novos compostos triazólicos e a albumina sérica humana, a fim de verificar sua viabilidade como veículo destes candidatos a fármacos na terapia contra a doença de Chagas.

2.2. Objetivo Específico

- Certificar que a metodologia já dominada e largamente utilizada pelo grupo seria aplicável para o projeto pretendido, adaptando-a caso necessário, uma vez que os compostos devem possuir características que permitam análises de fluorescência, base para esse estudo;
- Observar, teoricamente, se utilizando da modelagem molecular, as interações envolvidas nos processos de complexação ASH/ligante;
- Estudar a interação entre a ASH e os compostos eleitos, via técnicas espectroscópicas de absorção no ultravioleta/visível (UV/Vis), fluorescência e dicroísmo circular;
- Através das análises anteriores, obter os parâmetros físico-químicos de K_a , K_{sv} , K_q , K_b , n , heliopolaridade- α , ΔG° , ΔH° e ΔS° ;
- Observar, experimentalmente, através das técnicas espectroscópicas, se as interações observadas no modelo teórico (modelagem molecular) são confirmadas neste modelo.

3 Parte Experimental

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Materiais: Vidraria

Todo o material de vidro utilizado nos processos de preparação e na manipulação das amostras foi limpo seguindo a sequência e o rigor do 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.

3.1.2 Materiais: Reagentes e Solventes

Todos os materiais e produtos químicos usados neste estudo eram de grau analítico.

- Água grau Milli-Q foi usada em todos os experimentos e foi obtida através de aparelho DIRECT-Q, modelo MILLIPORE, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LBBMA-UFRJ).
- O metanol de grau espectroscópico foi obtido da Tedia (Fairfield, OH, EUA) e usado para preparar soluções de estoque de ligantes na concentração de 10^{-3} M.
- A ASH, a varfarina e o ibuprofeno foram adquiridos da Sigma Aldrich, EUA. A solução de ASH ($1,0 \times 10^{-5}$ M) foi preparada em solução tamponada com fosfato (Sachês de PBS, adquiridos junto a Aldrich, pH 7,4) e mantida no escuro a 0-4°C. A concentração de ASH foi estimada espectrofotometricamente usando a absorvidade molar $\varepsilon = 35700 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 280 nm em PBS [Chatterjee, *et al.*, 2012].
- As N₄-substituídas-1,2,4-triazol-3-tionas (19b-e) foram sintetizadas seguindo literatura anterior [Franklin, 2013; Franklin, 2019] e sua estrutura química correspondente foi determinada por ressonância magnética nuclear de 1 H (1 H NMR) [Castro, 2021]. A pureza de **19b-e** (maior que 95%) foi determinada por análise de cromatografia líquida de alta eficiência [Castro, 2021].

3.1.3 Aparelhos e métodos

Os espectros de fluorescência UV-vis e de estado estacionário foram registrados em um fluorômetro Jasco J-815 (Easton, MD, EUA) usando uma célula de quartzo (caminho óptico de 1,00 cm) e empregando um suporte de cubeta termostática Jasco PFD-425S15F. Para excitação e emissão, a largura da fenda foi mantida em 5 nm e a velocidade de varredura foi definida para 100 nm/min. A concentração de ASH foi mantida constante em $1,0 \times 10^{-5}$ M, enquanto a concentração total do ligante foi variada de 0 a $1,32 \times 10^{-5}$ M durante os experimentos de absorção e fluorescência, adaptando a metodologia de Yadav, 2019 [Yadav e Yadav, 2019; Yadav, et al., 2019]. Os estudos de fluorescência foram realizados com um comprimento de onda de excitação de 295 nm para excitar seletivamente o resíduo de triptofano. O espectro foi registrado entre 310 e 550 nm a 305, 310 e 315 K (essas temperaturas não desnaturaram a estrutura da albumina) [Mohan et al., 2018; Matsarskaia et al., 2020]. Os espectros de absorção UV-vis foram registrados na faixa de 200–500 nm a 310 K para as soluções dos ligantes em diferentes concentrações em PBS – concentração total do ligante de (0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15; e $1,32 \times 10^{-5}$ M.

O espectrofluorímetro modelo FL920 CD (Edinburgh Instruments Ltd, Livingston, Reino Unido) foi usado para obter os decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo ($\lambda_{exc} = 280 \pm 10$ nm). Os decaimentos correspondentes foram obtidos para a solução de ASH ($1,0 \times 10^{-5}$ M) sem e na presença de cada tripanocida 1,2,4-triazolo-3-tiona em estudo à temperatura ambiente (298 K) na mesma faixa de concentrações totais de ligantes usadas nas medições de fluorescência UV-vis e em estado estacionário.

Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram medidos em um espetrômetro de CD JASCO-810 (Easton, MD, EUA) equipado com um suporte de célula termoestabilizado Jasco PFD-425S15F a 310 K. Uma célula de quartzo de caminho de 10 mm foi usada, e a faixa espectral foi de 200-250 nm para diferentes proporções molares de ASH/ligante (1:0, 1:4 e 1:8), com concentração fixa de ASH a 10^{-6} M. Cada espectro foi obtido a uma velocidade de varredura de 200 nm/min após três acumulações, tempo de resposta de 1 s e corrigido com a linha de base correspondente.

Os dados de intensidade de fluorescência em estado estacionário foram corrigidos pela Equação 36 para remover o efeito do filtro interno [Lakowicz, 1999; Weert, 2010], onde F_{corr} e F_{obs} representam as intensidades de fluorescência corrigidas e observadas, respectivamente. A_{ex} e A_{em} representam a absorbância de soluções de proteína-ligante em comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente. Para elucidar as forças de ligação, parâmetros

termodinâmicos, bem como o mecanismo de extinção, medições de extinção de fluorescência em estado estacionário foram registradas a 305, 310 e 315 K.

3.2 Tratamento de fluorescência em estado estacionário

Entre as várias técnicas disponíveis para analisar a interação ligante-proteína, a espectroscopia de fluorescência em estado estacionário tem sido amplamente utilizada para caracterizar a interação de uma proteína fluorescente com um ligante [Chaves et al., 2015; Chaves, et al., 2016; Huang et al., 2016; Chaves, Mathew e Joy, 2018; Chaves, et al., 2018; Chaves et al. 2018b; Lopes et al., 2018; Acunha, Chaves e Iglesias, 2021; Soares et al., 2024; Moreira, 2024; Costa-Tuna et al., 2024]. A equação de Stern-Volmer (Equação 17) pode ser usada para interpretar o provável mecanismo de extinção de fluorescência de um fluoróforo induzido por supressores – mecanismos estáticos e/ou dinâmicos.

Durante a extinção dinâmica, o supressor absorve, de forma não radiativa, a radiação do analito excitado, causando uma diminuição na intensidade da fluorescência. Isso pode ser demonstrado pela razão das intensidades de fluorescência na ausência e presença do supressor $[F_0/F]$, por meio da relação de Stern-Volmer [Lakowicz, 2006], onde F_0 e F representam a intensidade de fluorescência de ASH na ausência e presença de supressor, respectivamente, k_q é a constante de taxa de supressão bimolecular, τ_0 é a média do tempo de vida de fluorescência para albumina não ligada (5,25 ns, obtida experimentalmente neste trabalho), $[Q]$ é a concentração de equilíbrio do supressor determinada seguindo o procedimento da literatura [Moreno et al., 2022], e K_{sv} é a constante de supressão de Stern-Volmer [Montalti et al., 2006].

A equação 17 ainda pode ser modificada para a chamada aproximação de logaritmo duplo de Stern-Volmer, assim abordando um cenário de interação do ligante com vários sítios na proteína e introduzindo número de estequiometria de ligação (n). Isso é representado matematicamente através da equação abaixo (equação 39):

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log K_b + n\log[Q] \quad (39)$$

onde n representa a estequiometria de ligação (número de sítios de ligação) e K_b é a constante de ligação [Lakowicz, 2006].

Como é notório, a equação 39 é uma equação do primeiro grau, ou seja $y = b + ax$, logo um gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs. $\log[Q]$ produz uma linha reta, cuja inclinação pode ser usada para estimar os valores de n, enquanto a interceptação no eixo Y pode ser usada para determinar $\log K_b$, como pode ser observado na figura 77. É importante destacar que as medições de

fluorescência resolvidas no tempo obtidas para ASH:**19b-e** (seção 4.2) indicaram que não há um mecanismo de extinção puramente estático, portanto, uma combinação de mecanismos de extinção estáticos e dinâmicos é esperada, e a aproximação de logaritmo duplo modificada não foi considerada [Kou *et al.*, 2020].

A relação Stern-Volmer também pode ser modificada para resolver os resíduos acessíveis e inacessíveis ao extintor, por intermédio da equação 29, onde já foram definidos que K_a e f são a constante de extinção de Stern-Volmer da fração acessível e a fração da fluorescência inicial que é acessível ao extintor, respectivamente [Lakowicz, 2006].

Interações não covalentes, por exemplo, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, desempenham papéis importantes na ligação entre ligantes e ASH. Parâmetros termodinâmicos, como a mudança de entalpia padrão (ΔH^0), mudança de energia livre de Gibbs padrão (ΔG^0) e mudança de entropia padrão (ΔS^0) associados ao processo de ligação podem fornecer informações adicionais sobre o modo de interação. Os valores de ΔH^0 e ΔS^0 podem ser calculados a partir da equação de Van't Hoff (Equação (40)).

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (40)$$

onde K_a é a constante de extinção de Stern-Volmer da fração acessível, obtida com a equação de Stern-Volmer modificada (equação 28), enquanto R representa a constante universal dos gases ($8,3145 \text{ J.mol}^{-1} \text{ .K}^{-1}$). O valor padrão da energia livre de Gibbs pode então ser obtido pela equação 41.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (41)$$

3.3 Tratamento de dicroísmo circular (DC)

Os dados brutos de DC em elipticidade (Θ_{obs} , em mg, na faixa de 200-250 nm) foram normalizados e expressos como o peso médio do resíduo ($[\Theta]_{\text{MRW}}$), em $\text{deg.cm}^2 \text{ .dmol}^{-1}$, definido como $[\Theta]_{\text{MRW}} = (\Theta_{\text{obs}} \times 10^{-3}) \times 100 \times \text{MW} / (l \times c \times \text{NAA})$, onde MW é o peso molecular da proteína, c é a concentração da proteína em miligramas por mililitro, l é o comprimento do caminho da luz em centímetros e NAA é o número de aminoácidos por proteína [Chaves *et al.*, 2023]. O conteúdo da estrutura secundária (α -hélice, antiparalela, volta e outras) a 310 K foi estimado usando o servidor online BestSel (Beta Structure Selection <https://bestsel.elte.hu/index.php>) [Micsonai *et al.*, 2018].

3.4 Ensaios de deslocamento de fármacos

Ensaios de deslocamento de fármacos foram conduzidos para identificar o principal sítio de ligação da albumina com os compostos **19b-e**. Varfarina e ibuprofeno foram usados como marcadores de sítio para o sítio I e II de Sudlow, respectivamente [Ghuman et al., 2005; Yang, Zhang e Liang, 2014]. Uma concentração fixa de $1,0 \times 10^{-5}$ M foi usada para as sondas e soluções de albumina. Medições de fluorescência em estado estacionário foram conduzidas sob o mesmo protocolo descrito para a ligação ASH:**19b-e**, e os valores de K_a foram obtidos por meio da equação de Stern-Volmer modificada (Equação 29).

3.5 Modelagem molecular

Um procedimento de docagem molecular usando o programa GOLD 2022.3.0 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, CB2 1EZ, Reino Unido) foi empregado para avaliar no nível molecular os prováveis modos de ligação dos derivados **19b-e** com a ASH. Com base nos resultados de deslocamento de fármacos, este estudo usou duas estruturas cristalográficas diferentes de ASH do Protein Data Bank (PDB): uma contendo uma molécula de varfarina cocristalizada localizada no sítio I de Sudlow (código de acesso 2BXD, resolução 3,05 Å) [Ghuman et al., 2005] e a outra contendo diazepam localizado no sítio II de Sudlow (código de acesso 2BXF, resolução 2,95 Å) [Ghuman et al., 2005]. Devido à presença de algumas cadeias laterais de aminoácidos incompletas, as estruturas cristalográficas de ASH precisaram de algum nível de correção realizada com o programa Swiss-PDB Viewer 4.1.0 [Guex, 1997], antes de serem usadas no estudo de docagem molecular. Átomos de hidrogênio foram adicionados às proteínas com programa GOLD 2022.3.0 (CCDC), que considera no processo as formas tautoméricas e os estados de ionização dos átomos dos resíduos de aminoácidos (Asp e Glu na forma aniónica, desprotonada, e Lys e Arg na forma catiônica, protonada).

As estruturas moleculares dos ligantes foram construídas e tiveram suas energias minimizadas com o método semi-empírico PM6 [Stewart, 2007] disponível no programa Spartan'24 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, EUA). As estruturas dos ligantes foram então gravadas no formato de arquivo Sybyl (mol2) e, antes de usá-las no estudo de docagem molecular com o programa GOLD, foi realizada uma análise cuidadosa da definição de ligações e tipos de átomos, seguida de correções, conforme necessário. Um estudo de redocagem foi realizado para definir qual função de aptidão seria a mais adequada para cada sítio de ligação

em ASH. A escolha foi feita observando os valores da raiz do desvio quadrático médio (RMSD) entre as poses dos ligantes cocristalizados obtidas experimentalmente e por docagem. As pontuações de aptidão fornecidas pelo programa são calculadas como o negativo da soma de uma série de termos de energia envolvidos na interação proteína-ligante, de modo que quanto mais positiva a pontuação, melhor será a interação prevista.

Para o estudo de docagem, um sítio de ligação de raio de 12 Å foi definido a partir de resíduos selecionados localizados nos sítios de ligação de Sudlow (Leu238 para 2BXD e Leu453 para 2BXF). O número de operações do algoritmo genético (cruzamento e mutação) usado foi de 100.000, o que é indicado para ligantes grandes e altamente flexíveis. Os ângulos de torção dos grupos hidroxila Ser, Thr e Tyr e do grupo amino da cadeia lateral Lys foram otimizados durante o procedimento de docagem. Em cada caso, foram selecionadas as poses de maior pontuação dentre as geradas ao final do procedimento de docagem.

O servidor PLIP (Protein-Ligand Interaction Profile) (https://plip-tool.biotech.tu-dresden.de/plip-web/plip/ind_ex) foi usado para análise do perfil de interação apresentado por cada composto nos complexos das mel [Adasme et al., 2021]. As representações gráficas das poses com maiores pontuações foram geradas pelo programa de acesso público PyMOL 0.99rc6 (Delano Scientific LLC, Schrodinger, Nova York, NY, EUA).

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise de espectroscopia no UV-Vis

Os compostos **19b-e** avaliados nesse estudo foram preparados em um trabalho anterior realizado por Castro em colaboração com o grupo do Prof. Marco Edilson Freire de Lima (DQO – UFRRJ) [Castro, 2021]; eles fazem parte de um conjunto de compostos planejados para atuarem como inibidores da CYP51 de *T. cruzi*, dos quais os mais promissores foram sintetizados, purificados e inequivocamente caracterizados [Castro, 2021]. Esses derivados apresentaram atividades contra as formas epimastigotas (IC_{50} entre 10,41 e 31,04 μM) e tripomastigotas (IC_{50} entre 6,13 e 27,59 μM) de *T. cruzi*, além de baixa citotoxicidade em células de primatas [Castro, 2021].

Os espectros de absorção UV-vis comparativos dos compostos **19b-e** em PBS (pH 7,4) são mostrados nas figuras 78 a 81; as propriedades de absorção correspondentes são resumidas na Tabela 7. Todos os compostos estudados mostraram absorção máxima na faixa de 275-400 nm da região UV; com o máximo em torno de 350 nm, assim como nenhuma mudança foi observada na localização do máximo de absorção ou mudança de comprimento de onda associada. Os valores do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para esses compostos (Tabela 7) indicam que as transições eletrônicas são permitidas pela simetria do spin e podem estar relacionadas a um processo de excitação $\pi-\pi^*$.

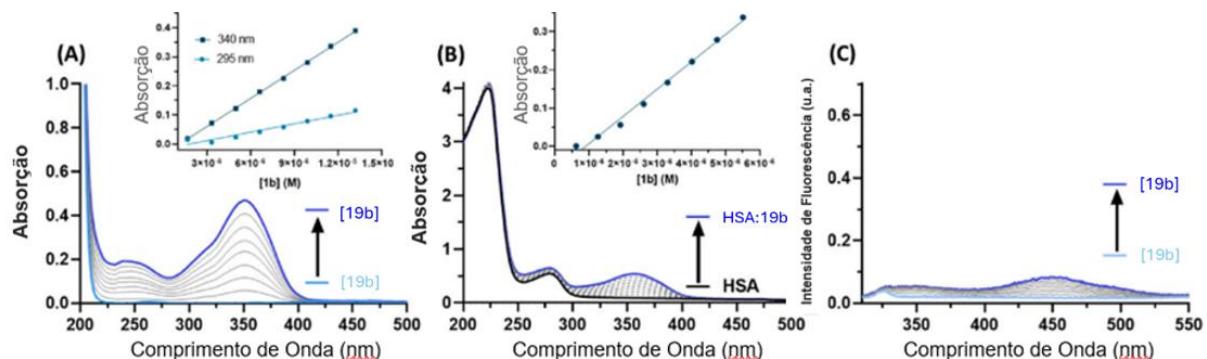


Figura 78: (A) Espectros na região UV-vis para 19b em PBS (pH 7,4) em diferentes concentrações de ligante. (B) Espectros na região UV-vis para ASH:19b em PBS (pH 7,4). (C) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para 19b em PBS na faixa de 300-550 nm. $[\text{ASH}] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[19b] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6} \text{ M}$ (para o UV-vis no equilíbrio ligado à albumina) e $[19b] = (0,17, 0,33, 0,50, 0,66, 0,83, 0,99, 1,15 \text{ e } 1,32) \times 10^{-5} \text{ M}$ (concentração total do ligante usada nas medições de fluorescência em estado estacionário).

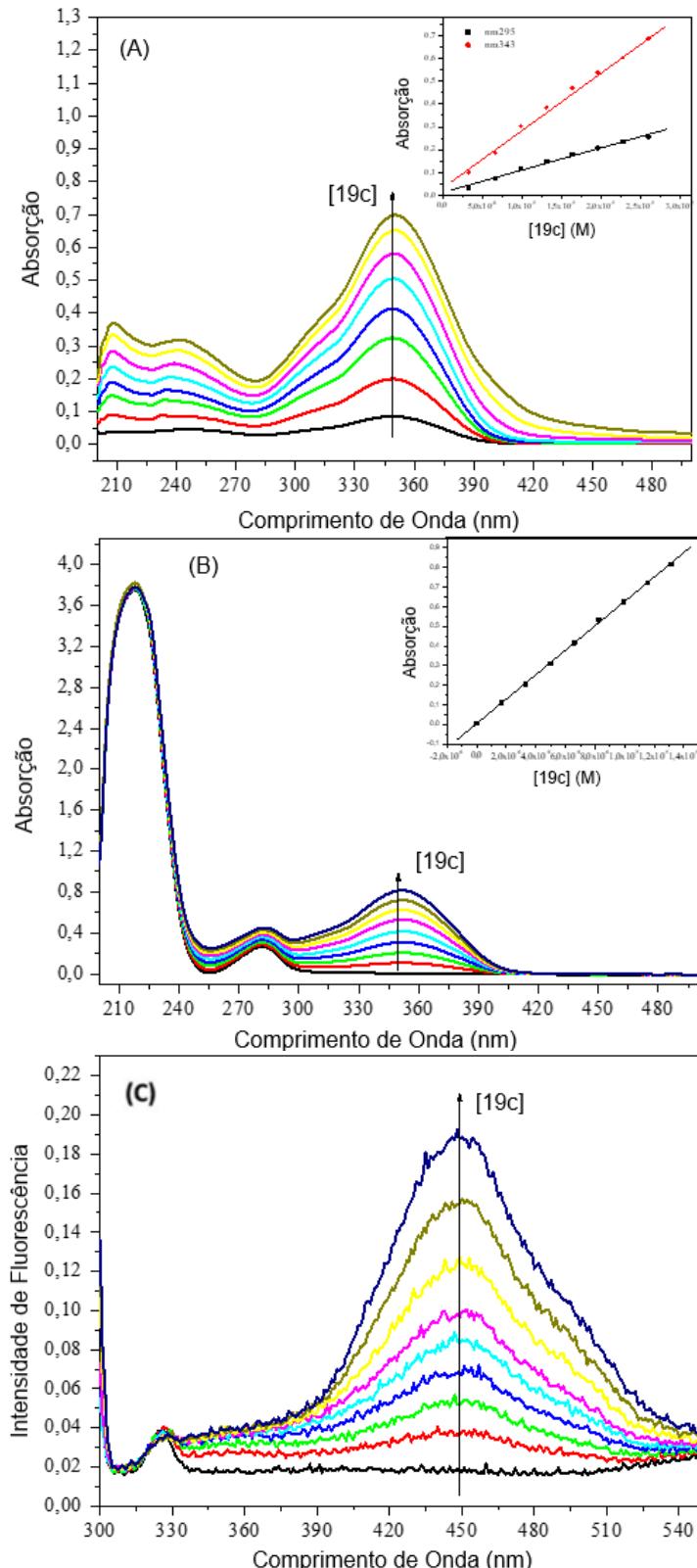


Figura 79: (A) Espectros na região UV-vis para 19c em PBS (pH 7,4) em diferentes concentrações de ligante. (B) Espectros na região UV-vis para ASH:19c em PBS (pH 7,4). (C) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para 19c em PBS na faixa de 300-550 nm. $[ASH] = 1,0 \times 10^{-5}$ M, $[19c] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6}$ M (para o UV-vis no equilíbrio ligado à albumina) e $[19c] = (0,17, 0,33, 0,50, 0,66, 0,83, 0,99, 1,15 \text{ e } 1,32) \times 10^{-5}$ M (concentração total do ligante usada nas medições de fluorescência em estado estacionário).

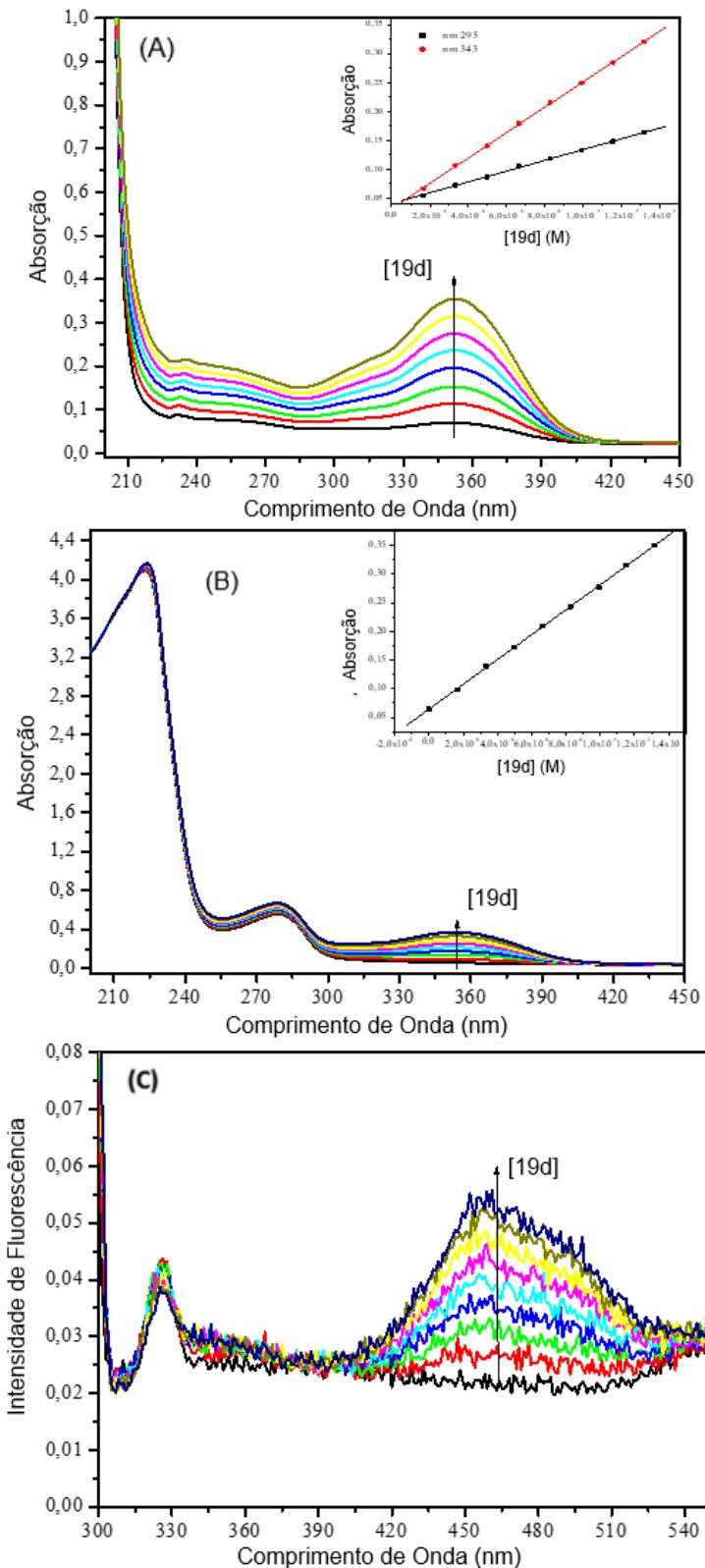


Figura 80: (A) Espectros na região UV-vis para 19d em PBS (pH 7,4) em diferentes concentrações de ligante. (B) Espectros na região UV-vis para ASH:19d em PBS (pH 7,4). (C) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para 19d em PBS na faixa de 300-550 nm. $[ASH] = 1,0 \times 10^{-5}$ M, $[19d] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6}$ M (para o UV-vis no equilíbrio ligado à albumina) e $[19d] = (0,17, 0,33, 0,50, 0,66, 0,83, 0,99, 1,15 \text{ e } 1,32) \times 10^{-5}$ M (concentração total do ligante usada nas medições de fluorescência em estado estacionário).

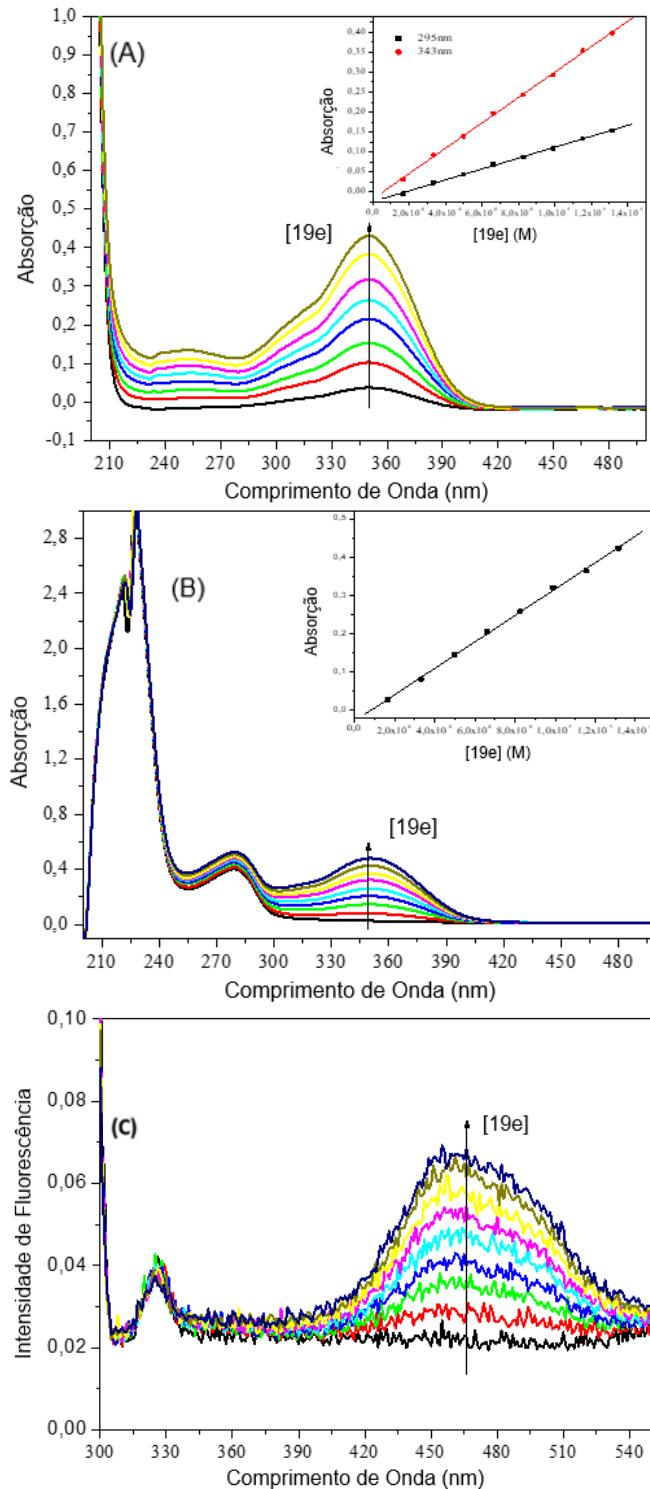


Figura 81: (A) Espectros na região UV-vis para 19e em PBS (pH 7,4) em diferentes concentrações de ligante. (B) Espectros na região UV-vis para ASH:19e em PBS (pH 7,4). (C) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para 19e em PBS na faixa de 300-550 nm. $[ASH] = 1,0 \times 10^{-5}$ M, $[19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6}$ M (para o UV-vis no equilíbrio ligado à albumina) e $[19e] = (0,17, 0,33, 0,50, 0,66, 0,83, 0,99, 1,15 \text{ e } 1,32) \times 10^{-5}$ M (concentração total do ligante usada nas medições de fluorescência em estado estacionário).

Tabela 7: Dados de absorvidade molar (ϵ) para os compostos 1b-e a 295 e 340 nm em PBS

Composto	$\epsilon_{295\text{nm}} \times 10^4$ (cm $^{-1}$ M $^{-1}$)	$\epsilon_{340\text{nm}} \times 10^4$ (cm $^{-1}$ M $^{-1}$)
19b	9650	32164
19c	9343	21951
19d	9786	25185
19e	13604	31705

A medição da absorção UV-vis é um método simples para explorar mudanças estruturais de proteínas e identificar a formação do complexo ligante-proteína no estado fundamental. A banda máxima em torno de 210 nm está associada à conformação da estrutura polipeptídica. Bandas em torno de 280 nm estão relacionadas a transições $\pi-\pi^*$ de resíduos aromáticos, ou seja, triptofano, fenilalanina e tirosina, então quando o ambiente químico ao redor desses resíduos aromáticos em ASH é alterado, a posição e a intensidade das bandas de absorção também podem mudar [Vishwas et al., 2011; Suryawanshi et al., 2012]. O processo de interação do estado fundamental entre 19b e ASH foi investigado usando espectros de absorção na região UV-vis (faixa de 200-500 nm) (figura. 78B). Os resultados desses estudos mostram um aumento nas bandas de absorção em 280 nm com o aumento da concentração do ligante, indicando a provável formação de um complexo entre ASH e **19b**. O mesmo padrão é observado nas análises análogas dos demais compostos.

Nos gráficos de emissão de fluorescência dos compostas **19b-e** em PBS (figuras 78, 79, 80 e 81), na faixa de 330 a 550 nm, é possível observar e emissão de fluorescência, uma vez que eles apresentam deslocada da região máxima de fluorescência da ASH (330nm), indicando a viabilidade de experimentos de extinção de fluorescência para os compostos.

4.2. Análise dos resultados envolvendo a equação de Stern-Volmer

A espectroscopia de fluorescência em estado estacionário pode ser usada para monitorar perturbações em ASH após a ligação do ligante. Essa interação pode resultar em mudanças em sua posição ou orientação e, consequentemente, alterar sua exposição ao solvente, levando a uma diminuição no rendimento quântico de fluorescência do resíduo Trp214, quando excitado a 295 nm. As figuras 82A-82D descrevem a emissão de fluorescência em estado estacionário de ASH ($1,0 \times 10^{-5}$ M) e sua extinção de fluorescência após adições sucessivas de **19b-e** (respectivamente) a 310 K. Os compostos foram capazes de diminuir a emissão máxima de fluorescência de ASH ($\lambda_{\text{em}} = 343$ nm), indicando que eles exercem alguma influência no resíduo

Trp214. Além disso, o desvio para o azul observado no comprimento de onda do pico máximo de emissão para ASH após a ligação do ligante, por exemplo, 343 a 333 nm para ASH:19b, é indicativo de um aumento na hidrofobicidade ao redor do fluoróforo [Kragh-Hansen et al., 2001; Lu et al., 2022].

Em todos os espectros de extinção de fluorescência (figuras 82A-82D), há a formação de um ponto isosbético com o aparecimento de uma nova banda de emissão de fluorescência por volta da faixa de 400-550 nm. Como os compostos **19b-e** não têm uma emissão de fluorescência significativa nesta região sem a presença de albumina (como pode ser observado nas figuras 78-81c), esta é uma prova adicional da formação do complexo.

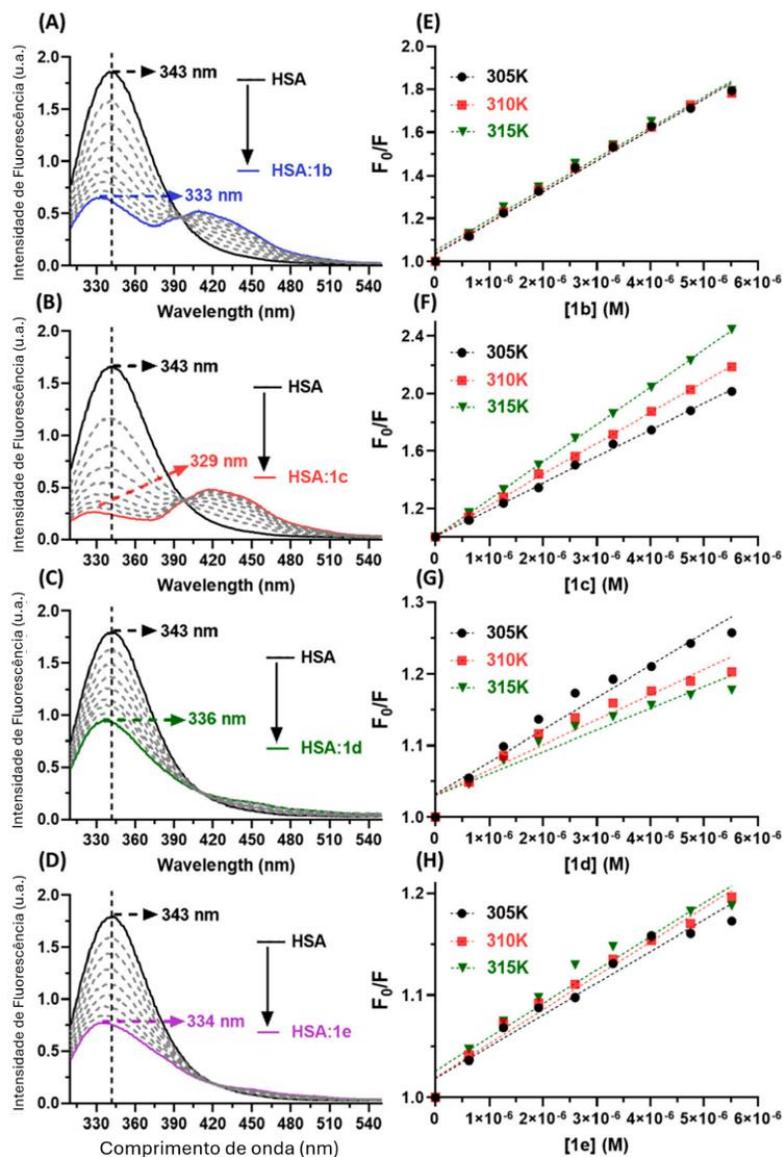


Figura 82: (A) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para ASH não ligado e sua extinção pelo aumento sucessivo de concentrações para (A) 19b, (B) 19c, (C) 19d, e (D) 19e em PBS (pH 7,4) a 310 K. (E, F, G, H) Os gráficos de Stern-Volmer correspondentes para a interação ASH:ligantes a 305, 310 e 315 K. $[ASH] = 1,0 \times 10^{-5}$ M, $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6}$ M (no equilíbrio ligado à albumina).

Medidas de fluorescência em estado estacionário também foram registradas com uma alta concentração dos compostos **19b-e** em relação ao ASH (Figura 83), o que demonstrou que 1,2,4-triazolo-3-tionas podem suprimir totalmente a fluorescência da albumina ($\lambda_{\text{max}} = 343 \text{ nm}$) e formar um exciplexo com ASH (aumentar a intensidade da fluorescência na faixa de 400-550 nm) [Lakowicz, 2006; Turro, 2008]. Este fenômeno é mais evidente para 19b e 19c do que para 19d e 19e, indicando o impacto dos grupos sulfeto e sulfóxido na assinatura espectroscópica da ligação dos compostos em estudo.

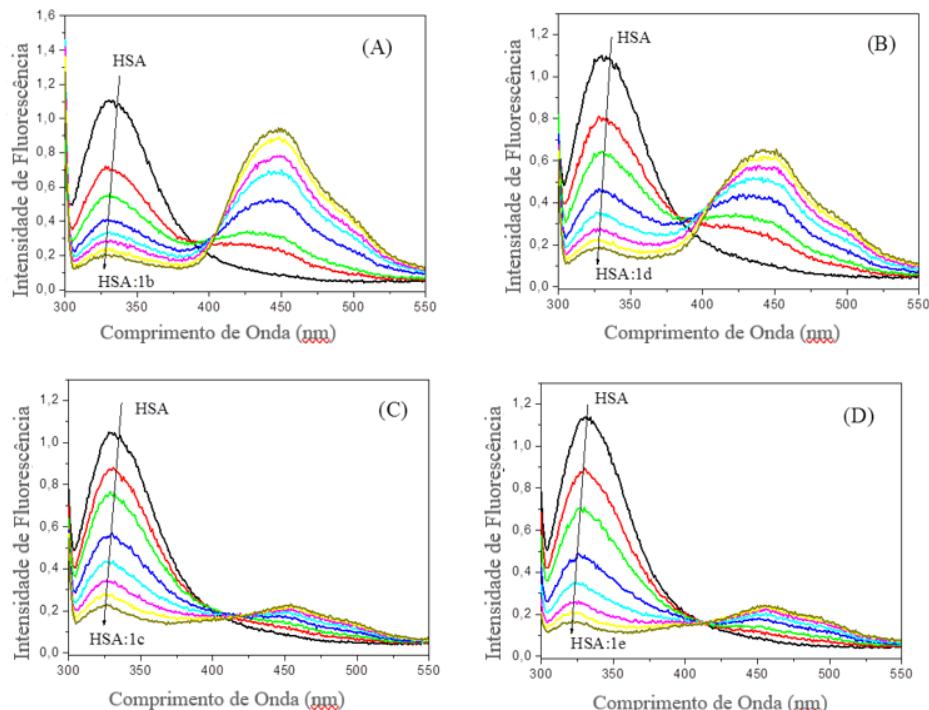


Figura 83: Espectros de fluorescência em estado estacionário para ASH não ligado e sua extinção apóis adições sucessivas de (A) 19b, (B) 19c, (C) 19d e (D) 19e em PBS (pH 7,4) a 310 K. $[\text{ASH}] = 1,00 \times 10^{-6} \text{ M}$, $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6} \text{ M}$ (no equilíbrio ligado à albumina).

A equação de Stern-Volmer (Equação 17) foi usada para entender o mecanismo de extinção de fluorescência. As curvas de Stern-Volmer (F_0/F versus $[Q]$) para a extinção da fluorescência de ASH pelos compostos 19b-e são mostradas na Fig. 82E-82H. Conforme resumido na Tabela 8, os valores da constante de taxa de extinção bimolecular (k_q) foram da ordem de $1012 \text{ a } 1013 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, maiores que a constante de taxa de difusão limitante em água ($k_{\text{dif}} \approx 5,00 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a 298 K) [Montalti et al., 2006], o que indica a formação de complexos entre ASH e os derivados de piperina e que o principal processo de extinção de fluorescência provavelmente ocorre por meio de um mecanismo estático.

As 1,2,4-triazolo-3-tionas 19b-e podem ser divididas em um grupo contendo sulfeto (19b e 19c) e um grupo contendo sulfóxido (19d e 19e). A presença de sulfeto no primeiro

grupo causou uma extinção de fluorescência mais forte da albumina do que no segundo. Isso foi refletido nos valores da constante de extinção de Stern-Volmer (K_{SV}) (Tabela 8) que para 19b e 19c são cerca de 10 vezes maiores do que para 19d e 19e, indicando que o mecanismo de extinção de fluorescência provavelmente não é puramente estático com diferenças na probabilidade de acesso do extintor ao fluoróforo (os gráficos de Stern-Volmer na Fig. 82E-82H apresentam um pequeno desvio em direção ao eixo X) [Chaves et al., 2023; Costa-Tuna et al., 2024]. Assim, decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo foram coletados com e sem 1,2,4-triazolo-3-tionas 19b-e na mesma concentração usada nas medições de fluorescência em estado estacionário.

Tabela 8: Constante de extinção de Stern-Volmer (K_{SV}), constante de taxa de extinção bimolecular (k_q), constante de extinção de Stern-Volmer da fração acessível (K_a), constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) para a interação entre ASH e ligantes 1b-e a 305, 310 e 315 K.

Compostos	T (K)	$K_{SV} \times 10^5 (M^{-1})$	R2	$k_q \times 10^{13} (M^{-1}s^{-1})$	$K_a \times 10^5 (M^{-1})$	f	R ²	n	R ²
19b	305	$1,44 \pm 0,05$	0,9969	2,74	$2,68 \pm 0,05$	$0,74 \pm 0,02$	0,9998	$0,88 \pm 0,01$	0,9994
	310	$1,43 \pm 0,05$	0,9951	2,73	$2,99 \pm 0,06$	$0,70 \pm 0,03$	0,9997	$0,85 \pm 0,02$	0,9988
	315	$1,42 \pm 0,06$	0,9932	2,72	$3,33 \pm 0,07$	$0,68 \pm 0,03$	0,9997	$0,82 \pm 0,01$	0,9987
19c	305	$2,93 \pm 0,06$	0,9984	5,58	$3,33 \pm 0,12$	$0,98 \pm 0,04$	0,9996	$0,96 \pm 0,02$	0,9991
	310	$3,39 \pm 0,05$	0,9993	6,47	$4,35 \pm 0,07$	$0,90 \pm 0,02$	0,9999	$0,94 \pm 0,01$	0,9997
	315	$4,11 \pm 0,04$	0,9997	7,83	$5,22 \pm 0,09$	$0,90 \pm 0,02$	0,9998	$0,95 \pm 0,01$	0,9996
19d	305	$0,23 \pm 0,02$	0,9815	0,44	$1,38 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,06$	0,9997	$0,73 \pm 0,03$	0,9960
	310	$0,18 \pm 0,02$	0,9730	0,34	$1,65 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,02$	0,9999	$0,67 \pm 0,02$	0,9955
	315	$0,15 \pm 0,02$	0,9675	0,29	$1,85 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,03$	0,9999	$0,64 \pm 0,03$	0,9947
19e	305	$0,15 \pm 0,01$	0,9829	0,29	$1,16 \pm 0,10$	$0,26 \pm 0,07$	0,9969	$0,75 \pm 0,04$	0,9935
	310	$0,16 \pm 0,01$	0,9913	0,31	$1,46 \pm 0,09$	$0,24 \pm 0,05$	0,9972	$0,72 \pm 0,02$	0,9985
	315	$0,16 \pm 0,01$	0,9786	0,30	$1,76 \pm 0,13$	$0,23 \pm 0,05$	0,9945	$0,67 \pm 0,02$	0,9971

A figura 84 descreve os decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo para ASH:**19b-e**, já a Tabela 9 resume os seus parâmetros de fluorescência. É perceptível que a forma dos decaimentos de fluorescência de ASH mudou drasticamente na presença de 19b e 19c, o que foi refletido na diminuição máxima dos valores médios de tempo de vida de fluorescência ($\tau_{average}$) em cerca de 2,18, 1,98, 0,27 e 0,74 ns para ASH:19b, ASH:19c, ASH:19d e ASH:19e, respectivamente (há diferenças nos gráficos de Stern-Volmer com base nos tempos de vida de fluorescência, τ_0/τ , Fig. 84A). Esta é uma evidência clara de que há uma combinação de mecanismos de extinção estáticos e dinâmicos [Lakowicz, 2006; Soares et al., 2024; Costa-Tuna et al., 2024], sendo o processo dinâmico mais eficiente para ASH:19b e ASH:19c do que para ASH:1d e ASH:1e. Esses resultados concordam com a formação detectada de uma associação exciplexo, principalmente para ASH:19b e ASH:19c, com um mecanismo de

transferência de energia (de fenômeno dinâmico) que permite a desativação do estado excitado por um processo radiativo [Lakowicz, 2006; Turro, 2008]

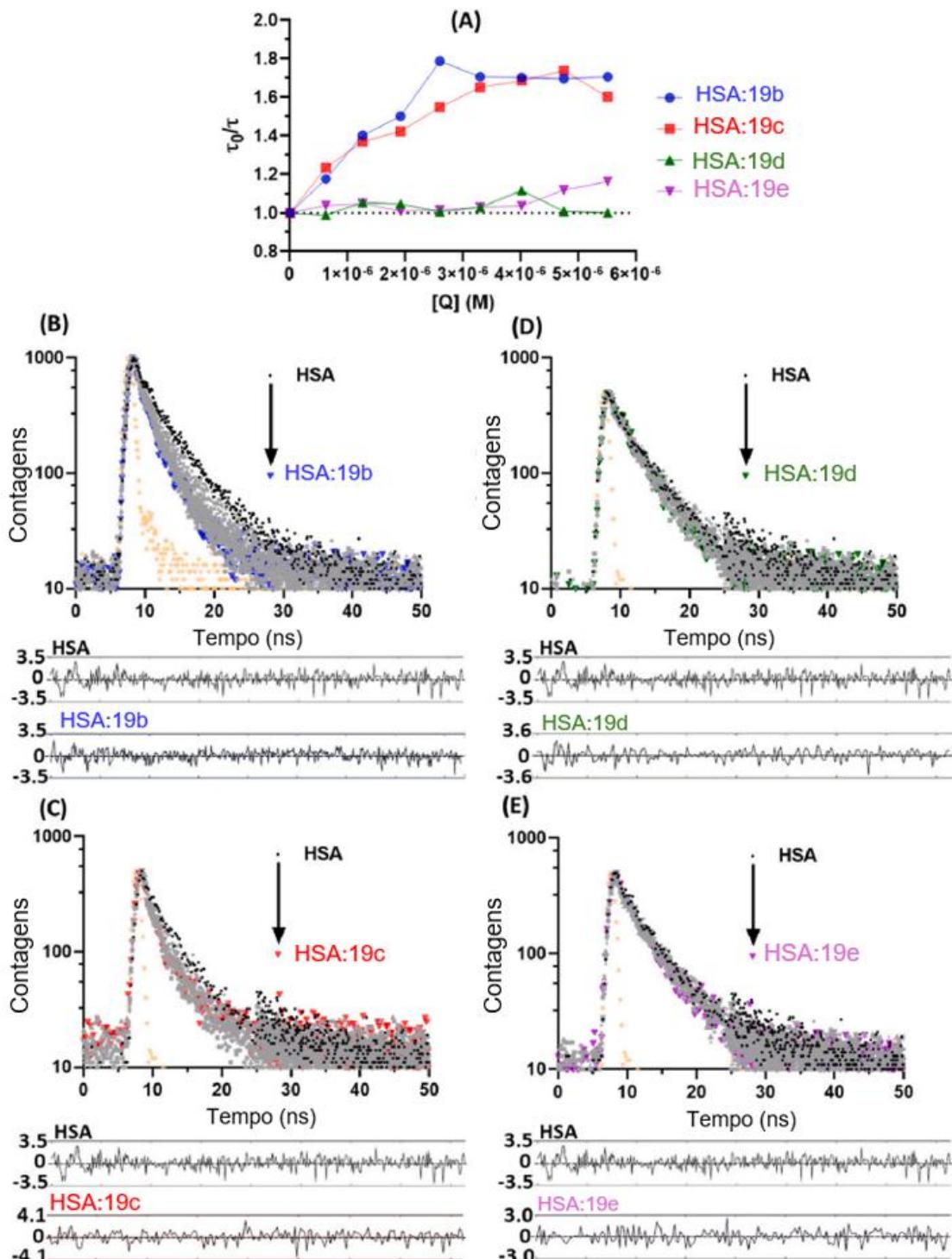


Figura 84: (A) Gráficos de Stern-Volmer baseados na média do tempo de vida da fluorescência para a ASH não ligada e ASH:ligante, à temperatura ambiente. Decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo para albumina sem e na presença de (B) 19b, (C) 19c, (D) 19d e (E) 19e. A função de resposta do instrumento (IRF) é representada como pontos laranja. Os resíduos sem e no máximo da concentração do supressor foram mostrados abaixo dos decaimentos. $[ASH] = 1,0 \times 10^{-5} M$, $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6} M$ (no equilíbrio ligado à ASH).

Tabela 9: Tempos de vida de fluorescência (τ_1 e τ_2), tempo de vida médio (τ_{average}) e contribuição relativa (% Rel) para ASH, ASH: **19b-e** à temperatura ambiente.

Compostos	[19b-e]×10 ⁵ (M)	τ_1 (ns)	%Rel (τ_1)	τ_2 (ns)	%Rel (τ_2)	τ_{average} (ns)	X^2
ASH	0,0	2,28	23,5	6,16	76,5	5,25	1,126
	0,17	1,82	33,9	5,81	66,1	4,46	1,442
	0,33	1,38	28,4	4,67	71,7	3,74	1,317
ASH:1b	0,50	1,63	42,3	4,86	57,7	3,49	1,277
	0,66	1,72	32,5	5,00	47,5	2,93	1,345
	0,83	1,04	24,1	3,72	75,9	3,07	1,364
	0,99	1,47	40,3	4,17	59,7	3,08	1,348
	1,15	1,70	52,2	4,62	47,7	3,09	1,191
	1,32	1,43	44,3	4,38	55,7	3,07	1,259
	0,17	1,51	27,6	5,30	72,4	4,25	1,253
	0,33	1,52	30,4	5,29	63,6	3,83	1,035
ASH:1c	0,50	1,25	31,3	4,79	68,7	3,68	1,077
	0,66	1,14	30,2	4,36	69,8	3,39	1,093
	0,83	0,92	22,2	3,82	77,8	3,18	1,067
	0,99	1,35	45,3	4,58	54,6	3,11	1,475
	1,15	1,35	43,8	4,32	56,2	3,02	1,137
	1,32	1,38	44,5	4,79	55,5	3,27	1,433
	0,17	2,74	39,5	6,98	60,5	5,30	1,161
	0,33	2,55	54,1	7,85	45,9	4,98	1,330
ASH:1d	0,50	3,52	64,0	7,68	36,0	5,02	1,018
	0,66	2,49	34,3	6,64	65,7	5,22	1,158
	0,83	1,96	22,4	6,42	72,6	5,10	1,381
	0,99	2,76	52,9	7,02	46,1	4,70	1,100
	1,15	2,69	45,6	7,45	53,4	5,21	1,336
	1,32	2,25	32,9	6,71	67,2	5,24	1,086
	0,17	1,99	17,6	5,71	82,4	5,05	1,102
	0,33	1,89	19,0	5,73	81,1	5,00	1,113
ASH:1e	0,50	2,69	36,1	6,62	63,9	5,20	1,216
	0,66	2,12	25,0	6,19	75,0	5,17	1,221
	0,83	1,94	27,1	6,27	72,9	5,10	1,127
	0,99	1,65	19,4	5,89	80,6	5,07	1,040
	1,15	1,61	17,3	5,33	82,7	4,69	1,166
	1,32	2,70	51,1	6,41	48,9	4,51	1,100

4.3. Análise do duplo logaritmo e da equação de Stern-Volmer modificada

Como as medições de fluorescência em estado estacionário e as análises resolvidas no tempo indicaram que parte do fluoróforo não é totalmente acessível pelo supressor (não há um mecanismo de supressão de fluorescência puramente estático), a aproximação logarítmica dupla (Equação 25) foi usada apenas para determinar o número de sítios de ligação (n) e não para estimar a afinidade de ligação [Lakowicz, 2006]. A figura 85 descreve os gráficos logarítmicos

duplos, e os valores de n estão resumidos na Tabela 8. É observado que para todas as 1,2,4-triazolo-3-tionas em estudo, os valores de n foram próximos de 1,0, independentemente da temperatura, indicando que cada ligante interagiu com a ASH em uma proporção molar de 1:1 [Chaves et al., 2018; Lopes et al., 2018].

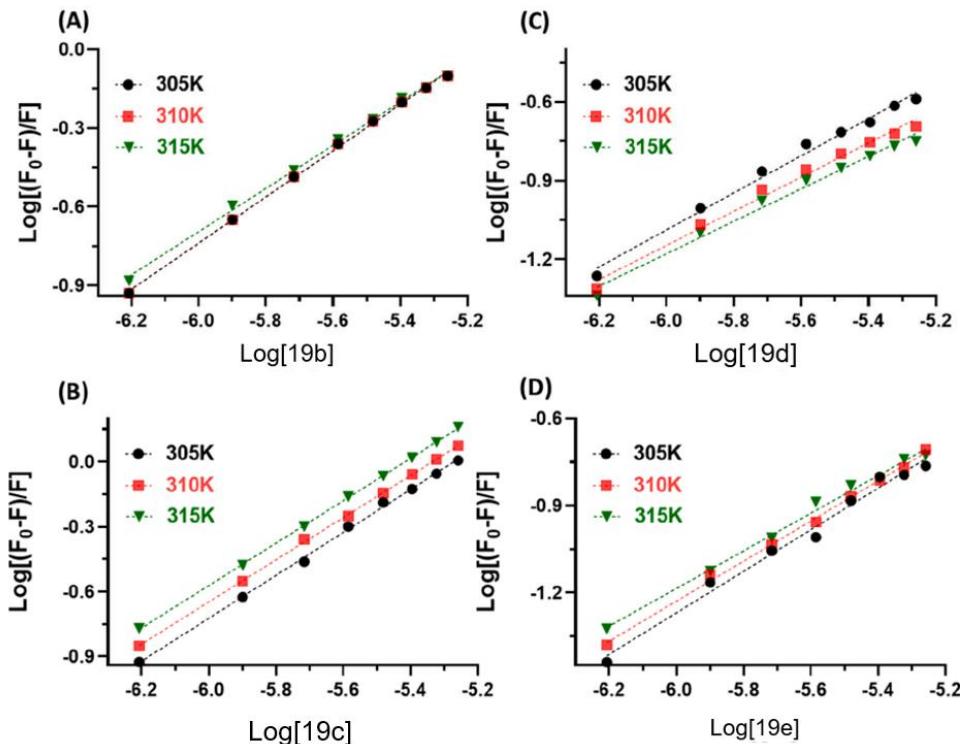


Figura 85: Gráfico logarítmico duplo para a interação entre ASH e (A) 19b, (B) 19c, (C) 19d e (D) 19e, em PBS (pH 7,4) a 305, 310 e 315 K. $[\text{ASH}] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6} \text{ M}$ (no equilíbrio ligado à albumina).

Os gráficos de Stern-Volmer modificados (Fig. 86A-86D) foram usados para obter a fração da fluorescência inicial que é acessível ao supressor (f) e a constante de supressão de Stern-Volmer da fração acessível (K_a) [Lakowicz, 2006]. Todos esses parâmetros estão resumidos na Tabela 8. Os valores de f obtidos para ASH:19b e ASH:19c são maiores do que para ASH:19d e ASH:19e, indicando que os compostos com grupo sulfeto não acessam o fluoróforo com a mesma intensidade dos compostos com grupo sulfóxido. Em outras palavras, 19d e 19e terão menor afinidade de ligação do que 19b e 19c no sítio de interação da ASH. Isso foi refletido nos valores de K_a que, apesar de estarem na ordem de 10^5 M^{-1} para todos os compostos, para ASH:19b e ASH:19c, os valores de K_a são cerca de 2 vezes maiores do que para ASH:19d e ASH:19e.

No geral, esses valores estão na mesma ordem de magnitude observada para piperina/ASH [Suresh et al., 2007] e para complexos anteriores de derivados de piperina/ASH [Franklim et al., 2013; Franklim et al., 2019]. É importante destacar que os valores de K_a na

faixa de 10^5 - 10^4 M⁻¹ são indicativos de ligação significativamente mais fraca do que a de alguns medicamentos comerciais, por exemplo, ibuprofeno, com $K_a \sim 10^6$ M⁻¹ ou varfarina, com $K_a \sim 10^5$ - 10^6 M⁻¹ [Ràfols et al., 2018].

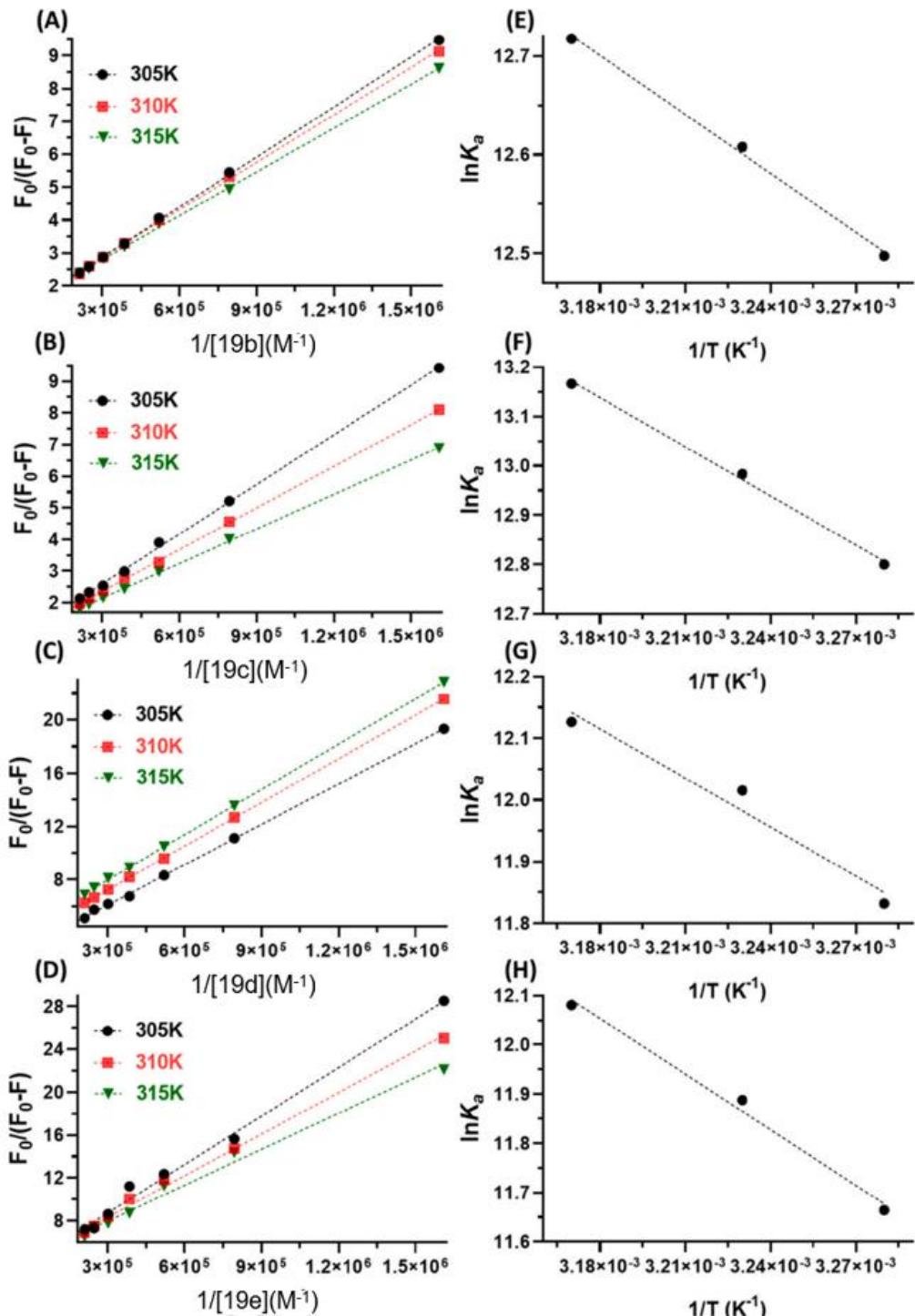


Figura 86: Diagramas de Stern-Volmer modificados para interação entre ASH e (A) 19b, (B) 19c, (C) 19d e (D) 19e, em PBS (pH 7,4) a 305, 310 e 315 K. O diagrama de van't Hoff correspondente com base nos valores de $\ln K_a$ em três temperaturas diferentes para (E) 19b, (F) 19c, (G) 19d e (H) 19e. $[ASH] = 1,0 \times 10^{-5}$ M, $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6}$ M (no equilíbrio ligado à ASH).

4.4. Parâmetros termodinâmicos

A obtenção dos parâmetros termodinâmicos (ΔG° , ΔH° e ΔS°) permite entender os tipos de processos físico-químicos que podem estar ocorrendo durante a interação ligante-ASH. Assim, as equações de van't Hoff (Equação 40) e energia livre de Gibbs (Equação 41) foram usadas para estimar os parâmetros termodinâmicos nas interações ASH:19b-e (figura 86E-86H).

Os valores negativos de ΔG° para a interação entre os compostos **19b-e** e a ASH revelam a espontaneidade do processo de ligação em todas as temperaturas estudadas. Esses valores estão expostos na tabela 10. Os valores calculados de ΔH° e ΔS° são positivos, o que aponta para um processo que é dirigido pela entropia, provavelmente devido ao efeito do deslocamento de moléculas de hidratação, ou seja, o efeito do aumento no número de microestados do sistema resultantes de moléculas de água que foram deslocadas com a entrada de **19b-e** no sítio de ligação da proteína e/ou dessolvatação das moléculas de **19b-e** à medida que são inseridas no sítio de ligação, que é a base do efeito hidrofóbico clássico [Geschwindner, Ulander e Johansson, 2015].

Tabela 10: Parâmetros termodinâmicos ΔH° , ΔS° e ΔG° para a interação com a ASH

Compostos	T(K)	$\Delta H^\circ(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S^\circ(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G^\circ(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	R^2
19b	305			-31,7	
	310	$17,55 \pm 0,03$	$0,161 \pm 0,09$	-32,5	0,9999
	315			-33,3	
19c	305			-32,5	
	310	$29,25 \pm 0,05$	$0,202 \pm 0,03$	-33,5	0,9994
	315			-34,5	
19d	305			-29,3	
	310	$23,55 \pm 0,31$	$0,175 \pm 0,04$	-30,2	0,9912
	315			-31,0	
19e	305			-29,6	
	310	$33,30 \pm 0,12$	$0,206 \pm 0,02$	-30,6	0,9994
	315			-31,6	

De fato, foi estimado que transferir um átomo de carbono do solvente para uma cavidade hidrofóbica contribui com cerca de $-0,25 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}^2$ para a afinidade de ligação [Sharp, 1991]. Obviamente, também deve haver uma mudança de entropia desfavorável associada à perda de graus de liberdade conformacionais para o ligante e a proteína após a ligação, mas o efeito de dessolvatação favorável na entropia parece ser o predominante. A entalpia de ligação positiva desfavorável é uma indicação de que as interações dos ligantes com o alvo não foram fortes o suficiente para compensar a entalpia desfavorável associada à dessolvatação, que é estimada na ordem de 8 kcal/mol a 25°C para grupos polares [Freire, 2008; Cabani et al., 1981]. Além disso, de acordo com Ross e Subramanian [Ross, 1981], valores positivos para ΔH° e ΔS° são indicativos de que um efeito hidrofóbico pode estar contribuindo significativamente para a estabilidade do complexo, em acordo com o processo de dessolvatação discutido acima.

4.5. Investigações acerca das mudanças conformacionais da ASH

A mudança conformacional da estrutura da ASH induzida pela interação com os ligantes avaliados neste trabalho foi estudada usando espectroscopia de DC [Hirst e Brooks, 1994]. A ASH exibe dois sinais negativos: um em 208 (transição $\pi-\pi^*$) e outro em 222 nm (transição $n-\pi^*$) devido aos grupos amida das ligações peptídicas. Os espectros de DC para ASH são apresentados na figura 87 sem e na presença de cada ligante em proporções molares de 1:0, 1:4 e 1:8 (ASH:ligante, pH = 7,4 e 310 K). O sinal de DC para albumina e albumina:ligante tem uma forma semelhante, no entanto, um ligeiro aumento na intensidade foi evidenciado após a adição dos ligantes (Fig. 87A-87D), indicando que a interação perturba ligeiramente a estrutura secundária da proteína.

O conteúdo da estrutura secundária (%) da albumina não ligada e dos ASH:ligantes é representado na figura 87E-87H, mostrando uma ligeira diminuição no conteúdo da hélice α (cerca de 4% na proporção 1:8), o que resultou em um ligeiro aumento no conteúdo de folha β antiparalela, e outros conteúdos estruturais. Esses resultados são complementares com a assinatura termodinâmica determinada para a interação de ASH com os compostos em estudo: o rearranjo conformacional da ASH após a formação dos complexos pode contribuir em parte para a variação positiva da entropia observada para esses compostos, mas os valores pequenos para a variação da estrutura secundária podem indicar que realmente o efeito hidrofóbico seja o predominante [Costa-Tuna et al., 2024; Chaves et al., 2023].

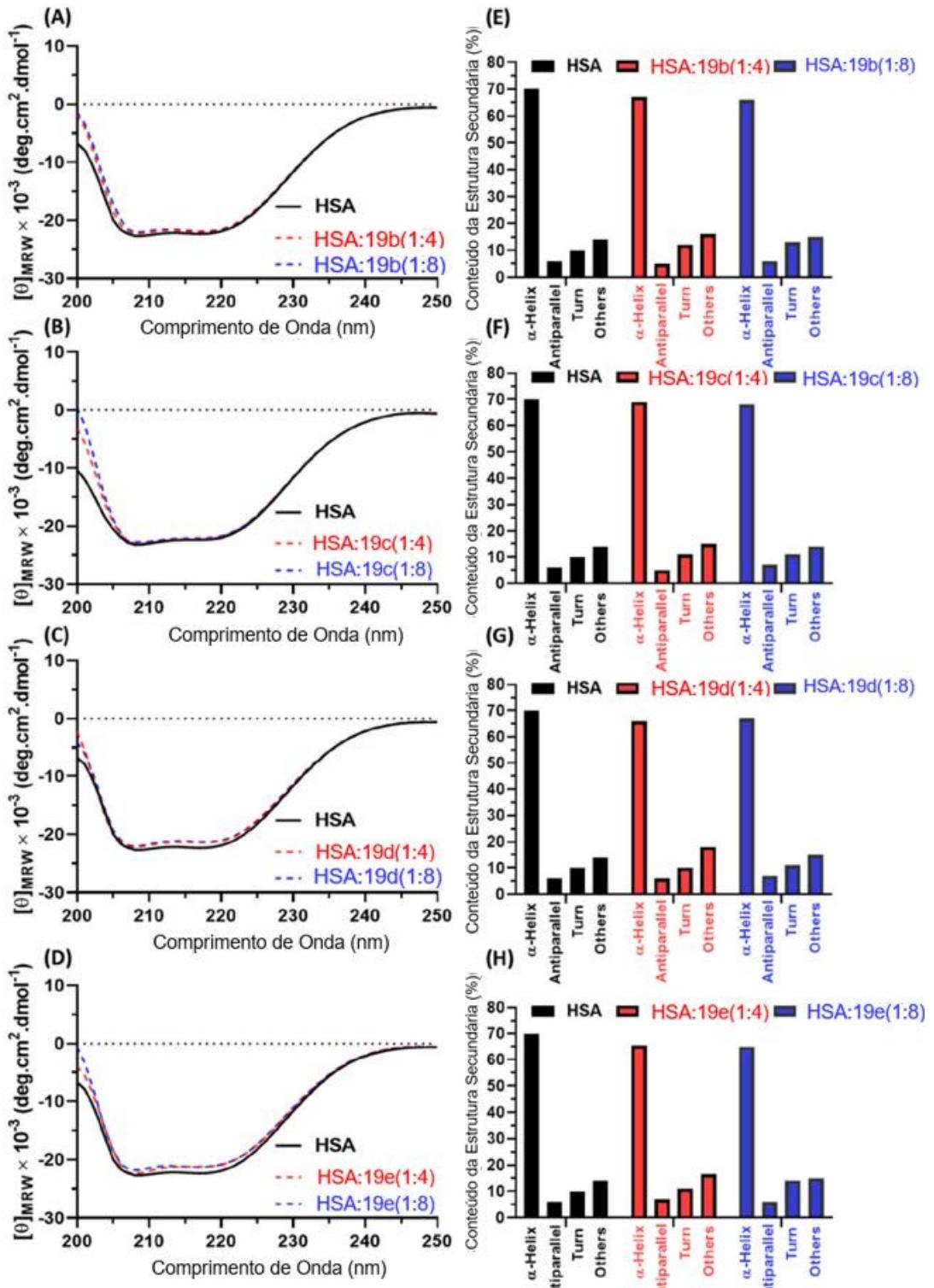


Figura 87: Espectro de CD de UV-distante de ASH, sem e na, presença de (A) 19b, (B) 19c, (C) 19d e (D) 19e, em pH = 7,4 e 310 K. (E, F, G e H) O conteúdo da estrutura secundária correspondente (%) para a proporção albumina:ligante de 1:0, 1:4 e 1:8. $[ASH] = 10 - 6 \text{ M}$ e $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,00, 3,98 \text{ e } 7,94) \times 10^{-6} \text{ M}$.

4.6. Ensaios de deslocamento de fármacos

A estrutura do ASH possui diferentes sítios de ligação com diferentes especificidades. A principal função do ASH é transportar ácidos graxos pelo corpo. A estrutura cristalina do ASH complexado com cinco moléculas de miristato com resolução de 2,5 Å revelou que eles se ligam em bolsas hidrofóbicas cobertas por cadeias laterais de aminoácidos polares, como a arginina [Curry et al., 1998]. Os sítios I e II de Sudlow localizados nos subdomínios IIA e IIIA, respectivamente, são uma das regiões mais estudadas devido à sua capacidade de interagir com diferentes medicamentos comerciais [Ràfols et al., 2018].

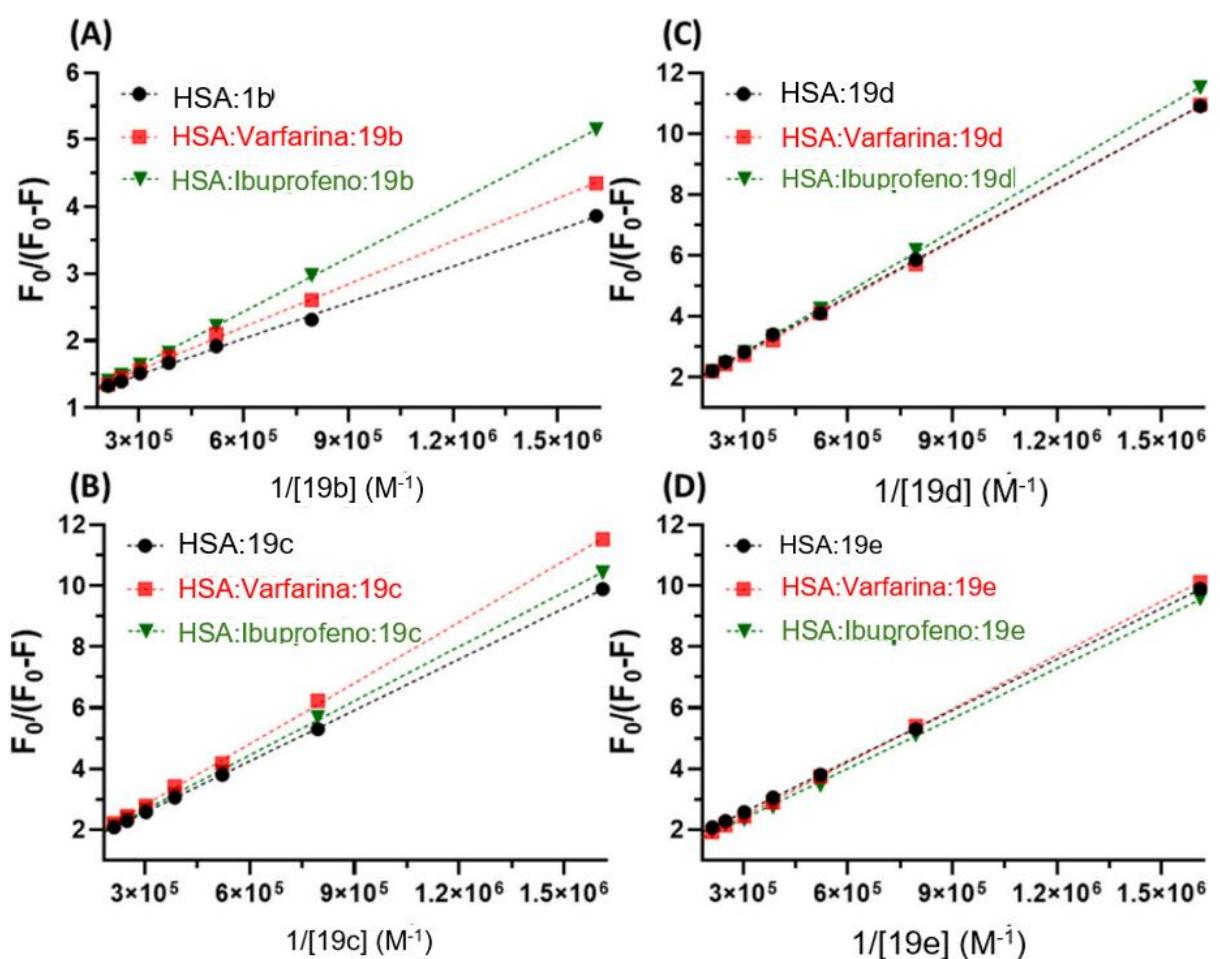


Figura 88: Diagramas de Stern-Volmer modificados para a interação entre ASH e (A) 19b, (B) 19c, (C) 19d e (D) 19e, sem e na presença de sondas de sítio varfarina ou ibuprofeno em PBS (pH 7,4) a 310 K. $[ASH] = [varfarina] = [ibuprofeno] = 1,0 \times 10^{-5} M$ e $[19b] = [19c] = [19d] = [19e] = (0,62, 1,26, 1,92, 2,60, 3,30, 4,02, 4,75 \text{ e } 5,51) \times 10^{-6} M$ (no equilíbrio ligado à ASH).

Ensaios de deslocamento de fármacos foram realizados com as sondas de sítio varfarina e ibuprofeno, que são conhecidas por interagir com o sítio I e sítio II de Sudlow, respectivamente, em uma tentativa de identificar o principal sítio de ligação na estrutura da ASH responsável pela interação com os compostos avaliados neste trabalho (Fig. 88A-88D). A influência de cada sonda de sítio na constante de extinção de Stern-Volmer da fração acessível (K_a) é apresentada na Tabela 11. É importante destacar que os valores de K_a para ASH:**19b-e** resumidos nas Tabelas 8 e 11 são ligeiramente diferentes porque foram obtidos de experimentos independentes; no entanto, eles estão na mesma ordem de magnitude e as pequenas mudanças não são críticas para a discussão sobre a afinidade com a proteína (seção 4.3).

Como pode ser visto, a presença de ambas as sondas de sítio tem alguma influência na ligação dos compostos **19b-e**, mas cada uma afeta a ligação de diferentes maneiras dependendo do substituinte em N_4 dos compostos. A influência mais forte na constante de ligação pela varfarina está nos compostos contendo o substituinte ciclohexil 19c e 19e, o que sugere que eles se ligam preferencialmente ao sítio I de Sudlow. Por outro lado, compostos com o substituinte fenil-etyl 19b e 19d têm uma redução maior na constante de ligação com ibuprofeno, sugerindo que eles se ligam preferencialmente ao sítio II de Sudlow.

Tabela 11: Constante de extinção de Stern-Volmer da fração acessível (K_a) para a interação entre ASH e ligantes **19b-e** na presença de marcadores de sítio varfarina ou ibuprofeno a 310 K

Composto	Sítio sonda	Sítio de Sudlow	$K_a \cdot 10^5$ (M ⁻¹)	% alterada	R ²
19b	nenhum	-	$5,28 \pm 0,05$		0,9994
	Varfarina	I	$4,32 \pm 0,03$	18,2	0,9997
	Ibuprofeno	II	$3,06 \pm 0,02$	42,0	0,9999
19c	nenhum	-	$3,00 \pm 0,01$		0,9999
	Varfarina	I	$2,31 \pm 0,03$	23,0	0,9998
	Ibuprofeno	II	$2,75 \pm 0,02$	8,33	0,9999
19d	nenhum	-	$1,66 \pm 0,05$		0,9999
	Varfarina	I	$1,58 \pm 0,02$	4,82	0,9996
	Ibuprofeno	II	$1,51 \pm 0,01$	9,04	0,9999
19e	nenhum	-	$1,65 \pm 0,01$		0,9999
	Varfarina	I	$1,45 \pm 0,01$	12,1	0,9999
	Ibuprofeno	II	$1,51 \pm 0,03$	8,48	0,9996

4.7. Análise teórica sobre a interação ASH:ligantes

Os resultados do redocagem indicaram a função de aptidão ChemScore [Verdonk et al., 2003] como a mais adequada para o estudo com o sítio I de Sudlow da estrutura 2BXD, levando a três poses para a varfarina com valores de RMSD menores que 1,1 Å (0,77 Å foi o menor valor), enquanto para o sítio II de Sudlow da estrutura 2BXF, a função de aptidão GoldScore [Jones et al., 1997] teve o melhor desempenho, produzindo três poses para o diazepam, todas com valores de RMSD menores que 0,30 Å (0,20 Å foi o menor valor). A partir desses resultados e seguindo os resultados de ligação competitiva, as funções de aptidão utilizadas no estudo de docking dos derivados de piperina foram ChemScore para os compostos 19c e 19e (sítio I de Sudlow) e GoldScore para os compostos 1b e 1d (sítio II de Sudlow).

Na Tabela 12, são apresentadas as principais interações observadas nas poses de ligação com as maiores pontuações obtidas para os compostos 19c e 19e. O interior do sítio I é principalmente apolar, mas contém dois grupos de resíduos polares: um grupo interno (Tyr150, His242, Arg257) e um grupo externo (Lys195, Lys199, Arg218, Arg222) [Ghuman et al., 2005] que podem desempenhar o papel de âncoras para varfarina [Petitpas et al., 2001], moléculas com grupos carboxilato [Alexandri et al., 2023] e o ácido graxo sintético NBD-C12 [Venianakis et al., 2023]. As melhores poses de ligação obtidas dos compostos 19c e 19e neste sítio revelam que ambos os compostos são de fato capazes de interagir com dois resíduos desses grupos polares, Lys195 e Arg257 (Tabela 12).

Tabela 12: Principais interações para as melhores poses identificadas para os ligantes 19c e 19e no sítio I de Sudlow, função de pontuação de aptidão ChemScore

1c			1e		
Tipo de interação	Resíduo de ASH	Distância (Å)	Tipo de interação	Resíduo de ASH	Distância (Å)
Hidrofóbica	Leu238	3,91	Hidrofóbica	Tyr150	3,78
Hidrofóbica	Arg257	3,38	Hidrofóbica	Leu238	3,44
Hidrofóbica	Leu260	3,46	Hidrofóbica	Arg257	3,36
Hidrofóbica	Ile290	3,34	Hidrofóbica	Leu260	3,44
Hidrofóbica	Ile290	3,71	Hidrofóbica	Ile290	3,64
Hidrofóbica	Ala291	3,16	Hidrofóbica	Ala291	3,31
Ligação H	Ser192	1,82	Ligação H	Ser192	1,76
Ligação H	Lys195	2,06	Ligação H	Lys195	2,12

Entretanto, suas interações com os resíduos do sítio I são predominantemente hidrofóbicas, com apenas duas ligações de hidrogênio estabelecidas entre os resíduos da entrada da cavidade, Ser192 e Lys195, e cada um dos átomos de oxigênio do grupo benzodioxola. Este perfil de interação é consistente com os dados termodinâmicos, que mostraram interações ligante-ASH entropicamente dirigidas (ver Tabela 10) e apontam para o deslocamento concomitante de moléculas de água resultante da interação entre fragmentos apolares do ligante e ASH como a principal força motriz por trás da energia livre de ligação favorável. A figura 89 mostra, como exemplo, o melhor modo de ligação do composto 19e no sítio I de Sudlow, que é bastante semelhante ao do composto 19c, como esperado pela similaridade entre ambas as estruturas.

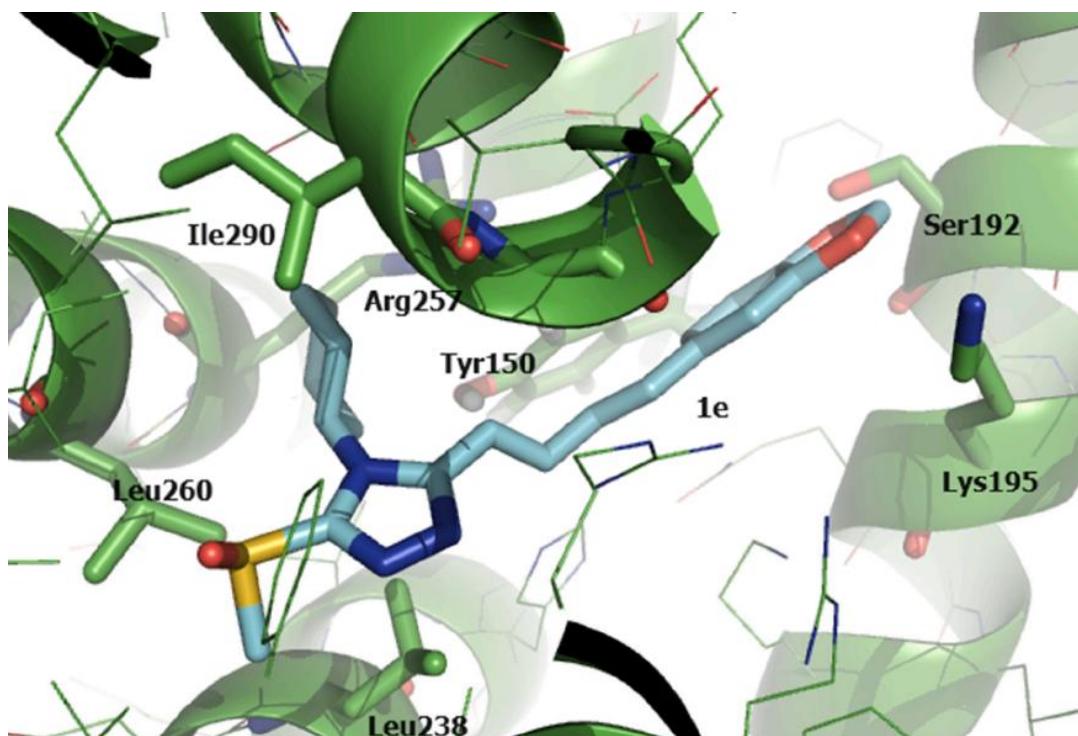


Figura 89: Melhor modo de ligação do composto 19e dentro do sítio I de Sudlow da ASH gerado por docagem molecular (função de aptidão ChemScore). Átomos de C do ligante apresentados em ciano e átomos de C da proteína apresentados em verde; átomos de N em azul; átomos de O em vermelho; átomo de S em amarelo. Figura gerada com PyMOL 0.99rc6 (DeLano Scientific LLC).

No caso das poses de ligação dos compostos 19b e 19d no sítio II de Sudlow (Tabela 13), é evidente que esses compostos podem formar interações dentro do sítio de ligação FA4 e mais específicas com o cluster de aminoácidos polares I (Arg410, Tyr411), mas não com o cluster II (Ser429, Tyr422) [Petitpas et al., 2001]. Além disso, o tipo predominante de interações

é hidrofóbico, o que está de acordo com seu perfil amplamente hidrofóbico, com um único segmento polar principal, localizado próximo a um lado da entrada da cavidade de ligação e centrado em Tyr411, mas incluindo Arg410, Lys414 e Ser489 [Ghuman et al., 2005]. Arg410 é de fato o único resíduo envolvido em uma interação polar com ambos os compostos, uma interação cátion-π com o grupo benzodioxola. Como os compostos 19b e 19d têm estruturas predominantemente hidrofóbicas, é interessante que a artemisinina, que também é um composto altamente apolar, mostre um padrão de interação semelhante, ou seja, interage com Arg410 e Tyr411 [Petitpas et al., 2001]. Como foi o caso dos compostos 19c e 19e, esse perfil de interação é consistente com os dados termodinâmicos relatados na Tabela 10, que também mostrou a entropia como a força motriz por trás da interação ASH com os compostos 19b e 19d.

Tabela 13: Principais interações para as melhores poses identificadas para os ligantes 19b e 19d no sítio II de Sudlow, função de pontuação de aptidão GoldScore.

1b			1d		
Tipo de interação	Resíduo de ASH	Distância (Å)	Tipo de interação	Resíduo de ASH	Distância (Å)
Hidrofóbica	Leu387	3.68	Hidrofóbica	Pro384	3.83
Hidrofóbica	Leu387	3.57	Hidrofóbica	Leu387	3.73
Hidrofóbica	Ile388	3.40	Hidrofóbica	Ile388	3.20
Hidrofóbica	Leu407	3.39	Hidrofóbica	Leu407	3.96
Hidrofóbica	Glu450	3.46	Hidrofóbica	Ala449	3.83
Hidrofóbica	Leu453	3.41	Hidrofóbica	Glu450	3.10
			Hidrofóbica	Leu453	3.34
Cation-π	Lys195	3.54	Cation-π	Arg410	3.81

Como exemplo, a figura 90 mostra o melhor modo de ligação do composto 19d no sítio II de Sudlow; o modo de ligação do composto 19b é bastante semelhante, como esperado. Como foi o caso do grupo ciclohexil dos compostos 19c e 19e, pode-se ver que o grupo feniletil dos compostos 19b e 19d é completamente inserido em um sub-bolso hidrofóbico, mas como esse grupo é mais flexível do que o anterior, espera-se que essa interação resulte em um maior custo entrópico conformacional; na verdade, isso pode ser a razão para os valores menos favoráveis de ΔS° para os compostos 19b e 19d (ver Tabela 10).

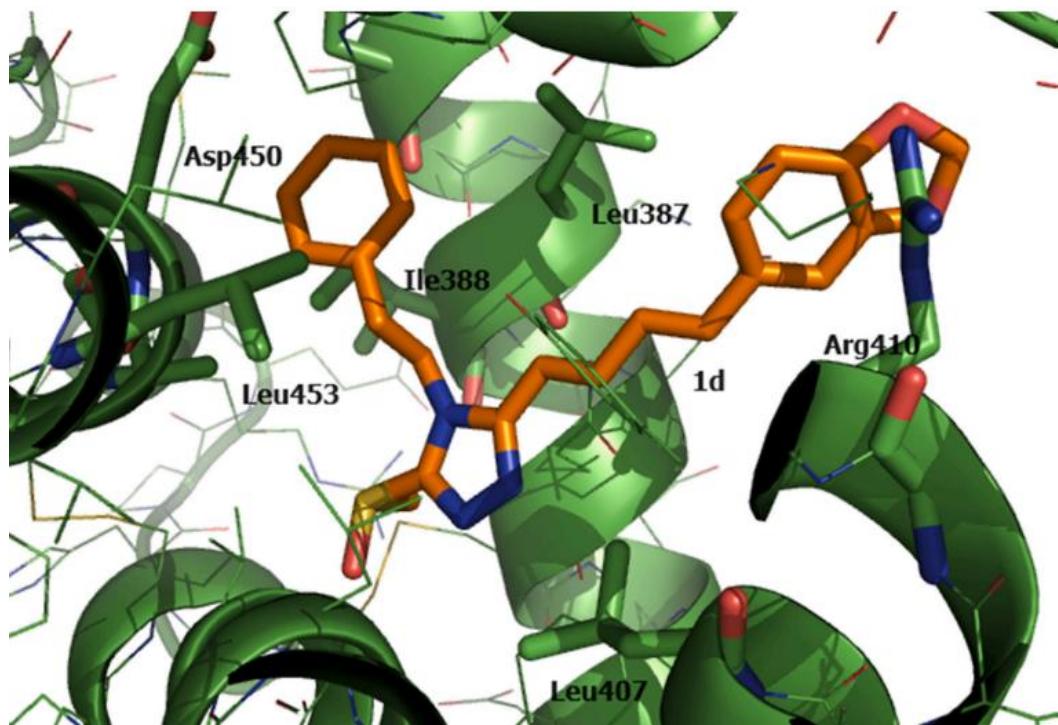


Figura 90: Melhor modo de ligação do composto 19d dentro do sítio II de ASH Sudlow gerado por docagem molecular (função de aptidão GoldScore). Átomos de ligante C apresentados em laranja e átomos de proteína C apresentados em verde; átomos de N em azul; átomos de O em vermelho; átomo de S em amarelo. Figura gerada com PyMOL 0.99rc6 (DeLano Scientific LLC).

5. Conclusões

Quatro 1,2,4-triazolo-3-tionas (**19b-e**), previamente sintetizadas e caracterizadas como tripanocidas por nosso grupo de pesquisa, tiveram seu perfil de interação com a ASH analisado neste trabalho por técnicas espectroscópicas combinadas com cálculos de docagem molecular.

O estudo mostrou que a principal extinção de fluorescência da albumina induzida por **19b-e** é via combinação de mecanismos estáticos (estado fundamental) e dinâmicos (transferência de energia). Em geral, os compostos **19b-e** podem ser divididos em dois grupos: um baseado na presença do grupo sulfeto (**19b** e **19c**) e o outro baseado no grupo sulfóxido (**19d** e **19e**). A presença do grupo sulfeto em **19b** e **19c** causou extinção de fluorescência mais forte da albumina do que o **19d** e **19e** contendo sulfóxido, o que também foi evidenciado nos tempos de vida da fluorescência e na fração da fluorescência inicial, que é acessível pela sua extinção (f).

Os valores de K_a na ordem de 10^5 M^{-1} indicam forte interação entre todos os compostos e ASH, sendo para **19b** e **19c** cerca de 2 vezes maiores que para **19d** e **19e**. Os valores de ΔG^0 de interação indicam uma menor diferença entre os compostos, mas a interação é prevista sempre como espontânea (valores de ΔG^0 de interação negativos), principalmente impulsionada por efeitos entrópicos, provavelmente, fenômenos de dessolvatação, perturbando apenas ligeiramente o conteúdo da estrutura secundária de ASH. Finalmente, apesar das similaridades entre as estruturas, ensaios de deslocamento de fármacos (análises de competição) e cálculos teóricos indicaram que os compostos contendo o substituinte ciclohexil, **19c** e **19e**, se ligam preferencialmente ao sítio I de Sudlow, enquanto os compostos contendo feniletil, **19b** e **19d**, se ligam preferencialmente ao sítio II de Sudlow.

Os resultados de docagem molecular de **19b-e** em ambos os sítios revelaram padrões de interação dominados por interações hidrofóbicas, que são consistentes com os dados termodinâmicos, uma vez que essas interações são conhecidas por resultar em efeitos entrópicos favoráveis causados pelo deslocamento de moléculas de água. No geral, foi evidenciado que as propriedades da ASH a torna uma provável candidata para extensão da meia-vida e administração intracelular direcionada dos compostos tripanocidas analisados, mas futuros estudos farmacocinéticos *in vivo* devem ser feitos para melhor extrapolar os resultados obtidos para a matriz biológica.

6. Referências Bibliográficas

- Abou-Zied, O. K.; *Curr. Pharm. Des.*; 2015; 21; 1800-1816.
- Acunha, T. V.; Chaves, O. A.; Iglesias, B. A.; *J. Porphyrins Phthalocyanines*; 2021; 25; 75-94.
- Adasme, M. F.; Linnemann, K. L.; Bolz, S. N.; Kaiser, F.; Salentin, S.; Haupt, V. J.; Schroeder, M.; *Nucleic Acids Res.*; 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.
- Alexander, M. R.; Alexander, B.; Mustion, A. L.; Spector, R.; Wright, C. B.; *J. Am. Med. Assoc.*; 1982, 2, 247, 831-833.
- Alexandri, E.; Venianakis, T.; Primikyri, A.; Papamokos, G.; Gerothanassis, I. P.; *Molecules*; 2023; 28; 3724.
- Álvarez-Hernández, D. A.; Franyuti-Kelly, G. A.; Díaz-López-Silva, R.; González- Chávez, A. M.; González-Hermosillo-Cornejo, D.; Vázquez-López, R.; *Rev. Med. Hosp. Gen. Méx.*; 2018; 81,3; 154-164.
- Amutha, R.; Sangeetha, B.; Muthukumaran, R.; *ed.*; Academic Press: Cambridge; 2021; cap. 1.
- Andrade, S. G.; Magalhães, J. B.; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; 1997, 30, 27-35.
- Andrade, Z. A.; Mem. Inst. Oswaldo Cruz, disponível em Patologia – Portal da Doença de Chagas., acessado em: 01 de novembro de 2024.
- Andrade, Z. A.; Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 1999; 94,1, 71-80.
- Andricopulo, A. D.; Montanari, C. A.; *Mini-Rev. Med. Chem.*; 2005; 5; 585-593.
- Ang, W. H.; Daldini, E.; Juillerat-Jeanneret, L.; Dyson, P. J.; *Inorg. Chem.*, 2007; 46; 9048-9050.
- 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.
- Auger, S.; Storino, R.; Ordoñez, I. O.; Urrutia, M. I.; Sanmartino, M.; Romero, D.; Jörg, M.; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; 2002; 35, 609-616.
- Bailey, C. J.; Day, C.; *Pract. Diabetes Int.*; 2004, 21, 115-117.
- Barbosa, M. M.; Nunes, M. C. P.; *Rev. Esp. Cardiol.*; 2012; 65; 17-21.
- 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.
- Barquero, A. A.; *Quím. Viva*; 2008; 6, 2; 53-69.
- Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; 3a ed., Artmed: Porto Alegre, 2015.
- Barros, J. A. C., Saude soc., 2002, 11, 67-84.
- 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.
- Batista, V. S.; Farias, R. L.; Simões, L. P. M.; Nascimento-Júnior, N. M.; *Quim. Nova*; 2022; 45, 2; 223-234.
- Bayach, I.; D'Aleó, A.; Trouillas, P.; *J. Phys. Chem. A*, 2019, 123, 194.
- Becker, G. J.; *Kidney Int*; 2004, 66, 16-17.
- Beckett, D.; *Biothermodynamics, Part C*; 2011; 488.
- 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 Krankheitszichen. 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.; Curry, S.; Franks, N.P.; *J. Biol. Chem.*; 2000; 275; 38731.
- 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.
- Bisio, M. M. C.; Medina, L. S. J.; García-Bournissen, F. ; Gulin, J. E. N.; *Parasitol.*; 2024; 123, 248.
- 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.
- Blofeld, J.; Taoismo o caminho da imortalidade, ed.Pensamento, 1979, 10.
- 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.; Sirotnik, 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.

- Boyd, E.; Morrison, R. *Química orgânica. 12. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995, 14, 701.*
- 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.
- Braslavsky, S. E.; *Pure Appl. Chem.*; 2007; 79; 293-465.
- Brener, Z.; Chiari E.; Ver. Inst.Med. Trop. São Paulo; 1963, 220-224 1963.
- Brener, Z.; *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*; 1961; 3; 43-49.
- Brener, Z; *Imprensa Oficial de Minas Gerais: Belo Horizonte*; 1968; 510.
- Brune, D.; Kim, S.; *Biophysics*; 1993, 90, 3835-3839.
- Bryan, C. P.; Ancient Egyptian Medicine: The Ebers Papyrus., Chicago-London, Ares Publishers, 1930.
- Bunn, H. F.; Higgins, P. J.; *Science*; 1981; 213; 222-224.
- Bures, L; Bostík, J.; Motycka, K.; Spundová, M.; Rehák, L.; *Neoplasma*; 1988; 35, 3; 329-342.
- 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.
- Cabani, S.; Gianni, P.; Mollica, V.; Lepori, L.; *J. Solution Chem.*; 1981; 10; 563-595.
- Cabello, C.; Cabello, F.; *Rev. Med. Chile*; 2008; 136,3; 385-393.
- Caiolfa V. R.; Zamai, M.; Fiorino, A.; Frigerio, E.; Pellizzoni, C.; d'Argy, R.; Ghiglieri, A.; Castelli, M. G.; Farao, M.; Pesenti, E.; Gigli, M.; Angelucci, F.; Suarato, A.; *J. Control. Release*; 2000; 65; 105-119.
- 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.
- Cançado, J. R.; Marra, U. D.; Brener, Z.; *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*; 1964, 6; 12-16.
- Carabarin-Lima, A.; Vázquez, M. C. G.; Baylon-Pacheco, L.; Rosales-Encina, J. L.; *Elementos*; 2011; 84; 5-11.
- Cardwell, N. M. E.; Cornforth, J. W.; Duff, S. R.; Holtermann, H.; Robinson, R.; *Chem. Ind.*; 1951, 389-390.

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.

Carvalho, T. M. U.; De Souza, W.; *Cell Struct. Funct.*; 1989; 14, 383-392.

Casas, J. S.; Garcia-Tasende, M. S.; Sordo, J.; *Coord. Chem. Rev.*; 2000, 209, 197-261.

Casbarra, L.; Procacci, P.; *J. Comput. Aided Mol. Des.*; 2021; 35, 6, 721-729.

Castro, L. H. E.; *Desenvolvimento de triazóis derivados da piperina inibidores da CYP51 de Trypanosoma cruzi: Otimização de um modelo de previsão de atividade teórica, síntese e atividade in vitro; Tese de doutorado, UFRRJ*, 2021.

Chagas, C.; *Arch. Schiff. Tropenhyg*; 1909; 13; 120-122. (a)

Chagas, C.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 1909; 1; 159-218. (b)

Chatterjee, T.; Pal, A.; Dey, S.; Chatterjee, B. K.; Chakrabarti, P.; *PloS One*, 2012; 7; e37468.

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.; Jesus, C. S. H.; Henriques, E. S.; Brito, R. M. M.; Serpa, C.; *Photochem. Photobiol. Sci.*; 2016; 15; 1524-1535.

Chaves, O. A.; Loureiro, R. J. S.; Costa-Tuna, A.; Almeida, Z. L.; Pina, J.; Brito, R. M. M.; Serpa, C.; *ACS Food Sci. Technol.*; 2023; 3; 955-968.

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.; Menezes, L. B.; Iglesias, B. A.; *J. Mol. Liq.*; 2019; 294; 11158.

Chaves, O. A.; Oliveira, C. H. C. S.; Ferreira, R. C.; Ferreira, V. F.; Ferreira, S. B.; Serpa, C.; Cesarin-Sobrinho, D.; da Silva, F. A.; Netto-Ferreira, J. C.; *Chem. Phys. Imp.*; 2024; 8; 100465.

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 Research*; 2021, 501, 108274.

Chaves, O. A.; Tavares, M. T.; Cunha, M. R.; Parise-Filho, R.; Sant'Anna, C. M. R.; Netto-Ferreira, J. C.; *Biomolecules*; 2018; 8; 78-95.b

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.

Christensen, A. S.. Cui T. K.; Elstner, M.; *Chem. Rev.*; 2016; 116, 9, 5301-5337.

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. *Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro*; 2005.

Costa-Tuna, A.; Chaves, O. A.; Loureiro, R. J. S.; Pinto, S.; Pina, J.; Serpa, C.; *Int. J. Biol. Macromol.*; 2024; 225; 128210.

Coura, J. R.; Castro, S. L.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 2002; 97, 3-24.

Coura, J. R.; Ferreira, L. F.; Rubens, J.; Pereira, N. C.; Silva, J. R.; *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*; 1966; 8, 125-133.

Coura, J. R.; Ferreira, L. F.; Silva, J. R.; *O. Hospital*; 1962; 62; 957-964.

Coura, J. R.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 2009; 104, 4; 549-554.

Coura, J. R.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 2015, 110, 3, 277-282.

- Cowen, D. L.; Helfand, W.H.; *Pharmacy: an illustrated history*. New York: Harry N. Abrams, 1990.
- 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.; Brick, P.; Franks, N. P.; *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*; 1999, 1441, 131-140.
- 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.; Mandelkow, H.; Brick, P.; Franks, N.; *Nat. Struct. Biol.*; 1998; 5; 827-835.
- 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.
- Czub, M. P.; Stewart, A. J.; Shabalin, I. G.; Minor, W.; *IUCrJ*; 2022; 9; 551-561.
- D'Arcy, P. F.; McElnay, J. C.; *Pharmacol. Ther.*; 1982, 17 (2), 211-220.
- Da Costa Filho, P. A.; Poppi, R. J.; *Quím. Nova*; 1999; 22, 3; 405-411.
- 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.
- De Castro, S. L.; *Acta Tropical*; 1993; 53; 83-98.
- De Simone, G.; di Mais, A.; Ascenzi, P.; *Int. J. Mol. Sci.*; 2021; 22; 10086.
- De Simone, G; di Mais, A; Ascenzi, P.; *Int. J. Mol. Sci.*; 2021; 22; 10086.
- De Souza, T. B.; Caldas, I. S.; Paula, F. R.; Rodrigues, C. C.; Carvalho, D. T.; Dias, D. F.; *Chem. Biol. Drug Des.*; 2019; 00; 1-6.
- De Souza, W.; Rodrigues, J. C. F.; *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.*; 2009; 2009, 1-19.
- 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.
- Dewar, M. J. S.; Thiel, W.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1977; 99; 4899-4907.
- Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1985; 107, 13; 3902-3909.
- di Masi, A.; Leboffe, L.; Trezza, V.; Fanali, G.; Coletta, M.; Fasano, M.; Ascenzi, P.; *Curr. Pharm. Des.*, 2015, 21 (14), 1837-1847.
- Dias, J. C. P.; *Epidemiol. Serv. Saúde*; 2016, 25
- Dias, J. C. P.; COURA, J. R.; Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997; 486.
- Dias, J. C. P.; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; 2006 39,4; 370-375.
- Dias, J. P. S.; *Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa*; 2005.
- Dias, L. C.; Dessoys, M. A.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; *Quim. Nov*; 2009; 32, 9, 2444-2457
- Dias, L. C.; Dessoys, M. A.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; *Quim. Nov*; 2009; 32, 9; 2444-2457.
- Díaz De Toranzo, E. G.; Castro, J. A.; Franke De Cazzulo, B. M.; Cazzulo, J. J.; *Experientia*; 1988; 44; 880-881.
- Diaz, N.; Suarez, D.; Sordo, T. L.; Merz Jr, K. M.; *J Med Chem*; 2001, 44, 250-260.
- Digilio, G.; Tuccinardi, T.; Casalini, F.; Cassino, C.; Dias, D. M.; Geraldès, C. F. G. C.; Catanzaro, V.; Maiocchi, A.; Rossello, A.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.*; 2014; 79; 13-23.
- 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.
- Docampo, R.; Moreno, S. N.; *Rev. Infec. Diseases.*; 1984, 6, 223-238.
- Docampo, R.; Moreno, S. N.; Stoppani, A. O.; León, W.; Cruz, F. S.; Villalta, F.; Muñiz, R. F.; *Biochem. Pharmacol.*; 1981; 30; 1947-1951.
- Dockal, M.; Carter, D. C.; Ruker, F.; *J. Biol. Chem.*; 2000; 275; 3042-3050.
- Dose, K; Bioquimica., São Paulo: EPU, 1982.

- Dosio, F. J.; Brusa, P.; Crosasso, P.; Arpicco, S.; Cattel, L.; *Control. Release*; 1997; 47; 293-304.
- Doweiko J. P., Nompleggi D. J.; *J Parenter Enteral Nutr*; 1991. 15, 2, 207-11.
- Drmanovic, Z.; Voyatzzi, 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.; Lapicque, F.; Maurice, M. H.; Fournel-Gigleux, S.; Magdalou, J.; Abiteboul, M.; Siest, G.; Netter, P.; *Mol. Pharmacol.*; 1995, 47 (3), 647-653.
- Dugaiczyk, A.; Law, S.; Dennison, O. E.; *Proc. Nati Acad. Sci.*; 1982; 79; 71-75.
- Duschak, G. V.; *Recent. Pat. Antiinfect. Drug. Discov.*; 2016; 11, 2; 74-173.
- Duschak, V. G.; Couto, A. S.; *Recent Pat. Anti-Infec. Drug. Discov.*; 2007, 2, 19-51.
- 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.
- Elsadek, B.; Graeser, R.; Esser, N.; Schäfer-Obodozie, C.; Ajaj, A. K.; Unger, C.; Warnecke, A.; Saleem, T.; El-Melegy, N.; Madkor, H.; Kratz, F.; *Eur. J. Cancer*; 2010; 46, 18; 3434-3444.
- 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.
- Epps, D. E.; Raub, T. J.; Kézdy, F. J.; *Anal. Biochem.*; 1995, 227; 342-350.
- 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.
- Esteves, L. F.; Costa, L. A. S.; *Rev. Virtual Quim.*; 2014; 6; 924-936.
- 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-Tehranizadeh, 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.

Fernandes, A. B; Neira, I; Ferreira, A. T; Mortara, R. A. *Parasitology Research*, v. 100, p. 59–68, 2006.

Ferreira, H. O.; *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*; 1961; 3; 287-289.

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.

Fiehn, C; Kratz, F; Sass, G.; Müller-Ladner, U.; Neumann, E.; *Ann. Rheum. Dis.*; 2008; 67, 8; 1188- 1191.

Figge, J.; Rossing, T.; Fencl, 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.

França, R. R. F.; Carvalho, A. S.; Branco, F. S. C.; Pinto, A. C.; Boechat, N.; *Rev. Virtual Quím.*; 2014; 6, 5; 1483-1516.

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; 1378-1394.

Franklim, T. N.; Freire-de-Lima, L., Diniz, J. N. S.; Previato, J. O.; Castro, R. N.; Mendonça-Previato, L.; de Lima, M. E. F.; *Molecules*; 2013; 18; 6366-6382.

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.

Freire, E.; *Drug. Discov. Today*; 2008; 13; 869-874.

Frias, I. M.; Doença do corpo, doença da alma: medicina e filosofia na Grécia Clássica, 1^a. ed., PUC-Rio: Rio de Janeiro; 2005

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.

Gal, J.; *Chirality*; 2008, 20, 5-19.

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

Gastañaga H., T.; García S., F. J.; Herraiz, M. A.; Vidart A., J. A; *Prog. Obst. Ginecol.*; 2008; 51,6; 365-369.

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.; Lapicque, F.; *Chirality*; 2000, 12 (2), 53-62.

- Geschwindner, S.; Ulander, J.; Johansson, P.; *J. Med. Chem.*; 2015; 58; 6321-6335.
- 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, 38-52.
- Gomes, C.; Almeida, A. B.; Rosa, A. C.; Araujo, P. F.; Teixeira, A. R.; *Int. J. Infect. Dis.*; 2019; 81; 81-84.
- Goncharov, N. V.; Belinskaia, D. A.; Shmurak, V. I.; Terpilowski, M. A.; Jenkins, R. O.; Avdonin, P. V.; *Molecules*; 2017, 22, 1201.
- González, A. F.; Cuartero, I. G.; Díez, A. G.; Fernández, P. F.; *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*; 2014; 11, 54; 3194-3207.
- Gonzalez-Medina, M; Naveja, J. J.; Sanchez-Cruz, N.; Medina-Franco, J. L.; *RSC Adv.*; 2017; 7; 54153-54163.
- 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.; Koobanally, 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.
- Guex, N.; Peitsch, M.C.; *Electrophoresis*; 1997; 18; 2714-2723
- Guhl, F.; *Rev. Biomed.*; 2009; 20, 228-234.
- Guido, R. V. C.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D.; *Cur. Med. Chem.*; 2008; 15; 37-46.
- 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.

Haberland, A.; Saravia, S. G. M.; Wallukat, G.; Ziebig, R.; Schimke, I; *Clin. Chem. Lab. Med.*; 2013; 51,2; 271-294.

Hanif, M; *Chem. Commun.*; 2012; 48, 10; 1475

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.; Tian, J.; Liu, H.; Hu, Z.; Chen, X. J. *Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2005, 174, 53.

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.

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.

Herreros-Cabello, A.; Callejas-Hernández, F.; Gironès, N.; Fresno, M.; *Genes*; 2020; 11; 1196-1222.

Hervé, F.; Urien, S.; Albengres, E.; Duché, J. C.; Tillement, J. P.; *Clin Pharmacokinetics*; 1994, 26, 44-58.

Hettick, J; *Anal. Biochem.*; 2011; 414; 232.

Hewitt, L. E.; *I. Biochem. J.*; 1936, 30, 2229-2236.

Higuchi, M. L.; *Arq. Bras. Cardiol.*, 1995; 64, 251-254.

Hinchcliffe, E.; Kenney, E.; *Eur. Patent Appl.*; 1986, 201, 239.

Hirst, J. D.; Brooks, C. L.; 3rd., Helicity, circular dichroism and molecular dynamics of proteins, *J. Mol. Biol.*; 1994; 243; 173-178.

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.

Hoffman-La Roche, Production method for producing *n*-benzyl-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)acetamide (WO 2015076760 A1). 1966, Lon. Pat. L138,529.

<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
accessed on 9/12/2014.

<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>

<https://www.edinst.com/blog/jablonski-diagram-2/>

Huang, Y. M.; Yang, H. Q.; Tang, P. X.; Li, H.; *J. Photochem. Photobiol. Biol.*; 2016; 165; 24-33.

Huangdi – Museu do Universo da Farmácia (museudouniversodafarmacia.com.br),
acessado em 18-09-2024

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.

Huxtable, R. H.; Schwarz, S. K. W.; *Mol. Interv.*, 2001, 1, 189-191.

Ingham, K. C.; *Anal. Biochem.*; 1975; 68; 660-663.

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.

Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R.; *J. Mol. Biol.*; 1997; 267; 727-748.

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.

Khamis, M. A.; Gomaa, W.; Ahmed, W. F.; *Artif. Intell. Med.*; 2015;63, 3; 135-52.

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.

Kisugi, R.; Kouzuma, T.; Yamamoto, T.; Akizuki, S.; Miyamoto, H.; Someya, Y.; Yokoyama, J.; Abe, I.; Hirai, N.; Ohnishi, A.; *Clin. Chim. Acta.*; 2007; 382, 59-64.

Klip, A.; Leiter, L. A.; *Diabetes Care*; 1990, 13 (6), 696-704.

Kluwer Academic/Plenum, New York

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.; *Nanoscale*; 2012, 4, 1910-1918.
- 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.
- 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.
- Kou, S. -B; Lin, Z. -Y.; Wang, B. -L.; Shi, J. -H.; Liu, Y. -X.; *J. Mol. Struct.*; 2020; 1224; 129024.
- Kragh-Hansen, U.; *Biochem. J.*; 1985, 225, 629-638.
- Kragh-Hansen, U.; Hellec, F.; de Foresta, B.; le Maire, M.; Møller, J. V.; *Biophys J.*; 2001; 80; 2898-2911.
- 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, Müller-Driver, R., Hofmann, I., Drevs, J., Unger, C.; *J. Med. Chem.*; 2000; 43; 1253-1256.
- Kratz, F.; Elsadek, B.; *Journal of Controlled Release*; 2012, 161, 429-445.
- Kratz, F.; *Expert. Opin. Inv. Drug.*; 2007; 16; 855-66.
- Kratz, F.; *J. Control. Release*; 2014, 190, 331-336.
- Kratz, F.; *Journal of Controlled Release*; 2008, 132, 171-183.
- Kratz, F; Beyer, U.; Roth, T.; Schütte, M. T.; Unold, A.; Fiebig, H. H.; Unger, C.; *Arch. Pharm.*; 1998; 331, 2; 47-53.
- Kropf, S. P.; Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2009.
- 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.
- Kutchan, T. M., *The Plant Cell*, 1995, 7, 1059-1070.
- Ladokhin, A. S.; Jayasinghe, S.; White, S. H.; *Anal. Biochem.*; 2000, 285, 235-245.
- Lakowicz J. R.; *Principles of fluorescence spectroscopy*; 1999.
- 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.; Seburg, P. H.; Wion, K. L.; *Nucleic Acids Res.*; 1981, 9, 6103-6114.
- Leboffe, L; di Mais, A.; Polticelli, F.; Trezza, V.; Ascenzi, P.; *Curr. Med. Chem.*; 2020; 27, 30; 4907-4931.
- Lee, B.; Bacon, K. M.; Bottazzi, M. E.; Hotez, P. J.; *The Lancet Infect. Dis.*; 2013, 13(4), 342-348.
- 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.
- Lehmann, H.; *J. Integr. Med.*; 2013, 11, 1, 45-53.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Principles of biochemistry*, 2 ed., New York : Worth Publishers, 1993.
- 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.

Lewis, G. N.; American Chemical Monograph Series. New York: The Chemical Catalog Co., Inc., 1923.

Lexa, K. W.; Dolghih, E.; Jacobson, M. P.; *PLoS One*; 2014, 9 (4), e93323.

Ley, V.; Robbins, E. S.; Nussenzweig, V.; Andrews, N. W.; *J. Exp. Med.*, 1990; 171, 401-413.

Li, D.; Ji, B.; Sun, H.; *Spectrochim. Acta Part A*; 2009, 73, 35

Li, D.; Zhu, J.; Jin, J.; Yao, X. *J. Mol. Struc.* 2007, 846, 34.

Li, J.; Ren, C.; Zhang, Y.; Liu, X.; Yao, X.; Hu, Z. *J. Mol. Struc.* 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.

Li, Z.; Gu, J.; Zhuang, H.; Kang, L.; Zhao, X.; Guo, Q.; *Appl. Soft Comput.*; 2015; 26; 299-302.

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.

Lidani, K. C. F., Andrade, F. A.; Bavia, L.; Damasceno, F. S.; Beltrame, M. H.; Messias-Reason, I. J.; Sandri, T. L.; *Frontiers in Public Health*, 2019.

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.

Linden, R.; *Editora Brasport*; 2006.

Lindup, W. E.; Orme, M. C.; *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*; 1981, 282 (6259), 212-214.

Lipponer, K. G.; Vogel, E.; Keppler, B. K.; *Metal Based. Drugs*; 1996; 3; 243-60

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.
- Lowell, J. E.; Earl, C. D.; *Biotechnol.*; 2009; 27, 323-329.
- Lu, H.; Li, Z.; Zhou, Y.; Jiang, H.; Liu, Y.; Hao, C.; *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*; 2022; 278; 1383.
- Lu, M.; Kuroki, M.; Amano, S.; Tolentino, M.; Keough, K.; Kim, I.; Bucala, R.; Adamis, A. P.; *J. Clin. Invest.*; 1998; 101; 1219-1224.
- 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
- Macedo, T. S.; Soares, M. P. B.; Vasconcelos, J. F.; *Obs. Econ. Latinoam.*; 2024; 22, 10, 1-19.
- 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.
- Mahran, G.; *Medicina Tradicional*, 1977, 1, 23
- 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.

Manne, J. M.; Snively, C. S.; Ramsey, J. M.; Salgado, M. O.; Bärnighausen, T.; Reich, M. R.; *PLoS Negl. Trop. Dis.*; 2013; 7,10; e2488.

Manoharan, I.; Boopathy, R.; *Arch. Biochem. Biophys.*; 2006, 452 (2), 186-188.

Margarson, M.; Soni, N.; *Anaesthesia*; 1998, 53, 789-803.

Marini-Bettòlo, G. B.; *Ciência e Cultura* 1974, 26, 751

Marin-Neto, J.A.; Almeida Filho, O. C.; Pazin-Filho, A.; Maciel, B. C.; *Arq Bras Cardiol.*; 2002; 79,6; 623-627.

Martins-Melo, F. R.; Ramos, A. N. J.; Alencar, C. H.; Heukelbach, J.; *Parasite Epidemiol. Control*; 2016, 1, 56-65.

Masson, P.; Froment, M. T.; Darvesh, S.; Schopfer, L. M.; Lockridge, O.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*; 2007, 22 (4), 463-469.

Masters, KS.; 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.; 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?)

Mathew, B.; Dev, S.; Joy, M.; Mathew, G. E.; Marathakam, A.; Krishnan, G. K.; *ChemistrySelect*; 2017c, 2 (35), 11645-11652.

Matsarskaia, O.; Bühl, L.; Beck, C.; Grimaldo, M.; Schweins, R.; Zhang, F.; Seydel, T.; Schreiber, F.; Roosen-Runge, F.; *Phys. Chem. Chem. Phys.*; 2020; 22; 18507-18517.

Matsushita, S.; Isima, Y.; Chuang, V. T.; Watanabe, H.; Tanase, S.; Maruyama, T.; Otagiri, M.; *Pharm. Res.*; 2004, 21 (10), 1924-1932.

Maya, J. D.; Cassels, B. K.; Iturriaga-Vásquez, P.; Ferreira, J.; Faúdez, M.; Galanti, N.; Ferreira, A.; Morello, A.; *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*; 2007, 146, 601-620.

McLaughlin, S.; Margolskee, R. F.; *Am. Sci.*, 1994, 82, 538-545.

Means, G. E.; Bender, M. L.; *Biochemistry*; 1975, 14, 4989-4994.

Means, G. E.; Wu, H. L.; *Arch Biochem Biophys*; 1979, 194, 526-530.

Meis, J; Castro, R. S. S.;Bibl Ciências Biomédicas/ICICT/FIOCRUZ-RJ. 2017; 1; 110.

Melder, R. J.; Osborn, B. L.; Riccobene, T.; Kanakaraj, P.; Wei, P.; Chen, G.; Stolow, D.; Halpern, W. G.; Migone, T. S.; Wang, Q.; Grzegorzewski, K. J.; Gallant, G.; *Cancer Immunol. Immunother.*; 2005, 54, 535-547.

Melnikov, V. G.; Velasco, F. F.; Goméz, F. E.; Rodriguér, F. G.; Dobrovinskaya, O. R.; *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 2005; 73, 301-306.

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.

Meyer, H.; De Oliveira, M.M.; *Parasitol.*; 1948; 31; 91-94.

Michelini, 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.

Micsonai, A.; Wien, F.; Bulyáki, E.; Kun, J.; Moussong, E.; Lee, Y. -H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J.; *Nucleic. Acids Res.*; 2018; 46; W315-W322.

Miller, Y. I.; Shaklai, N.; *Biochim. Biophys. Acta*; 1999, 1454, 153-164.

Minchietti, 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.; Dugaiczyk, A.; *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 6747-6757.

Mitchelhill, 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.

Mitelman, J. E.; Descalzo, A.; Giménez, L.; Pesce, R.; Romero Villanueva, H.; Auger, S.; Ver. Argent. Cardiol.; 2011; 79; 544-64.

- Mohan, V.; Sengupta, B.; Acharyya, A.; Yadav, R.; Das, N.; Sen, P.; *ACS Omega*; 2018; 3; 10406-10417.
- Mohtat, N.; Cozens, F. L.; Scaiano, J. C.; *J. Phys. Chem. B.*; 1998, 102 (39), 7557-7562.
- Molyneux, D. H.; Savioli, L.; Engels, D.; *Lancet*; 2017, 389, 10066, 312-325.
- Moncayo, A., Ortiz, Y. M. I.; *Ann. Trop. Med. Parasitol.*; 2006; 100; 663-677.
- Montalti, M.; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T.; *Handbook of Photochemistry*, CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, 2006.
- Montalti, M.; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T.; *Handbook of Photochemistry*, CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, 2006.
- 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.
- Moreira, M. L. S.; Chaves, O. A.; de Lucas, N. C.; Goulart, J. S.; Garden, S. J.; Serpa, C.; Netto-Ferreira, J. C.; *J. Mol. Liq.*; 2024; 403; 124829.
- Moreno, M. J.; Loura, L. M. S.; Martins, J.; Salvador, A.; Velazquez-Campoy, A.; *Int. J. Mol. Sci.*; 2022; 23 9757.
- Moreno, S. N. J.; Docampo, R.; Mason, R. P.; Leon, W.; Stoppani, A. O. M.; *Arch. Biochem. Biophys.*; 1982; 218, 2; 585-591.
- Morris, G. M.; Lim-Wilby, M.; *Methods Mol. Biol.*; 2008, 443, 365-382
- Mors, W. B.; *Ciência Hoje*; 1982, 1, 14-19.
- Mroueh, F. M.; Noureldeen, 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.
- Muhammed, M. T.; Aki-Yalcin, E.; *Lett. Drug Des. Discov.*; 2024; 21, 3, 480-495.
- 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.

- Náquira, C.; Cabrera, R.; *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*; 2009; 26,4; 494-504.
- Nascimento, I. J. S.; Aquino, T. M.; Silva-Júnior, E. F.; *Lett. Drug Des. Discov.*; 2022, 19, 951-955.
- Naveenraj, S.; Anandan, S.; *J. Photochem. Photobiol.*; 2013; C 14; 53-71.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Principles of biochemistry of Lehninger*; 7 ed., New York : Worth Publishers; 2018.
- 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.; Strohalm, J.; Ulbrich, K.; Akaike, T.; Maeda, H.; *Jpn. J. Cancer Res.*; 1998, 89 (3), 307-314.
- Nogueira, L. J.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; *Rev. Virtual Quim.*; 2009, 1, 3, 227-240.
- 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.
- Olson, E. J.; Bühlmann, P.; *J. Org. Chem.*; 2011; 76, 20; 8406-8412.
- 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.; Gouilar, 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
- Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. Rosenzweig, D.; H. S.; O'Shea, I. P.; Wilkinson, S. R.; Kaiser, M.; *Eur. J. Med. Chem.*; 2015; 103; 325-334.
- Pasteur L.; *C R Séances Acad Sci*; 1848, 26, 538-538.
- Pathak, M.; Ojha, H.; Tiwari, A. K.; Sharma, D.; Saini, M.; Kakkar, R.; *Chemistry Central Journal*; 2017, 11, 132-142plasmon 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.

Pelletier, P. J.; Caventou, J. B.; *Ann. Chim. Phys.*, 1818, 323

Pelletier, P. J.; Caventou, J. B.; *Annal. Chim. Phys.*, 1820, XV, 289

Pérez-Ayala, A; Pérez-Molina, J. A.; Norman, F.; Monge-Maillo, B.; Faro, M. V.; López-Vélez, R.; *Ann. Trop. Med. Parasitol.*; 2011; 105, 1; 25-29.

Pérez-Molina, J. A.; Molina, I.; *The Lancet*; 2018; 391; 10115; 82-94.

Peters J. T.; *Academic Press: San Diego*; 1996;

Peters Jr, T.; *Academic Press*, San Diego, 1995.

Peters, T. Jr.; *Adv. Protein Chem.*; 1985; 37; 161-245.

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.

Phuangswai, O.; Hannongbua, S.; Gleeson, M. P.; *J Phys Chem B*; 2014, 118, 11886-11894.

Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio R. A., *Quim. Nova*, 2002, 25, Supl. 1, 45-61.

Pirnau, A.; Bogdan, M.; *Rom J Biophys*; 2008, 18, 49-55.

Pita, J. R.; História da farmácia. 2 ed. Coimbra: Minerva, 2000.

Plantas Medicinais e Fitoterápicos., Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo., São Paulo: 2019. 4^a edição

Pogam, P.; Boustie, J.; *Molecules*; 2016, 21 (3), 294.

Porto Editora – *Friedrich Wöhler* na Infopédia [em linha]. Porto: Porto Editora. [consult. 2024-09-19 08:53:27]. Disponível em [https://www.infopedia.pt/\\$friedrich-wohler](https://www.infopedia.pt/$friedrich-wohler)

Prieto-Martínez, F. D.; López-Lpoez, E.; Juárez-Mercado, K. E.; Medina-Franco, J. L.; Academic Press, Elsevier; 2019; 19-44.

Rabbani, G.; Ahn, S. N.; *International Journal of Biological Macromolecules*; 2019, 123, 979-990.

Rabbani, G.; Lee, E. J.; Ahmad, K.; Baig, M. H.; Choi, I.; *Mol. Pharm.*; 2018, 15, 1445-1456.

Race, J.; *Biochem. J.*; 1932, 26, 1573-1574.

Rachelin, Y. P.; Pradhan, S.; James, C.; *Spectroscopy Letters*; 2018, 51 (3), 144-154.

Ràfols, C.; Amézqueta, S.; Fuguet, E.; Bosch, E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 2018; 150; 452.

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-Ahmadia, S.; Saberi, M. R.; Chamani, J.; *J. Bio. Struc. Dyn.*; 2015; 33, 3; 513-533.

Ramirez, J. L.; *Trop. Med. Infect. Dis.*; 2020, 5, 129-139.

Rassi, A.; Ferreira, H. O.; *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*; 1971; 5; 235-262.

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.

Rey L.; Bases da Parasitologia Médica. 3º edição, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro - Brasil, 1991, 136.

Ribeiro, M.; Nitz, N.; Santana, C.; Moraes, A.; Hagström, L.; Andrade, R.; Hecht, M.; *Exp. Parasitol.*; 2016; 162, 1-6.

Rio, G. F.; Castro, L. H. E.; Souza, G. S. R.; Chaves, O. A.; Lima, M. E. F.; Cesarin-Sobrinho, D.; Sant'Anna, C M. R.; *J. Mol. Liq.*; 2024; 407; 125247.

Robbers, J. E.; Speedie, M. K.; Tyler, V. E., Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Baltimore: Willians & Wilkins, 1996, 1-14.

Roche, M.; Rondeau, P.; Singh, N. R.; Tarnus, E.; Bourdon, E.; *FEBS Lett.*; 2008, 582 (13), 1783-1787.

Romanha, A. J.; Alves, R. O.; Murta, S. M.; Silva, J. S.; Ropert, C.; Gazzinelli, R. T.; *J. Infect. Diseases*; 2002; 186; 823-828.

- 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.
- Rubio, M.; Donoso, F.; *Bol. Chil. Parasitol.*; 1969; 24; 43-48.
- 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.
- Saad, B.; Azaizeh, H.; Said, O.; *eCAM*, 2005, 4, 475-479.
- Sakurai, Y.; Ma, S. F.; Watanabe, H.; Yamaotsu, N.; Hirono, S.; Kurono, Y.; Kragh-Hansen, U.; Otagiri, M.; *Pharm. Res.*; 2004, 21 (2), 285-292.
- Saldívar-González, F.; Prieto-Martínez, F. D.; Medina-Franco, J. L.; *Educ. Quím.*; 2017; 28, 1, 51-58.
- Saldívar-González, F.; Prieto-Martínez, F. D.; Medina-franco, J. L.; *Educ. Quím.*; 2017; 28, 1; 51-58.
- 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.
- Sanchez-Lermen, R. L. P.; Dick, E.; Salas, J. A. P.; Fontes, C. J. F.; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; 2007; 40, 2; 197-203.
- Sanmartino, M.; Amieva, C.; Balsalobre, A.; Carrillo, A.; Marti, G.; Medone, P.; Menegaz, A; Ciudad Autónoma de Buenos Aires: CONICET—Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; 2015; acessado em : 01 de novembro de 2024.
- Sant'Anna; C. M. R.; *Rev. Virtual Quím.*; 2009; 1, 49-57.
- Santana, R. A. G.; Guerra, M. G. V.; Sousa, D. R.; Couceiro, K.; Ortiz, J. V.; Oliveira, M.; Silva, G. A.; Ferreira, L. S.; Souza, K. R.; Tavares, I. C.; Morais, R. F.; Melo, G. C.; Vergel,

G. M.; Albuquerque, B. C.; Arcanjo, A. R. L.; Monteiro, W. M.; Ferreira, J. M. B. B.; Lacerda, M. V. G.; Silveira, H.; Guerra, A. O.; *Emerg. Infect. Dis.*; 2019; 25,1; 132.

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-Trepas, 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.

Schalkwijk, C. G.; Chaturvedi, N.; Twaafhoven, H.; van Hinsbergh, V. W.; Stehouwer, C. D.; *Eur. J. Clin. Invest.*; 2002; 32; 500-506.

Schenone, H.; Concha, L.; Aranda, R.; Rojas, A.; Alfaro, E.; Knierin, E.; Rojo, M.; *Bol. Chil. Parasitol.*; 1975; 30; 91-93.

Schenone, H.; Concha, L.; Aranda, R.; Rojas, A.; Knierim, F.; Rojo, M.; *Bol. Chil. Parasitol.* 1972; 27; 11-14.

Schmidt, S.; Gonzalez, D.; Derendorf, H.; *J. Pharm. Sci.*; 2010, 99 (3), 1107-1122.

Scotti, L; Scotti, M. T.; Cardoso, C.; Pauletti, P.; Castro-Gamboa, I; Bolzani, V. S.; Velasco, M. V. R.; Menezes, C. M. S.; Ferreira, E. I.; *Rev. Bras. Cienc. Farm.*; 2007; 43, 2, 153-166.

Sekijima, Y.; Dendle, M. A.; Kelly, J. W.; *Amyloid.*; 2006; 13; 236-49.

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, D.; Sharma, N.; Pathak, M.; Sharma, R.; Tyagi, P.; Chawla, R.; Basu, M.; Ojha, H.; *Chemical Biology Letters*; 2017, 4 (1), 27-32.
- Sharma, U. K.; Sharma, N.; Kumar, R.; Sinha, A. K.; *Amino Acids*; 2013, 44 (3), 1031-1037.
- Sharp, K. A.; Nicholls, A.; Friedman, R.; Honig, B.; *Biochemistry*; 1991; 30; 9686-9697.
- Siddiqui, S.; Ameen, F.; Rehman, S.; Sarwar, T.; Tabish, M.; *J. Mol. Liq.*; 2021; 336, 116200.
- Silakari, O.; Singh, P. K.; *Academic Press: Cambridge*, 2021; cap 6.
- 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.
- Simard, J. R.; Zunszain, P. A.; Ha; C. E.; Yang, J. S.; Bhagavan, N. V.; Petipas, I.; Curry, S; Hamilton, J. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 2005; 102; 17958-17963.
- Singh, B.; Singh, R.; Bhat, R. A.; Singh, V.; Kumar, D.; *Rev. Roum. Chim.*; 2019, 64 (8), 651-662.
- Singh, I. P.; Choudhary, A.; *Curr. Top. Med. Chem.*; 2015; 15; 1722-1734.
- Sleep, D.; *Expert. Opin. Drug Deliv.*; 2014; 18: 1-20.
- 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.
- Soares, M. A. G.; de Aquino, P. A.; Costa, T.; Serpa, C.; Chaves, O. A.; *Int. J. Biol. Macromol.*; 2024; 265; 131148.
- Solecki. R. S.; Penguin Press, London.; 1972, 222.
- Song, KS.; Hou, CR.; Liu, L.; Li, XS.; Guo, QX.; *J. Photochem. Photobiol. A*; 2001, 139, 105-109.
- Sotomayor, M. D. T.; Dias, I. L. T.; Lanza, M. R. V.; Moreira, A. B.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova*; 2008; 31, 7; s1.
- 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.

Spinella, R.; Sawhney, R.; Jalan, R.; *Hepatol. Int.*; 2016; 10; 124-132.

Srinivasan, K.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*; 2007; 47; 735-748.

Stan, D.; Matei, I.; Mihaileseu, C; Savin, M.; Matache, M; Hillebrand, M.; Baciu, 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.

Stepanenko, I. N.; Casini, A; Edafe, F.; Novak, M. S.; Arion, V. B.; Dyson, P. J.; Jakupec, M. A.; Kepple, B. K.; *Inorg. Chem.*; 2011; 50; 12669-12679.

Stewart, A. J.; Blindauer, C. A.; Berezenko, S.; Sleep, D.; Tooth, D.; Sadler, P.J.; *FEBS J.*; 2005, 272, 353-362.

Stewart, J. J. P.; *J. Comput. Chem.*; 1989; 10, 2; 209-220.

Stewart, J. J. P.; *J. Mol. Model.*; 2007; 13, 12; 1173-213.

Stewart, J. J. P.; *J. Mol. Model.*; 2013; 19, 1; 1-32.b

Stewart, J. J. P.; MOPAC 2000.00 Manual.Tokyo, JapanFujitsu Limited; 1999.

Stryer, L; Biochemistry, 4 ed, W. H. Freeman and Company, New York; 1995.

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.

Suresh, D. V.; Mahesha, H. G.; Rao, A. G. A.; Srinivasan, K.; *Biopolymers*; 2007; 86; 265-275.

Suryawanshi, V. D.; Anbhule, P. V.; Gore, A. H.; Patil, S. R.; Kolekar, G. B.; *Ind. Eng. Chem. Res.*; 2012; 51; 95-102.

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

Tanowitz, H. B.; Burns, E. R.; Shina, A. K.; Khan, N. M.; Morris, A.S.; Factor S. M.; Hatcher, V. B.; Bilezikian, J. P.; Baum S. G.; Ittner M.; *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 1990; 43, 274-281.

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.

Tavares, W., Manual de ontibióticos e fitoterápicos anti-infecciosos 2^a ed. São Paulo: Atheneu, 1996, 3-13.

Tayyab, S.; Feroz, S. R.; *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*; 2021; 123; 193-218.

Teixeira, D. E.; Benchimol, M.; Paulo Henrique Crepaldi, P. H.; Souza, W.; *PLOS Negl. Trop. Dis.*; 2012; 6; 8; e1749.

Teixeira, D. E.; Benchimol, M.; Crepaldi, P. H.; Souza, W. D.; *PLOS Negl. Trop. Dis.*; 2012; 6, 8; 1-13.

Teixeira, P. C.; Do herbalismo tribal aos remédios florais do Dr. Bach. São José do Rio Preto: São José, 1994, 33.

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.

Thiel, W.; Voityuk, A.; *Theor. Chim. Acta.*, 1992; 81; 391-404.

Thiel, W.; *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*; 2014; 4, 2, 145-157.

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.

Tohm, R.; *Before the dawn of history*, 1951.

Trouiller, P.; Olliari, P.; Torreele, E.; Orbinski, J.; Laing, R.; Ford, N.; *Lancet*; 2002; 359, 2188-2194.

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.

- Turrens, J. F.; Watts Jr., B. P.; Zhong, L.; Docampo, R.; *Mol. Biochem. Parasitol.*; 1996; 82; 125-129.
- Turro, N. J.; Ramamurthy, V.; Scaiani J. C.; *Principles of Molecular Photochemistry*; first ed., University Science Books, 2008.
- Tyler, V. E.; *New York: Columbia University Press*; 1996, 3-10..
- Urbina, J. A.; *Parasitol. Today*; 1994; 10, 107-110.
- 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.
- van der Graaf, P. H.; Benson, N.; *Pharm. Res.*; 2011; 28, 1460-1464.
- 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.
- Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M. *Quim. Nova*, 2005, 28, 519-528.
- Venianakis, T.; Primikyri, A.; Petry, S.; Papamokos, G.; Gerothanassis, I. P.; *Molecules*; 2023; 28; 7991.
- Ventura-Garcia, L.; Roura, M.; Pell, C.; Posada, E.; Gascón, J.; Aldasoro, E.; Pool, R.; *PLoS Negl. Trop. Dis.*; 2013; 7, 9; e2410.
- Venyaminov, S. Y.; Yang, J. T.; *Springer, Boston, MA*; 1996, 69-107.
- Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Christopher W. Murray, C. W.; Taylor, R. D.; *Proteins*; 2003; 52, 4; 609-623.
- Viegas Jr, C.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J.; *Quim. Nova*; 2006, 29 (2), 326-337.
- Vieira, J.; O magistrado e a lei antitóxicos. 2 ed. Rio de Janeiro: Forense, 2004.

Vilela, J. D.; *Rev. Paul. Med.*, 1977, 89, 115

Viotti, R.; Vigliano, C.; Lococo, B.; Bertocchi, G.; Petti, M.; Alvarez, M. G.; Postan, M.; Armenti, A.; *Ann. Intern. Med.*; 2006, 144, 10, 724-734.

Vishwas, D. S.; Prashant, V. A.; Anil, H. G.; Shivajirao, R. P.; Govind, B. K.; *Ind. Eng. Chem. Res.*; 2011; 51; 95.

Visy, J.; Fitios, 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.; Lerrick, 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.

Warnecke, A.; Fichtner, I.; Sass, G.; Kratz, F.; *Arch. Pharm.*; 2007; 340, 8; 389.

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.

Webb, M. I.; Wu, B.; Jang, T.; Chard, R. A.; Wong, E. W. Y.; Wong, M. Q.; Yapp, D. T. T.; Walsby, C. J.; *Chem. Eur. J.*; 2013; 19; 17031-42.

- 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.
- Weissmann, G.; *Scientific American* 1991, 264, 84-90.
- 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.
- Woodward, R. B.; Sondheimer, F.; Taub, D.; Heusler, K.; McLamore, W. M.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1951, 73, 2403-2404.
- 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.
- Yadav, P.; Yadav, J. K.; Dixit, A. K.; Agarwal, A.; Awasthi, S. K.; *Luminescence*; 2019; 34; 812-822.
- 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.; Ma, Z. Y.; Zhang, Y.; Li, G. Q.; Li, M.; Qin, J. K.; Lockridge, O.; Liang, H.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.*; 2013; 84; 549-54.
- Yang, F.; Yue, J.; Ma, L.; Ma, Z.; Li, M.; Wu, X.; Liang, H.; *Mol. Pharm.*; 2012, 9 (11), 3259-3265.
- Yang, F.; Zhang, Y.; Liang, H.; *Int. J. Mol. Sci.*; 2014; 15; 3580-3595.
- 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.; Kurono, 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.a
- Yue, Y.; Zhang, Y.; Qin, J.; Chen, X.; *J. Mol. Struc.*; 2008, 888, 25.b
- Yunes, R. A.; Pedrosa, R. C.; Cechinel Filho, V.; *Quim. Nova*; 2001, 24, 147-152.
- 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.
- Zhang, Y.; Yang, F.; Liang, S.; Zhou, Z.; Wu, X.; Yang, F.; Liang, H.; *Chem. Biol. Drug. Des.*; 2015; 86; 1178-1184.
- Zhang, Y.; Ho, A.; Yue, J.; Kong, L.; Zhou, Z.; Wu, X.; Yang, F.; Liang, H.; *Eur. J Med. Chem.*; 2014; 86; 449-455.
- 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, Y. W.; Brooks, J. G.; Lippard, S. J.; *J. Am. Chem. Soc.*; 2014; 136; 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.
- Zingales, B.; Andrade, S. G.; Briones, M. R. D. S.; Campbell, D. A.; Chiari, E.; Fernandes, O.; Miles, M. A.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 2009; 104,7; 1051-1054.
- Zingales, B.; Miles, M. A.; Campbell, D. A.; Tibayrenc, M.; Macedo, A. M.; Teixeira, M. M. G.; Schijman, A. G.; Llewellyn, M. S.; Lages-Silva, E.; Machado, C. R.; Andrade, S. G.; Sturm, N. R.; *Infect. Genet. Evol.*; 2012; 12; 240-253.

Zingales, B.; Souto, R. P.; Mangia, R. H.; Lisboa, C. V.; Campbell, D. A.; Coura, J. R.; Jansen, A. M.; Fernandes, O.; *Int. J. Parasitol.*; 1998; 28, 105-112.

Zsila, F.; *J. Phys. Chem. B*; 2013, 117 (37), 10798-10806.

Zsila, F.; *Mol. Pharmaceutics*; 2013a, 10 (5), 1668-1682.

Zunzain, P. A.; Ghuman, J.; Komatsu, T.; Tsuchida, E.; Curry, S.; *BMC Struct. Biol.*; 2003, 3, 6.

Zunzain, P. A.; Ghuman, J.; McDonagh, A. F.; Curry, S.; *J. Mol. Biol.*; 2008, 381, 394-406.

7. Anexo: Produção científica

Journal of Molecular Liquids 407 (2024) 125247



Evaluation of the interaction between new trypanocide 1,2,4-triazolo-3-thiones with human serum albumin

Gabriel F. Rio ^a, Larissa Henriques E. Castro ^a, Gabriela S.R. Souza ^a, Otávio Augusto Chaves ^b, Marco Edilson Freire de Lima ^c, Darf Cesarin-Sobrinho ^c, Carlos Mauricio R. Sant'Anna ^{d,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000, Seropédica, Brazil

^b CQC-IMS, Departamento de Química, Universidade de Coimbra, Rua Larga s/n, 3004-535 Coimbra, Portugal

^c Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000, Seropédica, Brazil

^d Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000, Seropédica, Brazil



ARTICLE INFO

We dedicate this paper to Prof. Aurelio Baird Buarque Ferreira (*in memoriam*).

Keywords

Trypanosoma cruzi
Piperine derivatives
Molecular hybridization
1, 2,4-triazole-3-thioether
Human serum albumin

ABSTRACT

There is a strong demand for the development of new drugs for the treatment of Chagas disease, a neglected tropical disease. This work investigates human serum albumin (HSA) interaction with a new series of 1,2,4-triazolo-3-thiones derived from piperine (**1b**, **1c**, **1d**, and **1e**), which were demonstrated by our group to present trypanocide activity in the low micromolar range. The study was carried out by spectroscopic techniques, including UV-vis absorption, circular dichroism, steady-state and time-resolved fluorescence combined with theoretical calculations (molecular docking). The binding is spontaneous ($\Delta G^\circ < 0$) and strong ($K_a \approx 10^5 \text{ M}^{-1}$), resulting in a non-conventional ground state association (there is a combination of static and dynamic quenching mechanisms). The positive values of ΔH° and ΔS° are indicative that the binding is entropically driven and suggest that the interaction between the compounds and HSA is governed by hydrophobic interactions. Interestingly, competitive binding results show that compounds containing a cyclohexyl substituent at N_4 (**1c** and **1e**) bind preferentially to Sudlow's site I, whereas compounds containing a phenylethyl substituent at N_4 (**1b** and **1d**) bind preferentially to Sudlow's site II. Docking results indicate that the interaction profiles of **1c** and **1e** to Sudlow's site I are quite similar, as are those of **1b** and **1d** in Sudlow's site II. In all cases, the interactions are predominantly hydrophobic, in accordance with the thermodynamic data. The favorable interaction profiles with HSA should have a positive effect on the pharmacokinetics of the trypanocide piperine derivatives and probably a major influence on their *in vivo* efficacy.

1. Introduction

Discovered by Carlos Chagas in 1909, Chagas disease, or American trypanosomiasis, is a neglected tropical disease (NTD) caused by a parasite, *Trypanosoma cruzi* [1a,b]. About 6 million people are estimated to be affected worldwide by Chagas disease, with most cases concentrated in Latin America, and 75 million people are at risk of infection. Around 30,000 new cases are registered annually, causing approximately 12,000 deaths per year [2].

The number of drugs currently approved for the treatment of Chagas disease are limited to only two nitroheterocycles (nifurtimox and benznidazole), both presenting severe side effects leading to high rates of treatment abandonment [3–5]. Chagas disease has two phases in humans, acute and chronic, and the medications available for its

treatment are generally only effective in the acute phase, showing low effectiveness in the chronic phase, which is the most common phase in detecting the infection. As a step towards changing this situation, the development of new drugs with new mechanisms of action would be of great importance [3].

In the search for drug candidates, the consideration of aspects related to both pharmacokinetics and pharmacodynamics from the initial phase of their development has been advocated by both regulatory agencies and pharmaceutical research organizations as a way to improve efficiency and productivity in drug research and development [6].

Several aspects are involved in pharmacokinetics, including the distribution of drugs in the human body. Human serum albumin (HSA) is an important protein related to the distribution efficiency of drugs and other substances throughout the human body [7,8]. Serum albumins,

* Corresponding author.

E-mail address: santanna@ufrj.br (C.M.R. Sant'Anna).

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.125247>

Received 2 December 2023; Received in revised form 30 May 2024; Accepted 9 June 2024

Available online 13 June 2024

0167-7322/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.