

**“Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais**

**DEBORA NALIATI DE VASCONCELOS**

**Estudo e Aplicação de Sondas Moleculares Baseadas em Dicroísmo Circular  
Induzido para Determinação de Sítios de Ligação em Albumina e  
Caracterização de Agregados Amilóides**

**BAURU (SP)**

**2019**

DEBORA NALIATI DE VASCONCELOS

**Estudo e Aplicação de Sondas Moleculares Baseadas em Dicroísmo Circular  
Induzido para Determinação de Sítios de Ligação em Albumina e  
Caracterização de Agregados Amilóides**

Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Doutor à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração “Química dos Materiais”, sob a orientação do Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes.

**BAURU (SP)**

**2019**

Vasconcelos, Debora Naliati de.

Estudo e Aplicação de Sondas Moleculares Baseadas em Dicroísmo Circular Induzido para Determinação de Sítios de Ligação em Albumina e Caracterização de Agregados Amilóides / Debora Naliati de Vasconcelos, 2019

158 p. : il., tabs.

Orientador: Valdecir Farias Ximenes

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2019

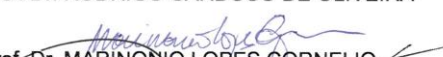
1. Fluorescência. 2. Dicroísmo circular induzido. 3. Vermelho Congo. 4. Albumina. 5. Divanilato de metila. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE DEBORA NALIATI DE VASCONCELOS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS , DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.**

Aos 21 dias do mês de fevereiro do ano de 2019, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro do Departamento de Química, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES - Orientador(a) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru, Prof. Dr. RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, Prof. Dr. MARINONIO LOPES CORNELIO do(a) Departamento de Física / UNESP / Câmpus de São José do Rio Preto, Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, Prof. Dr. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de DEBORA NALIATI DE VASCONCELOS, intitulada **Estudo e Aplicação de Sondas Moleculares em Dicroísmo Circular Induzido para Determinação de Sítios de Ligação em Albumina e Caracterização de Agregados Amilóides**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVA DA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

  
Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES

  
Prof. Dr. RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA

  
Prof. Dr. MARINONIO LOPES CORNELIO

  
Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO

  
Prof. Dr. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA

A BANCA SUGERE ALTERAÇÃO DO TÍTULO PARA:

ESTUDO E APLICAÇÃO DE SONDAS MOLECULARES BASEADAS EM DICROÍSMO CIRCULAR INDUZIDO PARA DETERMINAÇÃO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO EM ALBUMINA E CARACTERIZAÇÃO DE AGREGADOS AMILÓIDES.

PROF. DR. ROBERTO CARLOS DE OLIVEIRA  
PROF. DR. ROBERTO CARLOS DE OLIVEIRA  
PROF. DR. ROBERTO CARLOS DE OLIVEIRA  
PROF. DR. ROBERTO CARLOS DE OLIVEIRA  
PROF. DR. ROBERTO CARLOS DE OLIVEIRA

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes que considero um excelente professor e orientador, sempre auxiliando de forma bastante simples e com muita paciência nas incontáveis dúvidas que surgiram durante a realização deste trabalho.

Aos Doutores Ana Ligia Scott, Angelica Nakagawa Lima e Eric Allison Philot que contribuíram com os estudos de *docking*, sendo este um estudo significativo para que pudéssemos concluir nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo Robinson de Souza e Izabelle Amorim Ferreira Boza pela ajuda e orientação nos estudos teóricos deste trabalho.

Ao meu pai Antonio, minha mãe Regina e aos meus irmãos, principalmente a minha irmã Hosana, por acreditarem em mim desde o início dessa jornada. Pelo amor, carinho, exemplo e apoio incondicional.

Aos meus avós pela constante lição de vida. Estejam onde estiverem essa vitória também pertence a vocês

A todos os professores que contribuíram com a minha formação, enriquecendo meu conhecimento na vida acadêmica.

Aos meus amigos, que sempre compreenderam a importância do doutorado para mim, pelo apoio, por acreditarem que eu era capaz e pela força nos momentos difíceis.

Aos meus amigos de trabalho que sempre deram apoio e contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial para Cristiane, Disnéia e Sebastiana pela amizade, companheirismo, ajuda e, principalmente, pelas risadas.

Não tenho como citar todos que contribuíram para concretização desta etapa, foram muitas pessoas, as quais sempre estiveram ao meu lado. A todos, meu muito obrigada pelo apoio.

Finalmente, gostaria de agradecer à UNESP pelo ensino gratuito de qualidade, à CAPES, à FAPESP sem os quais essa dissertação dificilmente poderia ter sido realizada. E a todos, que mesmo não citados, colaboraram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

Dedico esta tese aos meus familiares, amigos, professores e às demais pessoas que de alguma forma me ajudaram a trilhar esse caminho.

“Não há progresso sem esforço, vitória sem luta,  
aperfeiçoamento sem sacrifício, como não existe  
tranquilidade sem paciência”.

Chico Xavier



## RESUMO

A proteína presente no plasma sanguíneo e conhecida como albumina humana possui inúmeras funções fisiológicas e propriedades como o transporte de fármacos e metabólitos na corrente sanguínea. Neste sentido, quando se estuda as características farmacocinéticas de um novo fármaco, entre as propriedades estudadas, busca-se elucidar a capacidade de ligação do mesmo na albumina e caracterizar o sítio de ligação da mesma. Neste projeto, estudamos as características espectroscópicas e biofísicas do corante vermelho Congo (VC) como potencial sonda para caracterização dos sítios de ligação da albumina e caracterização de agregados amiloidais. Os ensaios de supressão de fluorescência e dicroísmo circular induzido (ICD) revelaram uma forte associação entre VC e a albumina de soro bovina (BSA). Ensaios de deslocamento de sondas fluorescentes e alteração do espectro de ICD revelaram que o corante VC pode se ligar nos sítios I e II da BSA. Agregados proteicos com características de fibrilas amiloidais foram preparados por aquecimento da BSA a 70°C e caracterizados por fluorescência de tioflavina-T e espalhamento de luz Rayleigh. Observamos um deslocamento no sinal de ICD do VC ligado aos agregados. A monitoração do sinal de ICD em função do aumento de temperatura revelou uma típica curva de alteração de fase da proteína. Considerando que, quando presente, um sinal de ICD pode ser bastante específico e não sujeito às influências espectrais dos compostos presentes, propomos que esta técnica espectroscópica possa ser utilizada para auxílio na elucidação de sítios de ligação da albumina e estudos da formação de agregados amiloidais em proteínas. Estudamos também as características espectroscópicas e biofísicas do ligante divanilato de metila (DV) como potencial sonda para caracterização dos sítios de ligação da albumina e caracterização de agregados amiloidais. Combinado com os testes experimentais foram realizados os estudos de *docking* molecular da interação DV e albumina. Os ensaios de supressão de fluorescência e dicroísmo circular revelaram uma forte associação entre DV e as proteínas HSA e BSA. Os estudos de deslocamento de ligantes e alteração do sinal de ICD do DV demonstraram que o DV é capaz de se ligar a mais de um local de ligação da albumina, sítios I e II, no en-

tanto, não foi possível distinguir em qual sítio estaria mais propenso a ocorrer a ligação. A monitoração do sinal de ICD do DV em função da temperatura revelou uma alteração na estrutura da proteína quando submetida a um aumento de temperatura que levou a perda da capacidade de ligação ao DV, como demonstrado pela perda total do sinal de ICD do DV. Contudo esses resultados não permitem o uso do mesmo como um indicativo analítico de formação de agregados amiloidais, como apresentado para o vermelho Congo. Os estudos termodinâmicos e *docking* molecular indicaram que as forças de interações predominantes entre DV e as proteínas são interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio.

**Palavras-chave:** Fluorescência; Dicroísmo Circular Induzido; Vermelho Congo; Albumina; Divanilato de metila; Proteínas Amilóides.

## ABSTRACT

The protein present in blood plasma and known as human albumin has countless physiological functions, including transporting drugs and metabolites in the bloodstream. In this regard, when studying pharmacokinetic characteristics of a new drug, between the properties studied, it is common to elucidate its binding capacity in albumin and to characterize the binding site of the drug. In this project, we studied the spectroscopic and biophysical characteristics of Congo Red (CR) dye as a potential probe to characterize the albumin binding sites and amyloid aggregates. The fluorescence quenching tests and induced circular dichroism (ICD) showed a strong association between CR and bovine serum albumin (BSA). Displacement tests of fluorescent probes and change in the ICD spectrum revealed that the CR dye may bind to sites I and II of BSA. Protein aggregates with features of amyloid fibrils were prepared by heating the BSA at 70 °C and characterized by thioflavin-T fluorescence and Rayleigh light scattering. We observed a shift in the ICD signal CR connected to the aggregates. When monitoring the ICD signal as a function of temperature, a typical phase change curve was obtained. Considering that, when present, an ICD can be a quite specific signal and not subject to spectral influences of the compounds, we proposed that this spectroscopic technique could be used to aid in the elucidation of the binding sites of the albumin and for the studies of the formation of amyloid aggregates in proteins. We have also studied the spectroscopic and biophysical characteristics of the methyl divanilate (DV) ligand as a potential probe for the characterization of albumin binding sites and the characterization of amyloid aggregates. Combined with the experimental tests, molecular docking studies of the DV interaction and albumin were conducted. Fluorescence suppression and circular dichroism tests revealed a strong association between DV and the HSA and BSA proteins. The study of ligands displacement and alteration of the DV ICD signal have demonstrated that DV is capable of binding to more than one albumin binding site, sites I and II, however, it was not possible to distinguish in which site it would be more prone to binding. The monitoring of ICD signal DV as a function of temperature revealed an

alteration in the protein structure when subjected to an increase in temperature which led to loss in DV's binding capacity, as demonstrated by the total decrease of ICD signal DV. However, these results do not allow the use of ICD signal DV as an analytical indicative of amyloid aggregate formation, as presented for Congo red. The thermodynamic studies and molecular docking have indicated that the predominant interacting forces between DV and proteins are hydrophobic interactions and hydrogen bonds.

**Keywords:** Fluorescence; Induced Circular Dichroism; Congo Red; Albumin; Methyl Divanylate; Amyloid Protein.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura da HSA e BSA indicando as localizações aproximadas dos triptofanos: Trp 214, 212 e 134. ....	6
<b>Figura 2</b> – Estrutura molecular da fenilalanina, tirosina e triptofano. ....	7
<b>Figura 3</b> - Isomerização conformacional da BSA. pH 4.3 – transição forma normal (N) para forma <i>fast</i> (F). pH 2.7 – Forma <i>fast</i> (F) para a forma estendida (E).....	8
<b>Figura 4</b> – Estrutura da albumina indicando a subdivisão em domínios (I-III) e subdomínios (A e B) e as localizações aproximadas dos sítios de ligação. ....	9
<b>Figura 5</b> - Estrutura cristalina da HSA complexada com (a) varfarina e (b) ibuprofeno. ....	11
<b>Figura 6</b> - Representação esquemática do possível mecanismo de formação de fibrilas amilóides por uma proteína globular. ....	17
<b>Figura 7</b> - Representação esquemática do desdobramento de proteínas em função da energia livre de Gibbs e hidratação. ....	18
<b>Figura 8</b> - Estrutura da tioflavina-T. ....	21
<b>Figura 9</b> – Estrutura molecular do vermelho Congo. ....	23
<b>Figura 10</b> – Atropoisômeros do ácido 6,6'-dinitro-2,2'-difênico. ....	26
<b>Figura 11</b> – Sistema biarilo (1) atropos (2-3) tropos. ....	27
<b>Figura 12</b> – Estrutura molecular do vanilato de metila. ....	29
<b>Figura 13</b> - Diagrama de Jablonsk ilustrando os diversos níveis de energia e suas transições. (S <sub>0</sub> ) estado fundamental de singleto, (S <sub>n</sub> ) estado excitado singleto, (S <sub>1</sub> ) primeiro estado excitado de singleto, (T <sub>n</sub> ) estado excitado tripleto. ....	31
<b>Figura 14</b> - Espectro de emissão da BSA (2 μmol L <sup>-1</sup> ) na presença de VC (0-2 μmol L <sup>-1</sup> ) em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0 a 20°C, com excitação em 295 nm e emissão de 310 a 450 nm. ....	61
<b>Figura 15</b> - Espectro de UV-Vis da BSA (2 μmol L <sup>-1</sup> ) na presença de VC (0-2 μmol L <sup>-1</sup> ) em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0 a 20°C. ....	62
<b>Figura 16</b> - Gráfico de Stern-Volmer da BSA (2 μmol L <sup>-1</sup> ) na presença de VC (0-2 μmol L <sup>-1</sup> ) em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, com excitação em 295 nm e emissão entre 310 e 450 nm, nas temperaturas de 293, 302 e 310 K. ....	63
<b>Figura 17</b> - Gráfico de Stern-Volmer modificado (Forma logarítmica) da BSA (5 μmol L <sup>-1</sup> ) na presença de VC (0-8 μmol L <sup>-1</sup> ) em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, com excitação em 295 nm e emissão entre 310 e 450 nm, a 25 °C. ....	66
<b>Figura 18</b> - Estrutura molecular do vermelho Congo, destacando as ligações simples onde qualquer barreira energética poderia impedir a livre rotação levando a uma molécula quiral. ....	68

<b>Figura 19</b> - A) Elipticidade induzida em VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) por BSA (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C. B) Espectros de UV-Vis do VC (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença e na ausência de BSA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.....	68
<b>Figura 20</b> - Ensaio de deslocamento de sondas fluorescentes: A) Espectro de emissão da BSA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DG (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e VC (0-5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C com excitação em 340 nm. B) Espectro de emissão da BSA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DNSA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e VC (0-5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C com excitação em 340 nm.....	70
<b>Figura 21</b> - Efeito da adição de varfarina (0-120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no espectro de ICD do complexo BSA:VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.....	72
<b>Figura 22</b> - Efeito da adição de fenilbutazona (0-120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no espectro de ICD do complexo BSA:VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.....	73
<b>Figura 23</b> - Efeito da adição de ibuprofeno (0-120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no espectro de ICD do complexo BSA:VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.....	74
<b>Figura 24</b> - Efeito da adição de naproxeno (0-120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no espectro de ICD do complexo BSA:VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.....	74
<b>Figura 25</b> - Efeito da adição de dansilglicina (0-120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no espectro de ICD do complexo BSA:VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.....	75
<b>Figura 26</b> - Efeito da adição de digitoxina (0-120 $\mu\text{M}$ ) no espectro de ICD do complexo BSA:VC (30 $\mu\text{M}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.....	75
<b>Figura 27</b> - Espectro de emissão da BSA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), VC (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e do complexo BSA:VC (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C com excitação em 350 nm e varredura de emissão em 300-400 nm.....	78
<b>Figura 28</b> - Espectro de fluorescência sincronizada ( $\Delta\lambda=15$ nm): BSA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), VC (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e complexo BSA:VC (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C com excitação/emissão em 250-500 nm.....	79
<b>Figura 29</b> - Espectro de fluorescência sincronizada ( $\Delta\lambda=60$ nm): BSA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), VC (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e complexo BSA:VC (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C com excitação/emissão em 250-500 nm.....	80
<b>Figura 30</b> - Espectro de CD da BSA (1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e do complexo BSA:VC (1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.....	81
<b>Figura 31</b> - Curva de desnaturação térmica da BSA (1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e do complexo BSA:VC (1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C, a um comprimento de onda fixo de 222 nm.....	82

<b>Figura 32</b> – Espectro de fluorescência com excitação em 295 nm do complexo BSA:VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na ausência e na presença dos oxidantes HOBr, HOCl e Tau-NHBr, ambos (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Experimentos realizados em tampão fosfato, 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.....	84
<b>Figura 33</b> - Espectro de ICD do complexo BSA:VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na ausência e na presença dos oxidantes HOBr, HOCl e Tau-NHBr, ambos (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Experimentos realizados em tampão fosfato, 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.....	85
<b>Figura 34</b> - Espectro de ICD do complexo BSA:VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na ausência e na presença dos oxidantes HOBr, HOCl e Tau-NHBr, ambos (600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Experimentos realizados em tampão fosfato, 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.....	85
<b>Figura 35</b> - Espectro de CD do complexo BSA:VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na ausência e na presença dos oxidantes HOBr, HOCl e Tau-NHBr, ambos (600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Experimentos realizados em tampão fosfato, 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.....	86
<b>Figura 36</b> - Espectro de ICD UV próximo para o complexo BSA:VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em diferentes temperaturas (30-90 °C). Experimentos realizados em tampão fosfato, 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0.....	87
<b>Figura 37</b> - Efeito da temperatura no espectro de ICD para complexo BSA:VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Experimentos realizados em tampão fosfato, 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0, variando a temperatura de 30 a 90°C. a) Mudança do espectro de ICD a 490. b) Medidas simultâneas de ICD a 490 e 536 nm. ....	88
<b>Figura 38</b> - Comparação da alteração induzida por temperatura na BSA seguida de alterações secundárias (222 nm), terciárias (262 nm) e ICD (490 nm). (a) As misturas consistiram em BSA 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , vermelho Congo 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,05 mol $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0. Para a medida a 222 nm, as soluções foram diluídas para 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . (b) Adaptação sigmoideal Boltzmann para determinação do ponto médio das curvas (software GraphPad Prisma 5,0).....	89
<b>Figura 39</b> - Efeito da temperatura no espectro de emissão da BSA (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de Th-T (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) com excitação em 435 nm, em pH 7,0.....	91
<b>Figura 40</b> - Efeito da temperatura no espectro de dispersão de Rayleigh da BSA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) a 20 e 70°C, em pH 7,0.....	91
<b>Figura 41</b> - Efeito da temperatura no espectro de UV-vis do complexo BSA: VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em pH 7,0. ....	92
<b>Figura 42</b> - Efeito da temperatura no espectro de ICD do VC na concentração final de (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), em pH 7,0. ....	93
<b>Figura 43</b> - Espectro de ICD UV próximo para o complexo BSA:VC (30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em diferentes temperaturas (35-85 °C), na ausência e na presença de metais: a) Complexo	

BSA:VC; b) Sulfato de Magnésio ( $2,5 \times 10^3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); c) Cloreto de Zinco II ( $2,5 \times 10^3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Experimentos realizados em tampão fosfato, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.....	95
<b>Figura 44</b> - Ativação do persulfato de potássio pelo $\text{Fe}^{+2}$ com formação do radical sulfato ( $\text{SO}_4\cdot^-$ ).....	96
<b>Figura 45</b> - Ataque do radical sulfato ao grupo hidroxila do vaniladto com formação do radical fenoxila.....	96
<b>Figura 46</b> – Formação da molécula de divanilato.....	97
<b>Figura 47</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o divanilato $\delta$ (ppm). .....	98
<b>Figura 48</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para o divanilato $\delta$ (ppm). .....	99
<b>Figura 49</b> - Cromatograma: Vanilato ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), DV controle ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), DV sintetizado ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Condições: Coluna de fase reversa C18, fluxo de $5 \text{ mL/ min}$ , solvente A (solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%) e solvente B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), gradiente para solvente A (80% a 20%) em 20 min, monitorado em 230 a 600 nm.....	100
<b>Figura 50</b> - Espectro de emissão: a) BSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e b) HSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DV ( $0-2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a $20^\circ\text{C}$ , com excitação em 295 nm e emissão de 310 a 450nm.....	101
<b>Figura 51</b> - Gráfico de Stern-Volmer: a) BSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e b) HSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DV ( $0-2 \mu\text{M}$ ) em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, com excitação em 295 nm e emissão de 310 a 450 nm, a $20^\circ\text{C}$ .....	102
<b>Figura 52</b> - Gráfico obtido pela regressão não linear da equação 9 para o cálculo da constante de ligação: a) BSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e b) HSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DV ( $0-2,5 \mu\text{M}$ ) em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, com excitação em 295 nm e emissão de 310 a 450 nm, a $20^\circ\text{C}$ .....	104
<b>Figura 53</b> - Gráfico obtido pela regressão não linear da equação 9, em diferentes temperaturas, para o cálculo da constante de ligação: a) BSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e b) HSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DV ( $0-2 \mu\text{M}$ ) em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, com excitação em 295 nm e emissão de 310 a 450 nm, a $20^\circ\text{C}$ e $40^\circ\text{C}$ .....	105
<b>Figura 54</b> - Gráfico da sobreposição do espectro de emissão (proteína) e absorção (DV) para os sistemas: a) BSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e DV ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); b) HSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e DV ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a $20^\circ\text{C}$ , com excitação em 295 nm e emissão de 310 a 450nm. ....	108
<b>Figura 55</b> – a) Elipticidade induzida em DV ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) por: a) BSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); b) HSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a $25^\circ\text{C}$ .....	110
<b>Figura 56</b> – a) Elipticidade induzida em DV ( $0-30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) por BSA ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), em	



tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0 a 25°C. b) Comportamento não linear dos sinais de ICD de BSA na presença de diversas concentrações de DV (0-30 μmol L <sup>-1</sup> ). Sinal observado em 312 nm. ....	112
<b>Figura 57</b> – a) Elipticidade induzida em DV (0-30 μmol L <sup>-1</sup> ) por HSA (10 μmol L <sup>-1</sup> ), em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0 a 25°C. b) Comportamento não linear dos sinais de ICD de HSA na presença de diversas concentrações de DV (0-30 μmol L <sup>-1</sup> ). Sinal observado em 292 nm. ....	112
<b>Figura 58</b> - Ensaio de deslocamento de sondas fluorescêntes: a) Espectro de emissão da BSA (5 μmol L <sup>-1</sup> ) na presença de DG (5 μmol L <sup>-1</sup> ) e DV (0-30 μmol L <sup>-1</sup> ) em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0 a 25°C com excitação em 340 nm. b) Espectro de emissão da HSA (5 μmol L <sup>-1</sup> ) na presença de DG (5 μmol L <sup>-1</sup> ) e DV (0-15 μmol L <sup>-1</sup> ) em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0 a 25°C com excitação em 340 nm. c) Comparação da queda do máximo de fluorescência da BSA provocada pela adição de ligantes de sítio I, sítio II e DV. d) Comparação da queda do máximo de fluorescência da HSA provocada pela adição de ligantes de sítio I, sítio II e DV. ....	114
<b>Figura 59</b> - Ensaio de deslocamento de ligantes de sítio I: a) Espectro de emissão da BSA (5 μmol L <sup>-1</sup> ) na presença de varfarina (5 μmol L <sup>-1</sup> ) e DV (0-10 μmol L <sup>-1</sup> ) em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0 a 25°C com excitação em 310 nm. b) Espectro de emissão da HSA (5 μmol L <sup>-1</sup> ) na presença de varfarina (5 μmol L <sup>-1</sup> ) e DV (0-10 μmol L <sup>-1</sup> ) em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0 a 25°C com excitação em 310 nm. c) Comparação da queda do máximo de fluorescência da BSA provocada pela adição de ligantes de sítio I, Sítio II e DV. d) Comparação da queda do máximo de fluorescência da HSA provocada pela adição de ligantes de sítio I, Sítio II e DV.....	115
<b>Figura 60</b> - Efeito da adição de varfarina (0-60 μmol L <sup>-1</sup> ) no espectro de ICD do complexo: a) DV:BSA (30 μmol L <sup>-1</sup> ). b) DV:HSA (30 μmol L <sup>-1</sup> ). ....	117
<b>Figura 61</b> – Efeito da adição de ibuprofeno (0-60 μmol L <sup>-1</sup> ) no espectro de ICD do complexo: a) DV:BSA (30 μmol L <sup>-1</sup> ). b) DV:HSA (30 μmol L <sup>-1</sup> ). ....	118
<b>Figura 62</b> – Efeito da adição de digitoxina (0-60 μmol L <sup>-1</sup> ) no espectro de ICD do complexo: a) DV:BSA (30 μmol L <sup>-1</sup> ). b) DV:HSA (30 μmol L <sup>-1</sup> ). ....	119
<b>Figura 63</b> - Efeito da temperatura no espectro de emissão: a) BSA (30 μmol L <sup>-1</sup> ) e b) HSA (30 μmol L <sup>-1</sup> ) na presença de Th-T (30 μmol L <sup>-1</sup> ) com excitação em 435 nm, em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0 a 20°C e 70°C. Efeito da temperatura no espectro de ICD do DV nas concentrações de (0-30 μmol L <sup>-1</sup> ), na presença de: c) BSA (30 μmol L <sup>-1</sup> ) e d) HSA (30 μmol L <sup>-1</sup> ) em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0 a 20°C e 70°C. ....	120
<b>Figura 64</b> - Estruturas terciárias sobrepostas da BSA e HSA. As estruturas da BSA foram	

retirados do Protein Data Bank sob os códigos 3V03 (em vermelho) e 4OR0 (em verde), enquanto que as estruturas da HSA estão sob os códigos 1AO6 (em azul) e 1E7A (em amarelo).....	122
<b>Figura 65</b> - Poses encontradas do divanilato na HSA no sítio I. a) PDB 1AO6 - cluster de menor energia e também o mais populoso (CI1); b) PDB 1E7A - cluster de menor energia (CI1); e c) PDB 1E7A - cluster mais populoso (CI8). .....	124
<b>Figura 66</b> - Poses encontradas do divanilato na HSA no sítio II. a) PDB 1AO6 - cluster de menor energia (CI1); b) PDB 1AO6 - cluster mais populoso (CI2); e c) PDB 1E7A - cluster de menor energia e também o mais populoso (CI1). .....	125
<b>Figura 67</b> - Interações encontradas no <i>docking</i> da HSA (PDB 1AO6) com o divanilato no sítio I, cluster de menor energia e também o mais populoso (CI1). a) Ligação de Hidrogênio; b) Contatos Hidrofóbicos.....	129
<b>Figura 68</b> - Interações encontradas no <i>docking</i> da HSA (PDB 1E7A) com o divanilato no sítio I, cluster mais populoso (CI8). a) Ligação de Hidrogênio; b) Contatos Hidrofóbicos; c) Cátion-Pi; d) $\pi$ - $\pi$ T-shaped.....	130
<b>Figura 69</b> - Interações encontradas no <i>docking</i> da HSA (PDB 1AO6) com o divanilato no sítio II, cluster mais populoso (CI2). a) Ligação de Hidrogênio; b) Contatos Hidrofóbicos...	131
<b>Figura 70</b> - Interações encontradas no <i>docking</i> da HSA (PDB 1E7A) com o divanilato no sítio II, cluster de menor energia e também o mais populoso (CI1). a) Ligação de Hidrogênio; b) Contatos Hidrofóbicos; c) Cátion-Pi; d) $\pi$ - $\pi$ T-shaped. ....	132

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Constantes de Stern–Volmer (ksv) e constante bimolecular do quenching (Kq) para interação entre VC e BSA em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, em diferentes temperaturas. ....	63
<b>Tabela 2</b> - Constantes de Stern–Volmer (ksv) e constante bimolecular de quenching (kq) para interação entre DV e proteínas, em tampão fosfato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, a 20°C .....	102
<b>Tabela 3</b> - Constante de ligação e parâmetros termodinâmicos dos sistemas DV-HSA e DV-BSA em diferentes temperaturas. ....	105
<b>Tabela 4</b> - Valores de Área (J), Distância de Förster (R <sub>0</sub> ), Eficiência de Transferência de Energia (E) e Distância entre DV e Proteína (r) dos sistemas DV-BSA e DV-BSA. ....	109
<b>Tabela 5</b> - Resultados do <i>Docking</i> para o cluster de menor e maior energia: número de clusters, energias de Ligação em kcal/mol, população (%) e localização. ....	123
<b>Tabela 6</b> - Número de interações no Sítio I. ....	126
<b>Tabela 7</b> - Número de interações no Sítio II. ....	126
<b>Tabela 8</b> - Interações específicas entre o Divanilato e os resíduos do sítio I da albumina..	127
<b>Tabela 9</b> - Interações específicas entre o Divanilato e os resíduos do sítio II da albumina. ....	128

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**A:** Absorbância

**ANS:** Ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato

**BSA:** Albumina de Soro Bovina

**C:** Concentração Molar

**CD:** Dicroísmo Circular

**Cys:** Cisteína

**DG:** Dansilglicina

**Di:** Digitoxina

**DMSO:** Dimetil Sulfóxido

**DNSA:** Dansilamida

**DV:** Divanilato de metila

**EFI:** Efeito de Filtro Interno

**EFS:** Espectro de Fluorescência Sincronizado

**F:** Fluorescência

**Far-UV-CD:** Dicroísmo Circular Ultravioleta Distante

**FB:** Fenilbutazona

**F<sub>corr</sub>:** Fluorescência Corrigida

**HSA:** Albumina Soro Humana

**I:** Caminho Óptico

**IB:** Ibuprofeno

**ICD:** Dicroísmo Circular Induzido

**K<sub>a</sub>:** Constante de Ligação

**kg:** Quilograma

**k<sub>q</sub>:** Constante de Supressão Bimolecular

**k<sub>sv</sub>:** Constante de Supressão de Stern Volmer

**I:** Quantidade de Luz Transmitida

**$I_0$** : Quantidade de Luz Incidente

**LHCP**: Luz Circularmente Polarizada para Esquerda

**Near-UV-CD**: Dicroísmo Circular Ultravioleta Próximo

**NX**: Naproxeno

**pH**: Potencial Hidrogeniônico

**Phe**: Fenilalanina

**RHCP**: Luz Circularmente Polarizada para Direita

**RNA**: Ácido Ribonucléico

**$T_{50}$** : Valor Médio de Desnaturação

**Th-T**: Tioflavina-T

**Trp**: Triptofano

**Tyr**: Tirosina

**UV**: Ultravioleta

**UV-Vis**: Espectroscopia de Absorção nas Regiões do Ultravioleta e Visível

**V**: Varfarina

**VC**: Vermelho Congo

**Å**: Ångström

**°C**: Graus Celsius

**$\epsilon$** : Ceficiente de Absortividade Molar

**$\Delta\lambda$** : Delta Lambda

**$\lambda$** : Comprimento de Onda

**$\lambda_{em}$** : Comprimento de Onda de Emissão

**$\lambda_{ex}$** : Comprimento de Onda de Excitação

**$\tau_0$** : Tau (Tempo Médio de Vida sem Supressão)

**[Q]**: Concentração do Supressor

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>3</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
<b>3.1 Albumina</b> .....	<b>4</b>
<b>3.1.1 Estrutura Molecular e Propriedades Químicas</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1.2 Interação de Drogas com Albumina</b> .....	<b>11</b>
<b>3.2 Amiloidose</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2.1 Estrutura das Fibras Amiloidais</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2.2 Mecanismo de Agregação de Proteínas</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2.3 Indução de Agregação em Proteínas</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.4 Técnicas Analíticas de Caracterização de Agregados Amilóides</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3 Vermelho Congo</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3.1 Propriedades Químicas do Vermelho Congo</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3.2 Aplicações do Vermelho Congo</b> .....	<b>24</b>
<b>3.4 Quiralidade em Compostos Biarílicos</b> .....	<b>25</b>
<b>3.5 Vanilato de Metila</b> .....	<b>28</b>
<b>3.6 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS APLICADAS NESTE ESTUDO</b> .....	<b>30</b>
<b>3.6.1 Espectroscopia de Fluorescência</b> .....	<b>30</b>
<b>3.6.2 Supressão de Fluorescência</b> .....	<b>34</b>
<b>3.6.3 Constante de Ligação</b> .....	<b>36</b>
<b>3.6.4 Determinação dos Sítios de Ligação em Albumina</b> .....	<b>36</b>
<b>3.6.5 Efeito de Filtro Interno</b> .....	<b>37</b>
<b>3.6.6 Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência (FRET)</b> .....	<b>38</b>
<b>3.7 Dicroísmo Circular (CD)</b> .....	<b>40</b>
<b>3.7.1 Dicroísmo Circular Induzido</b> .....	<b>41</b>
<b>3.8 <i>Docking</i> Molecular</b> .....	<b>42</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1 Reagentes e Soluções</b> .....	<b>44</b>
<b>4.2 Preparo de Soluções</b> .....	<b>44</b>
<b>4.2.1 BSA</b> .....	<b>45</b>
<b>4.2.2 Dansilglicina</b> .....	<b>45</b>
<b>4.2.3 Vermelho Congo</b> .....	<b>45</b>
<b>4.2.4 Tampão Fosfato pH 7,0</b> .....	<b>45</b>
<b>4.2.5 Dansilamida</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2.6 Ibuprofeno</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2.7 Varfarina</b> .....	<b>46</b>

4.2.8 Naproxeno .....	46
4.2.9 Digitoxina .....	47
4.2.10 Fenilbutazona.....	47
4.2.11 Divanilato de Metila.....	47
4.2.12 Vanilato de Metila .....	47
4.2.13 Tioflavina-T .....	48
4.2.14 Ácido Hipocloroso, Ácido Hipobromoso e Taurina Bromamina.....	48
4.2.15 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) .....	48
4.2.16 Cloreto de Cobre II.....	48
4.2.17 Cloreto de Zinco.....	49
4.2.18 Sulfato de Magnésio .....	49
4.2.19 Ácido 8-Anilino-1-naftaleno-sulfonato (ANS).....	49
4.2.20 HSA.....	49
4.3 Procedimento.....	50
4.3.1 Ensaios de Fluorescência, Quenching e Correção de Filtro .....	50
4.3.2 Efeito da Elipticidade Induzida em Vermelho Congo e Divanilato de metila .....	50
4.3.3 Ensaio de Deslocamento Utilizando Sondas Fluorescentes .....	51
4.3.4 Ensaio de Deslocamento Utilizando Ligante de Sítio I.....	51
4.3.5 Efeito dos Ligantes de Sítio I, II e III da Albumina na Elipticidade Induzida em Vermelho Congo e Divanilato .....	52
4.3.7 Fluorescência Sincronizada.....	53
4.3.8 Efeito da Ligação do Vermelho Congo na Estrutura da Albumina .....	53
4.3.9 Interação entre Proteína e Oxidante .....	54
4.3.6 Espalhamento de Luz .....	55
4.3.10 Efeito da Temperatura na Elipticidade Induzida em Vermelho Congo .....	55
4.3.11 Caracterização de Agregados Amilóides.....	56
4.3.12 Efeito da Temperatura na Elipticidade Induzida em Divanilato .....	57
4.3.13 Estudos de FRET – Transferência de Energia .....	58
4.3.14 Síntese do Divanilato de Metila.....	58
4.3.15 Estudos de <i>Docking</i> molecular .....	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO: Estudos com o corante vermelho Congo .....	61
5.1 Interação do Vermelho Congo com BSA.....	61
5.2 Elipticidade Induzida em Vermelho Congo .....	66
5.3 Determinação do Sítio de Ligação do Vermelho Congo em BSA.....	69
5.4 Efeito dos Ligantes de Sítio I, II e III na Elipticidade Induzida em Vermelho Congo	71
5.5 Alteração Estrutural da BSA: Ensaios de Espalhamento de Luz, Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada e Dicroísmo Circular ( <i>Far-UV-CD</i> ).....	77

5.5.1 Espalhamento de Luz Ressonante (RLS).....	77
5.5.2 Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada .....	78
5.5.3 Dicroísmo Circular .....	80
5.6 Efeito da Oxidação da BSA na Elipticidade Induzida em Vermelho Congo .....	83
5.7 Efeito da Temperatura na Elipticidade Induzida em Vermelho Congo .....	86
5.8 Caracterização de Agregados Amilóides por Dicroísmo Circular Induzido em Vermelho Congo .....	90
5.9 Efeito de Metais Pesados na Elipticidade Induzida em Vermelho Congo .....	93
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO: Estudos e aplicação do divanilato de metila .....	96
6.1 Síntese e Caracterização do Divanilato de Metila.....	96
6.2 Determinação das Constantes de Ligação entre o Divanilato de Metila e as Proteínas BSA e HSA.....	100
6.3 Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos de Ligação .....	104
6.4 Transferência de Energia .....	107
6.5 Efeito da Elipticidade Induzida em Divanilato.....	109
6.6 Identificação dos Sítios de Ligação por Deslocamento de Ligantes de sítio I e II	113
6.7 Efeito dos Ligantes de Sítio I, II e III na Elipticidade Induzida em Divanilato .....	116
6.8 Efeito da Temperatura na Elipticidade Induzida em Divanilato .....	119
6.9 Estudos de <i>Docking</i> Molecular .....	120
7 CONCLUSÃO.....	134
8 REFERÊNCIAS .....	135



## 1 INTRODUÇÃO

A albumina sérica humana (HSA do inglês *human serum albumin*) é a proteína mais abundante nos fluídos do corpo. É o principal determinante de pressão osmótica coloidal no plasma e modulador da distribuição do fluido entre os compartimentos do corpo. Tem a capacidade de transportar drogas e nutrientes pelo corpo e também contribui para manutenção do pH do sangue (NAKASHIMA, et al., 2018; ANEJA, et al., 2018; QIAN, et al., 2018). Sua estrutura contém três domínios helicoidais- $\alpha$  estruturalmente homólogos. Cada um dos três domínios globulares é dividido em dois subdomínios, que são chamados subdomínios IA, IIA, IB, IIB, IIIA e IIIB. Sua estrutura também pode ser dividida em regiões, denominadas sítios de ligação, os quais estão divididos de acordo com a afinidade de seus ligantes: sítio I, localizado no subdomínio IIA (preferência por ânions heterocíclicos pequenos); sítio II, localizado no subdomínio IIIA (preferência por ácidos carboxílicos aromáticos); sítios III, localizado no subdomínio IB. Os principais sítios de ligação para fármacos estão localizados na cavidade hidrofóbica do subdomínio IIA e IIIA, são respectivamente os sítios I e II (SCHENFELD; RIBONE; QUEVEDO, 2018; LING, et al., 2018; KABIR, et al., 2016). O sítio I é normalmente conhecido como sítio de ligação ao fármaco warfarina (subdomínio II A), mas também possui afinidade por piroxicam e fenilbutazona. O sítio II é conhecido como sítio de ligação aos benzodiazepínicos (subdomínio IIIA) que tem alta afinidade por diazepam e ibuprofeno, entre outros, que se liga preferencialmente a ácidos carboxílicos aromáticos pequenos (NAKASHIMA, et al., 2018; YAMASAKI, et al., 2017; SCHENFELD; RIBONE; QUEVEDO, 2018). A habilidade de uma droga se ligar a albumina é de fundamental importância, pois afeta a sua distribuição, excreção e velocidade de metabolização no organismo. Pode afetar também a atividade farmacológica de muitas drogas, promovendo alterações metabólicas em alguns ligantes, bem como a estabilidade e a toxicidade de ácidos e de corantes pode ser significativamente

afetada como resultado da sua ligação com a HSA (VENTURINI, et. al., 2017; SANCATALDO, et. al., 2014; ZHU, et. al., 2018). Portanto, quando se estuda as características de uma nova droga, parâmetros como a constante de ligação, o número de sítios de ligação e a determinação do sítio de ligação no qual a droga se liga são normalmente avaliados (SURYAWANSHI, et. al., 2016; VASCONCELOS; XIMENES, 2015). Outro assunto abordado nesta dissertação é a agregação de proteínas e sua caracterização. A agregação de proteínas e deposição de fibras amilóides no cérebro ou em outros tecidos são a causa parcial de pelo menos 20 doenças diferentes. Entre elas destacam-se doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica, diabetes tipo II e doenças priônicas, sendo cada doença associada a uma proteína em particular. (MUKHERJEE; SOTO, 2017; MUKHERJEE, et. Al.; 2016; KAHL, et. Al., 2017).

A importância em se caracterizar afinidade e sítios de ligação de potenciais fármacos em albumina, bem como o uso dessa proteína como modelo de estudo dos fenômenos químicos e físicos que levam à formação de agregados amiloidais, tem levado a constante busca por novos métodos analíticos para suas caracterizações. Uma dessas técnicas é o uso de vermelho Congo (VC); um tradicional corante usado para caracterização microscópica de fibras amiloidais em biopsia de tecidos (REICHHARDT, et. al., 2015; DUTTA, et. al., 2016; GIRYCH, et. al.; 2016). Nesta tese exploramos o uso do VC e do divanillato de metila (DV) como potenciais sondas não só para caracterização de fibras amiloidais, mas também para caracterização de sítios de ligação em albumina. A inovação deste trabalho foi utilizar o fenômeno da indução de quiralidade no VC e DV quando os mesmos se ligam na albumina, o que levou ao surgimento de sinal de dicroísmo circular específico para a interação. Através desse sinal analítico propomos uma nova metodologia para se estudar a formação de agregados amilóides em albumina. Buscamos também demonstrar como este sinal analítico se comporta quando ligantes de sítio I, II e III se ligam à proteína.

## **2 OBJETIVO**

Estudar as características espectroscópicas e biofísicas da interação do corante vermelho Congo (VC) e do composto bifenílico divanilato de metila (DV) com as proteínas albumina bovina (BSA) e albumina humana (HSA). Por meio desses estudos, desenvolver novas metodologias analíticas para caracterização de sítios de ligação da proteína e agregados amilóides.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Albumina

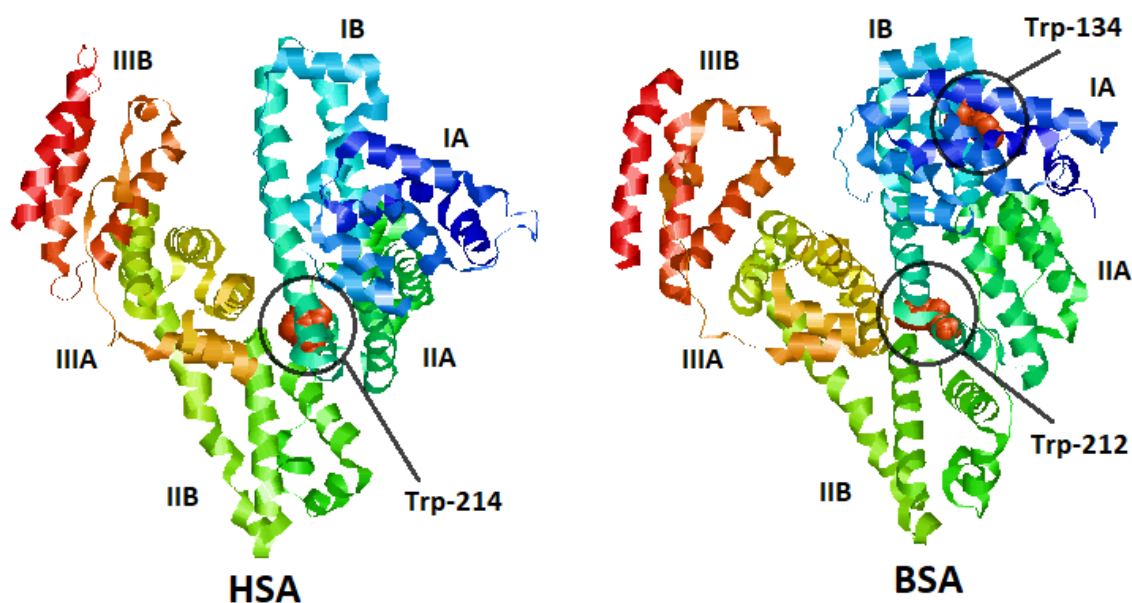
Sendo biomoléculas de maior diversidade estrutural e funcional nos seres vivos, as proteínas são frequentemente alvos de estudos. Entre estas, destacamos a albumina, devido ao importante papel que desempenha no transporte de ácidos graxos, metabólitos e de uma grande variedade de drogas (CURRY, et al., 1998; ERCELEN et al., 2005). A albumina é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, sendo altamente solúvel e muito estável, de tal modo que, atualmente ela é a mais extensivamente estudada entre as proteínas (SONO, et. al., 2013). Possui diversas funções fisiológicas e propriedades, tais como: o controle da pressão osmótica do sangue e o transporte e distribuição de várias substâncias endógenas e exógenas, como hormônios, aminoácidos, íons metálicos, drogas, entre outras (YAMASAKI, et. al., 2013; YANG, et.al., 2014). Estas propriedades são possíveis devido à presença de vários locais de ligação específicos em sua estrutura. Eles são mais bem caracterizados para a albumina do soro humano (HSA do inglês *human serum albumin*) e de albumina do soro bovino (BSA do inglês *bovine serum albumin*), que são frequentemente utilizadas como um modelo de proteína (BAL, et. al., 2013; BERTUCCI; DOMENICI, 2002). A estrutura química da albumina pode ser alterada por alguns processos específicos (oxidação, glicação), levando à rápida eliminação e catabolismo. A sua excreção no corpo humano é realizada por diversos componentes, entre eles, o leite, suor, lágrimas e saliva. Contudo, a maior fonte de perda é principalmente a partir do espaço intravascular pela degradação dos órgãos de maiores dimensões, tais como a pele e os músculos (SONO, et. al., 2013; ARROYO, et. al., 2014).

### 3.1.1 Estrutura Molecular e Propriedades Químicas

As albuminas presente em diferentes espécies de mamíferos mostram muita semelhança entre suas propriedades físico-químicas. Por exemplo, albuminas do soro (sem fatores de coagulação) ou de plasma sanguíneo (contém soro e fatores de coagulação), bovina (BSA) e humana (HSA) possuem 76% de semelhança em suas sequências de aminoácidos (MICHNIK, et. al., 2006; HUANG, et. al., 2004).

Tanto a BSA quanto a HSA possuem apenas um resíduo de cisteína livre (Cys-34) que desempenha um papel importante na sua atividade antioxidante. Possuem 17 ligações de dissulfeto formadas por 34 resíduos de cisteína que servem para estabilizar a albumina, ajudando a manter a estrutura terciária. A BSA é composta por 583 aminoácidos, sendo 20 grupos de tirosina e possui dois resíduos de triptofano envolvidos na sua fluorescência, Trp 134, que está localizado no subdomínio IB e Trp 212, localizado no subdomínio IIA. Já a HSA é constituída por 585 aminoácidos, sendo 17 grupos de tirosina e possui apenas um resíduo de triptofano, Trp 214 localizado no subdomínio IIA, como representado na Figura 1 (ARROYO, et. al., 2014; BERTUCCI; DOMENICI, 2002; SURYAWANSHI, et. al., 2015; YEGGONI, et. al., 2014; RAZA, et. al., 2017).

**Figura 1** - Estrutura da HSA e BSA indicando as localizações aproximadas dos triptofanos: Trp 214, 212 e 134 (Obtida e adaptada do Protein data bank (ID:1e78 e 3v03)).

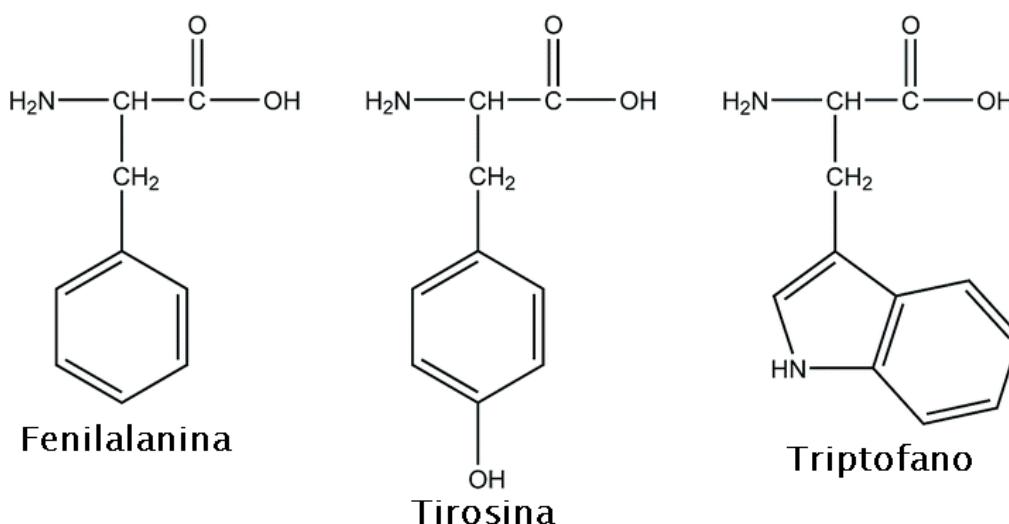


A estrutura secundária da HSA é altamente helicoidal, constituída aproximadamente por 67% de  $\alpha$ -hélices, 23% é cadeia estendida e 10% folha- $\beta$ . Já sua estrutura terciária possui a forma semelhante à de um coração. As interações hidrofóbicas entre as hélices conferem maior estabilidade à estrutura da proteína (ARROYO, et. al., 2014; BERTUCCI; DOMENICI, 2002). A HSA é constituída por uma única cadeia polipeptídica não glicosilada que contém 585 resíduos de aminoácidos com um peso molecular de 66.500 Da. (YAMASAKI, et. al., 2013; BAL, et. al., 2013; YANG, et.al., 2014). A BSA é a proteína mais abundante no sangue bovino (Concentração de 50 mg/ml) e possui estrutura similar a HSA com uma cadeia polipeptídica simples de 583 resíduos de aminoácidos.

Devido à similaridade, BSA tem sido aplicada como um modelo de proteína em muitas investigações. O estudo da BSA fornece uma boa analogia frente à HSA em relação aos métodos de purificação, descrição das propriedades físico-químicas, bem como análise estrutural e modelagem matemática (YARI; SAEIDIKHAH, 2015; OLESZKO, et. al., 2018; POOR, et. al., 2014). Segundo (BERTUCCI, 2002) a albumina possui uma elevada porcentagem de aminoácidos iônicos, ácido glutâmico e lisina, que conferem uma

solubilidade relativamente elevada para a proteína. A Albumina é uma proteína que possui fluorescência intrínseca, sendo a razão dessa fluorescência a existência de três aminoácidos aromáticos com propriedades fluorescentes, fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e o triptofano (Trp), apresentados na Figura 2 (LI, et. al., 2015).

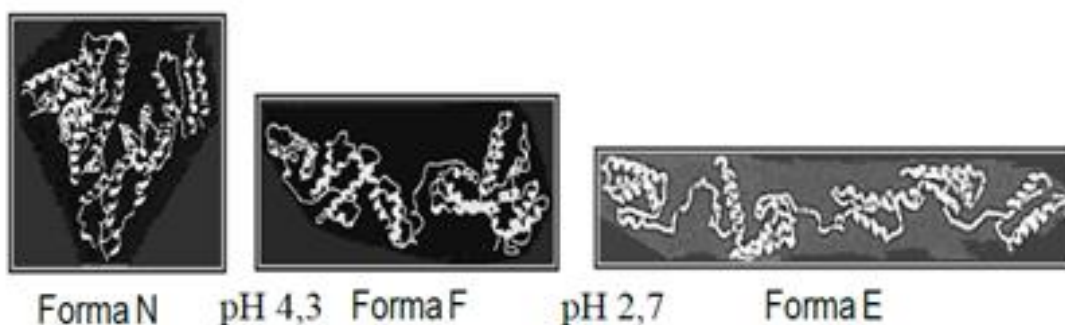
**Figura 2** – Estrutura molecular da fenilalanina, tirosina e triptofano.



A BSA possui dois resíduos de triptofano envolvidos na sua fluorescência (Trp 134 e Trp 212) e a HSA apenas um (Trp 214). Como o teor de aminoácidos ácidos superam os básicos, a albumina apresenta carga negativa em pH 7, mesmo possuindo uma estrutura bem estabilizada, como consequência do elevado número de resíduos ácidos e básicos em seu interior. São também conhecidas por sofrerem diversas alterações conformacionais nas regiões de pH ente 2 a 5, onde sofrem isomerizações reversíveis, causando prejuízos na interação e no transporte de outras moléculas. Dependendo do pH, a HSA pode assumir a forma expandida (E) em pH inferior a 2,7. Em pH entre 2,7 e 4,3 sofre transição para a forma F, caracterizada pelo aumento da viscosidade e solubilidade baixa em meio aquoso. Em pH entre 4,3 e 8 sofre transição para forma normal (N). Acima de pH 8 muda sua

conformação para a forma básica, caracterizada pela perda de  $\alpha$ -hélice e um aumento da afinidade para alguns ligantes (FANALI et al., 2012; KING, 1973; MARTINEZ et al., 2013).

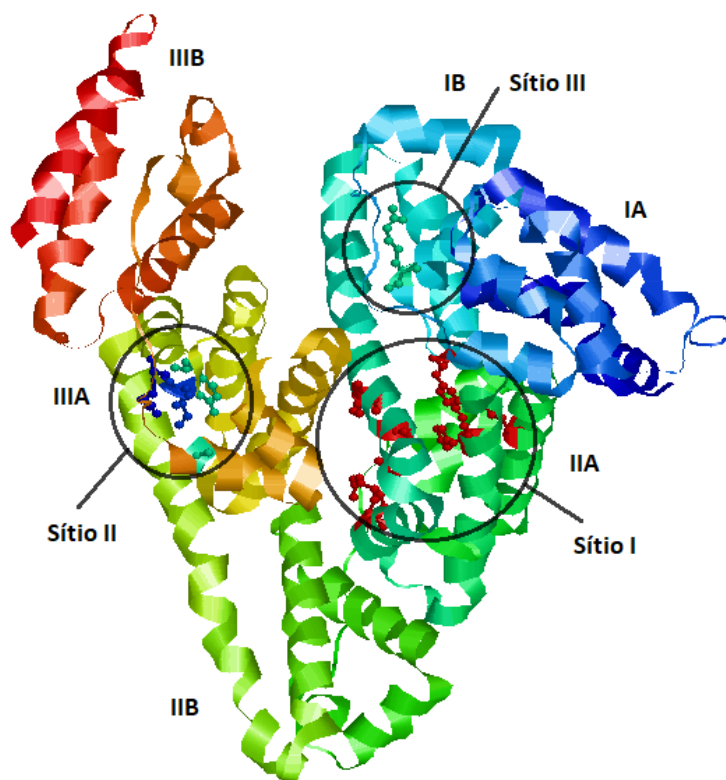
**Figura 3** - Isomerização conformacional da BSA. pH 4,3 – transição forma normal (N) para forma *fast* (F). pH 2,7 – Forma *fast* (F) para a forma estendida (E) (Ferreira, 2009).



A Figura 4 representa a estrutura da albumina que é composta por três domínios, sendo eles, I (resíduos 1-195), II (196-383) e III (384-585) de tamanhos semelhantes dispostos em forma de coração formados por  $\alpha$ -hélices, com dimensões de  $80 \times 80 \times 30 \text{ \AA}$ . Devido a semelhança estrutural, cada domínio pode ainda ser dividido em subdomínios A e B, que são compostos de quatro e seis  $\alpha$ -hélices, que têm relevância funcional e definem os locais de ligações de muitos ligantes à albumina. As interações entre domínios e subdomínios também podem contribuir de forma significativa para a estabilidade da molécula de HSA (TIMERBAEV, et. al., 2006; ARROYO, et. al., 2014; SUGIO, et. al., 1999; YANG, et.al., 2014).



**Figura 4** – Estrutura da albumina indicando a subdivisão em domínios (I-III) e subdomínios (A e B) e as localizações aproximadas dos sítios de ligação (Obtida e adaptada do *Protein data bank* (ID:1e78)).

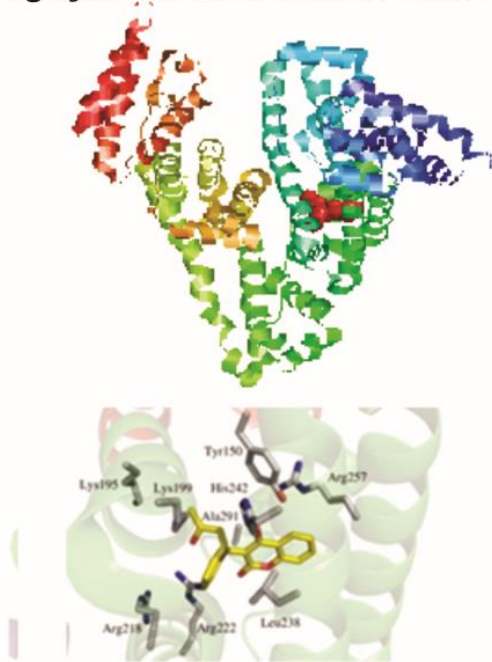


Estudos iniciados por Sudlow e colaboradores (1975 e 1976), utilizando um método de deslocamento de sonda fluorescente, demonstraram a presença de dois locais de ligação específicos de drogas, isto é, sítio I e o sítio II em HSA (YAMASAKI, et. al., 2013; YANG, et.al., 2014). Estes sítios de ligação foram determinados por vários parâmetros cristalográficos e estão localizados em cavidades hidrofóbicas em subdomínios IIA e IIIA, respectivamente. (TIMERBAEV, et. al., 2006). Apesar dos relatos de diversos sítios em HSA, os locais mais importantes são comumente conhecidos como sítios de Sudlow I e II que são encontrados em subdomínios IIA e IIIA, respectivamente (ARROYO, et. al., 2014). O Sítio I que está localizado no subdomínio IIA é denominado como o local de ligação à varfarina. Drogas que se ligam fortemente ao sítio I são geralmente ácidos dicarboxílicos e/ou moléculas heterocíclicas volumosas de carga negativa, como varfarina, fenilbutazona, azapropazo-

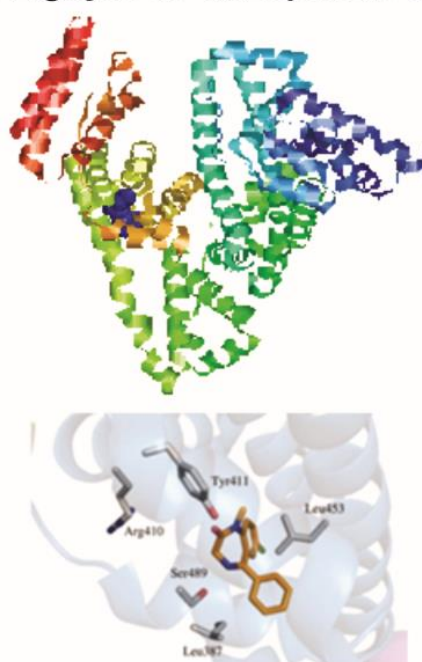
na. Estudos de cristalografia dirigidos ao sítio I de HSA demonstraram que este é maior do que o sítio II, com uma região grande e flexível e é pouco seletivo. O sítio II está localizado no subdomínio IIIA e é composto por todas as seis hélices de subdomínio IIIA e por isso é topologicamente semelhante ao sítio I (subdomínio IIA). Embora, assim como o sítio I, que compreende também uma cavidade hidrofóbica em grande parte pré-formada com características distintas, existem diferenças significativas entre os sítios I e II, sendo o sítio II menos flexível e mais seletivo. De acordo com a estrutura cristalina de HSA, o sítio II é uma cavidade em grande parte apolar e uma única parte polar dominante. Arranjo de características polares e apolares é consistente com as estruturas típicas de drogas sítio II, que são ácidos carboxílicos aromáticos com um grupo ácido carregado negativamente numa extremidade da molécula que é separada por um centro hidrofóbico. Fármacos como diazepam, diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno, são exemplos de drogas que se ligam ao sítio II. O sítio II foi proposto como sendo um local menor ou mais estreito do que o local I porque as moléculas grandes raramente se ligam ao sítio II (ARROYO, et. al., 2014; GHUMAN, et. al., 2005; YAMASAKI, et. al., 2013; BERTUCCI; DOMENICI, 2002). A Figura 5 apresenta a estrutura cristalina da HSA complexado com varfarina e ibuprofeno, ligantes de sítio I e II, respectivamente.

**Figura 5** - Estrutura cristalina da HSA complexada com (a) varfarina e (b) ibuprofeno (Obtida e adaptada do *Protein data bank* (ID:2bxd e 2bxf) e YAMASAKI, et. al., 2013).

**a) Ligação da varfarina ao sítio I**



**b) Ligação do diazepam ao sítio II**



### 3.1.2 Interação de Drogas com Albumina

Uma das propriedades mais interessantes da albumina é a sua tendência em ligar-se a uma grande variedade de compostos orgânicos, entre eles vários corantes, metabólitos e medicamentos comumente usados. Muitos destes compostos aparentemente ligam-se competitivamente ao mesmo local primário da molécula, sendo os compostos hidrofóbicos aniônicos os mais fortemente ligados a albumina. Uma grande quantidade de artigos vem sendo escritos sobre a natureza e localização destes sítios de ligação. O estudo dos sítios de ligação tem um papel fundamental no estudo da eficácia e velocidade da entrega de drogas pelo organismo (CURRY et al., 1998; ERCELEN et al., 2005; KING, 1973; BERTUCCI; DOMENICI, 2002).

Drogas tais como a varfarina, ibuprofeno e diazepam, que são ligantes de albumina, são usadas com mais frequência em estudos. Estas drogas podem ligar-se a diferentes locais da albumina e, embora tendam a interagir principalmente com sítios de Sudlow I e II. Considerando a elevada concentração de albumina no plasma, a afinidade de ligação de qualquer droga à albumina é um dos principais fatores que determinam a farmacocinética destes medicamentos, seu tempo de vida e disponibilidade em vários tecidos (ARROYO, et. al., 2014; YANG, et.al., 2014).

Dada a sua elevada estabilidade, a HSA possui uma meia-vida longa no plasma, de cerca de 19 dias. Durante este tempo relativamente longo a sua estrutura química pode ser alterada por oxidação, bem como por glicosilação não-enzimática, entre outras modificações irreversíveis. O acúmulo dessas modificações tem sido associado a patologias específicas, tais como a cirrose e diabetes (ARROYO, et. al., 2014; SONO, et. al., 2013).

Em geral, as drogas têm duas formas em circulação, ligadas ou não ligadas às proteínas. As drogas não ligadas podem passivamente difundir através das barreiras constituídas por células endoteliais para os órgãos, onde são metabolizadas, podendo ser a excreção biliar ou de filtração no rim ou ainda podem ser distribuídas intracelularmente através de sistemas de transporte específicos. A ligação de muitas drogas à albumina pode ser afetada por outras drogas que competem pelo mesmo sítio específico da molécula, consequentemente o aumento da fração livre pode conduzir a alterações na farmacocinética e farmacodinâmica. Da mesma forma, a ligação entre HSA e muitas drogas em pacientes pode ser alterada por estados de doença, devido ao aumento de substâncias endógenas que competem pelos sítios de ligação. Somente as moléculas livres da droga interagem para produzir efeitos terapêuticos. Neste sentido, compreender a farmacocinética e atividade farmacológica de uma droga em um estado de doença é importante e útil em termos de proporcionar aos pacientes medicamentos eficazes (YAMASAKI, et. al., 2013; YANG, et.al., 2014).

A albumina liga-se a um grande número de compostos endógenos e exógenos

relativamente insolúveis e uma grande variedade de drogas, facilitando o seu transporte ao longo do corpo. Os fármacos que se ligam à albumina com afinidade elevada geralmente podem interagir com um ou dois sítios específicos da proteína. No entanto, uma elevada afinidade da proteína reduz a concentração livre do fármaco, de modo que uma elevada afinidade para proteínas pode ser uma vantagem ou uma desvantagem para a sua eficácia, dependendo da droga e do objetivo. Mudanças na ligação às proteínas são frequentemente discutidos com base neste conceito local de ligação. Deslocamento competitivo entre as drogas que partilham o mesmo local de ligação é um exemplo típico. Tal conhecimento de locais de ligação de drogas é uma das questões importantes para a análise do mecanismo e efeito farmacológico (PISTOLOZZI; BERTUCCI, 2008; YAMASAKI, et. al., 2013).

Grande variedade de técnicas bioquímicas são aplicadas para a determinação dos parâmetros de ligação dos fármacos à albumina e para a caracterização da interação de droga nos locais de ligação, tais como diálise de equilíbrio, biocromatografia, ultrafiltração, ultracentrifugação, biossensores ópticos e técnicas espectroscópicas, fluorescência, absorção na região UV-visível e dicroísmo circular. Há uma aplicação muito importante da técnica de fluorescência, que é a sondagem de interações moleculares dentro dos locais de ligação com o uso de sondas fluorescentes. Com base na análise detalhada dos espectros de fluorescência e com o auxílio de técnicas resolvidas no tempo e de polarização com estas sondas a informação sobre a locais de ligação, polaridade e flexibilidade estrutural podem ser obtidas (ERCELEN et al., 2005; GHUMAN, et. al., 2005; PISTOLOZZI; BERTUCCI, 2008; BERTUCCI; DOMENICI, 2002).

### **3.2 Amiloidose**

O termo "amilóide" foi originalmente usado para descrever agregados protéicos associados a algumas doenças. Surgiu devido a algumas de suas propriedades que se

assemelhavam as do amido (amilose). Hoje em dia, sabe-se que esta substância não é à base de carboidratos, no entanto continua a usar-se o termo amilóide por razões históricas (DOBSON, 1999; DUBEY, et. al.,2014; KREBS, et. al., 2005). É usado para descrever muitas condições clínicas: desordens de origem diversa onde o desnovelamento total, parcial ou mau enovelamento de proteínas tem um papel fundamental no desenvolvimento da patologia. Esses processos podem levar à formação de agregados solúveis ou insolúveis e ainda à formação de fibras amilóides de proteínas, que possuem formas de natureza fibrilar bem definida. As patologias associadas à deposição extracelular de amilóide denominam-se por amiloidoses (MARCON, et. al., 2006; SUNDE, 1997; KREBS, et. al., 2005).

A agregação de proteínas é sem dúvida a manifestação mais comum e preocupante da instabilidade da proteína, pois está relacionado com pelo menos 20 doenças diferentes. (DOMIKE; DONALD, 2009; LOVEDAY, et. al., 2012; WANG, 2005). Estas patologias podem ser classificadas segundo a localização dos depósitos de amilóides no corpo humano. Podem ser divididas em dois tipos principais: amiloidoses localizadas e amiloidoses sistêmicas. Amiloidoses sistêmicas, em que os depósitos são encontrados em diversos ou na maioria dos órgãos e tecidos, e amiloidoses localizadas, várias proteínas que, em sua conformação nativa, se organizam em fibras amilóides e são funcionais, no caso em que os depósitos são confinados apenas a um órgão ou tecido específico (SUNDE, 1997; SUGA, et. al., 2012)

Existem três tipos principais de amiloidose sistêmica: Primário (AL), o mais comum, secundária (AA) e hereditária (ATTR). A amiloidose primária ocorre independentemente de outra doença, quando a medula óssea produz muitas proteínas que se acumulam na corrente sanguínea e, finalmente, são depositados em vários órgãos. Já a amiloidose secundária pode se desenvolver devido a uma infecção crônica ou doença inflamatória, resultante de outra doença. A amiloidose hereditária ocorre quando se herda um gene

anormal, que causa a produção de proteínas que tem o potencial de formar amilóide (SUGA, et. al., 2012; DESPORT, et. al., 2012; MEJIA;ALVARADO, 2013).

Surpreendentemente, até agora, foram encontradas aproximadamente 30 proteínas capazes de formar agregados. Apesar da variedade de proteínas  $\beta$ -amilóide que levam a patologias graves, incluindo algumas bem conhecidas, tais como a lisozima e transtirretina, os quais têm dobras nativas e características únicas, as fibras amiloidais em que eles são encontrados nos estados de doença são extremamente semelhantes em sua aparência geral (DOBSON, 1999; SUNDE, 1997; DUBEY, et. al., 2014; SILVA, et. al., 2010).

### **3.2.1 Estrutura das Fibras Amiloidais**

Por um longo período achava-se que a capacidade de formar fibras amilóides era característica de um grupo específico de proteínas, em grande parte aos observados em estados de doença, e que estas proteínas possuem características de seqüências específicas que codificam a estrutura do núcleo amilóide. Hoje é conhecido que a capacidade para formar amilóide não é uma peculiaridade de um pequeno grupo de proteínas e estas proteínas não estão somente associadas às doenças. A capacidade de formar amilóide é uma propriedade genérica das cadeias polipeptídicas, sendo assim, esta capacidade pode facilmente ser explicada pelo fato de que as ligações intermoleculares que estabilizam este material envolvem o esqueleto do peptídeo, o que é comum para todas as proteínas (LOVEDAY, et. al., 2012; DOBSON, 1999; XIE, et. al., 2014)

Técnicas como análise por microscopia eletrônica, difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho ou através de sondas, tais como o vermelho Congo ou a tioflavina-T, permitiram uma melhor compreensão da estrutura de fibras amilóides de várias proteínas associadas a diversas patologias (DOBSON, 2004; LAI, et.al., 1996; KHURANA, et. al., 2005).

Pode-se afirmar que as estruturas das fibras amiloides são altamente organizadas

(efetivamente cristais unidimensionais), originadas pela polimerização de diferentes proteínas apresentam entre si propriedades semelhantes, podem ser constituídas por mais de um filamento elementar, designados protofibrilas ou protofilamentos. Todas as fibrilas amilóides têm comprimento variável, não ramificado, de 70 a 120 Å de diâmetro (SUNDE; DOBSON, 2004).

Geralmente, a agregação de proteínas leva a perda da estrutura terciária, no entanto, contêm quantidades significativas de estruturas secundárias. O teor de folha- $\beta$  aumenta após a agregação enquanto as estruturas  $\alpha$ -hélice parecem ser menos propensas a formar agregados. Isto pode ser devido a um momento de dipolo mais forte de  $\alpha$ -hélices diferente das folhas- $\beta$  (WANG, 2005). Possui uma estrutura rica em folha- $\beta$  cruzada, com periodicidade estrutural que tem origem na sua estrutura contorcida, na qual as cadeias polipeptídicas formam cadeias- $\beta$  orientadas de forma paralela entre si na perpendicular ao eixo maior da fibra, resultando numa série de folha- $\beta$  que se propagam ao longo da fibra. (SUNDE, 1997; FREIRE, et. al. 2015; UVERSKY; FINK, 2004; KREBS, et. al., 2005).

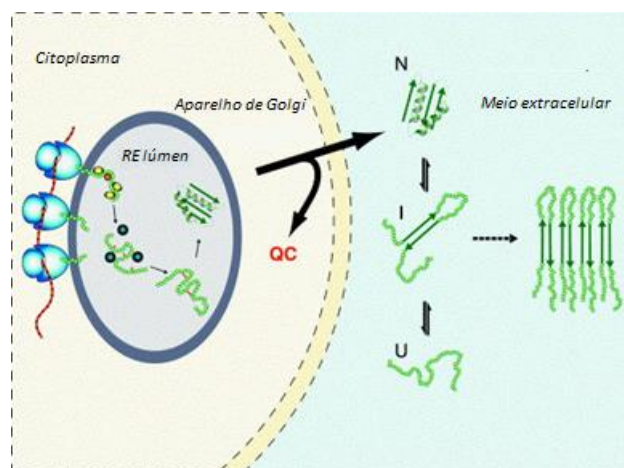
### **3.2.2 Mecanismo de Agregação de Proteínas**

Nos últimos anos, o conhecimento sobre o mecanismo detalhado de processos associados às proteínas cresceu significativamente através do progresso na biologia celular (DOBSON, 2004). As proteínas estão presentes na maioria dos processos importantes nos sistemas biológicos exercendo uma diversidade de funções vitais. Após a sua síntese nos ribossomos, a proteína entra no retículo endoplasmático e é auxiliada por chaperonas, que impedem a agregação das espécies dobradas de forma incorreta. Cada proteína organiza-se numa estrutura tridimensional específica para ser capaz de desempenhar a sua função biológica. A proteína corretamente enovelada é secretada a partir da célula e funciona normalmente no seu ambiente extracelular. Sob certas condições, a proteína se desenrola, pelo menos parcialmente, podendo resultar na formação de fibrilas e outros agregados que



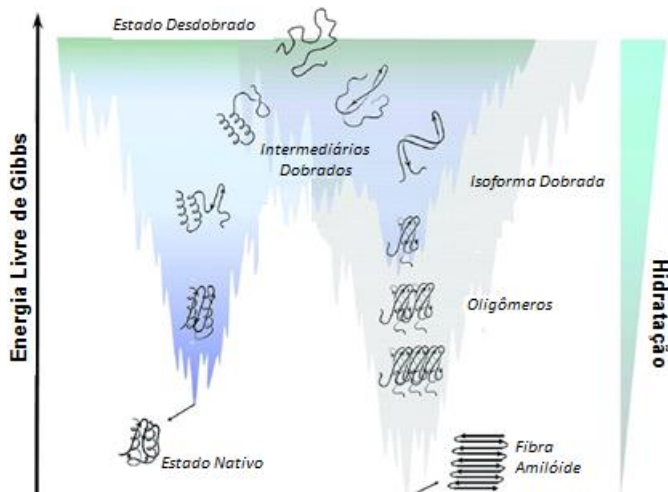
se acumulam no tecido. Para explicar a base molecular da formação de fibrilas amilóides, tem sido proposto que a fibrilação pode ocorrer quando a estrutura rígida nativa de uma proteína é desestabilizada, favorecendo desdobração parcial e culminando na formação de uma conformação parcialmente desdobrada (DOBSON, 1999; DOBSON, 2004; UVERSKY; FINK, 2004). A Figura 6 apresenta um possível mecanismo de formação de fibras amilóides por uma proteína globular. N, I e U referem-se a nativa, parcialmente dobrada (intermediário) e estados desdobrados da proteína, respectivamente. QC refere-se ao mecanismo de controle da qualidade que evita proteínas dobradas incompletamente de serem secretadas a partir do retículo endoplasmático e RE refere-se ao retículo endoplasmático (DOBSON 1999).

**Figura 6** - Representação esquemática do possível mecanismo de formação de fibrilas amilóides por uma proteína globular (Adaptado de: DOBSON 1999).



O processo de formação de fibras amilóides e intermediários envolve escape das vias de enovelamento de proteínas ou perturbação da estrutura nativa. Uma via de enovelamento/desenovelamento e formação de fibras amilóides de proteínas é mostrada esquematicamente em função da energia livre de Gibbs e hidratação (Figura 7) (SILVA, et. al., 2010).

**Figura 7** - Representação esquemática do desdobramento de proteínas em função da energia livre de Gibbs e hidratação (Adaptado de: SILVA, et. al., 2010).



A Figura 7 mostra a energia livre da proteína em função de seu enovelamento. As proteínas desdobradas (no topo da figura) tem elevada entropia conformacional e são altamente hidratadas. A medida que as proteínas evoluem no “funil”, as espécies intermediárias tornam-se mais estruturadas. Algumas proteínas enfrentam uma bifurcação, levando a conformações metaestáveis, que, dependendo das condições do meio podem ser conduzidas à isoformas dobradas incorretamente (*misfolded*) e espécies agregadas (SILVA, et. al., 2010). O mecanismo de amiloidogênese é ainda alvo de alguma controvérsia, mas normalmente envolve a formação de oligômeros de estruturas *misfolded* levando a formação de fibras amilóides. Inicia-se com a associação intermolecular de proteínas através das respectivas regiões hidrofóbicas expostas, segundo um mecanismo de nucleação seguido de um mecanismo de crescimento, dando origem à oligoméricos solúveis. A nucleação é traduzida por uma fase inicial (*lag phase*) que corresponde ao tempo necessário para a formação de um intermediário de nucleação amiloidogênico. No entanto, com a amplificação desses agregados chega-se a uma situação em que se atinge o respectivo limite de solubilidade e ocorre a deposição das fibras insolúveis (DOBSON, 2004; BHANK, et. al., 2009; WOOD, et. al., 1999).

### 3.2.3 Indução de Agregação em Proteínas

O estudo dos mecanismos de agregação de proteínas através da indução de agregação é extremamente útil para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares de amiloidose associados às doenças (JANSEN, et. al., 2005). Diversas técnicas podem ser usadas para a indução da agregação, dentre elas estão a formação de ligação de dissulfeto, vias de reticulação não-dissulfeto, reação de maillard e a oxidação, entre outras, que modificam a proteína formando a agregação (WANG, 2005). Agregação de proteínas pode ser induzida por uma variedade de fatores externos. Esses fatores ou condições podem desestabilizar o estado dobrado, estabilizar o estado desdobrado, ou favorecer a formação de intermediários (WANG, 2005; MARCON, et. al., 2006). Entre esses fatores, a temperatura é provavelmente o mais comum em afetar a agregação de proteínas. Agregação induzida termicamente produz fibrilas em muitas proteínas. As proteínas se desdobram acima de determinadas temperaturas, o aumento da temperatura aumenta a velocidade de agregação das proteínas, aumentando as frequências de colisão molecular e interações hidrofóbicas, e normalmente é um processo irreversível (WANG, 2005; BATZLI; LOVE, 2015). Outro fator crítico é o pH da solução, que pode afetar fortemente a taxa de agregação de proteínas (MARCON, et. al., 2006; BATZLI; LOVE, 2015). A concentração de proteínas é outro fator importante na agregação de proteínas. O aumento da concentração de proteína aumenta em geral a taxa de agregação. Diversos fatores que também podem influenciar na agregação de proteínas são a congelação-descongelação, liofilização, secagem por pulverização, a reconstituição, entre outros (FIELDS, et. al., 1992; COSTANTINO, et. al., 1998; KERWIN, et. al., 1998; ZHANG, et. al., 1995; SARCIAUX, et. al., 1999). A reversibilidade da agregação de proteínas é geralmente dependente da fase do processo de agregação. A formação inicial de agregados solúveis (nucleação) pode ser reversível, mas a formação posterior de agregados insolúveis é geralmente irreversível (WANG, 2005).

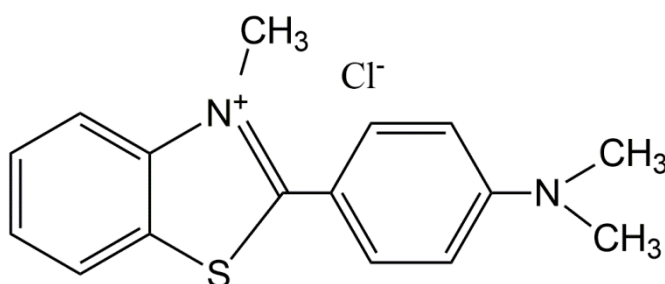
### 3.2.4 Técnicas Analíticas de Caracterização de Agregados Amilóides

Existem diversas técnicas para a monitoração da agregação de proteínas. Entre estes métodos, a maneira mais conveniente de se detectar a formação de agregados insolúveis de proteína é, embora subjetivo, a inspeção visual. Sob um microscópio, o tamanho e forma dos agregados de proteína podem facilmente ser determinados, sendo que, para os agregados menores pode ser utilizado um microscópio eletrônico (WANG, 2005). Um método instrumental tradicional simples e de monitoração da agregação de proteína é o método turbidimétrico, que mede a densidade óptica da amostra com base na dispersão da luz no UV próximo ou região do visível, em que as proteínas têm absorção desprezível. Por conseguinte, este método é geralmente utilizado para a comparação do grau relativo de agregação da proteína e não para quantificação precisa (WANG, 2005). Eletroforese em gel de poliacrilamida é outro método simples e tradicional utilizado para a determinação da agregação de proteínas. Agregados ligados por dissulfeto podem ser facilmente testadas em condições reduzidas e não reduzidas (ARAKAWA; KITA, 1999; WANG, 2005; SPEED, et. al., 1996). A espectroscopia de infravermelho também tem sido utilizada em estudos de desnaturação / agregação de proteínas (DONG, et. al., 1995; SAGUER, et. al., 2013).

Há outros ensaios adequados para a determinação da formação de agregados amiloidais. Os depósitos de amilóides apresentam propriedades ópticas específicas, como a birrefringência quando em contato com algumas moléculas de corante. Por exemplo, as fibrilas ligam-se ao corante vermelho Congo e causam alterações espectrais, um desvio para o vermelho no comprimento de onda da absorção de luz do corante vermelho Congo e de uma birrefringência verde-maçã característico sob luz polarizada. Ambos os efeitos são atribuídos à interação da molécula do corante com as cadeias protéicas espaçadas regularmente (VASCONCELOS; XIMENES, 2015; DUTTA, et. al., 2016; MEJIA;ALVARADO, 2013).

Os ensaios com tioflavina-T (Th-T) também são freqüentemente utilizados como medidas qualitativas de agregação, relacionados ao comportamento de agregação de proteínas (BATZLI; LOVE, 2015). A Th-T, Figura 8, tem uma extremidade hidrofóbica com um grupo dimetilamino ligado a um grupo fenil, ligado a um grupo benzotiazole mais polar. É um corante fluorescente da família benzotiazole. Devido a sua especificidade da ligação às fibrilas amilóides, pode ser aplicada como sonda de fluorescência no monitoramento da agregação de proteínas. O aumento da fluorescência está associado à formação de folha- $\beta$  no agregado. A sua ligação a fibrilas amilóides é responsável pelo aumento da emissão de fluorescência a 482 nm (BATZLI; LOVE, 2015; FREIRE, et. al. 2015; LOVEDAY, et. al., 2012; KHURANA, et. al., 2005).

**Figura 8** - Estrutura da tioflavina-T.



### 3.3 Vermelho Congo

Em 1883, Paul Bottiger, na tentativa de sintetizar um indicador de pH acabou descobrindo o Vermelho Congo, que não precisava de substâncias adicionais para fixação em fibras têxteis, pois este corante tingia o algodão simplesmente fervendo o substrato em uma solução de corante, em única etapa direta (HILL; LUKIW, 2015; PICCOLI, 2008). Na época ele trabalhava no Laboratório Químico de Corantes para *Friedrich Bayer Company* em Elberfeld na Alemanha, que não se interessou pelo projeto, contestando

sua descoberta. Assim, em 24 de fevereiro de 1884 ele registrou a patente em seu nome, que após ser emitida vendeu para AGFA (*Aktiengesellschaft für Anilinfarben Fabrikation*), que começou a produção do corante em 1885 tornando-se um grande sucesso comercial. O sucesso comercial do VC foi tão importante que serviu como precedente para o surgimento de novos corantes, já que em 1910 já existiam muitos corantes comercializados com o nome Congo: rubi Congo, azul Congo, brilhante Congo, laranja Congo e marrom Congo (STEENSMA, 2001).

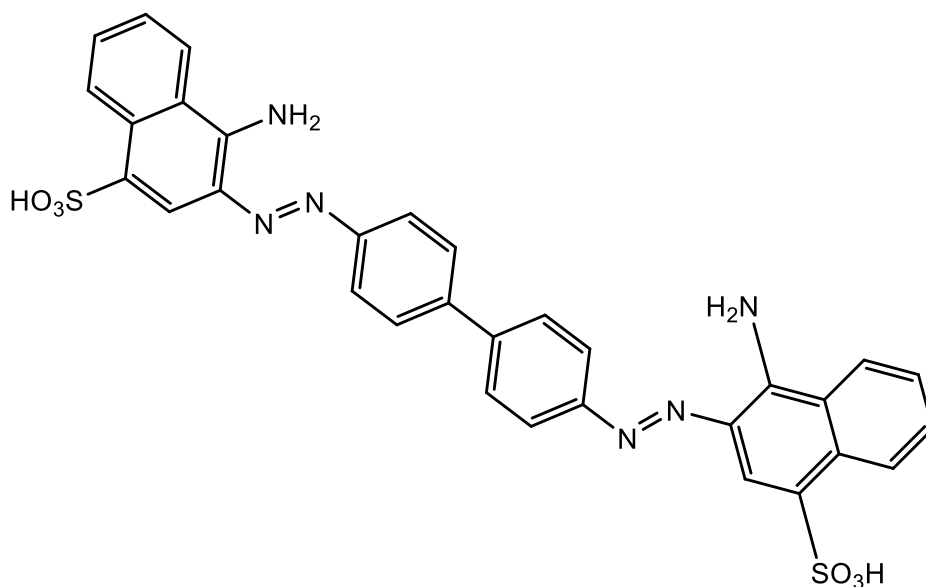
Na altura de sua descoberta, muitos corantes de anilina sintetizados foram utilizados para detecção de amostras patológicas. Já em 1886 o VC foi aplicado como um indicador de pH para determinar a produção de ácido no trato intestinal de animais. Em 1922, após os testes de coloração do VC, o médico alemão, Hans Hermann Bennhold, foi o primeiro a empregá-lo para diagnóstico de amiloidose. Em 1925, Alder e Reimann introduziu um teste semelhante para examinar a função do sistema retículo endotelial. Em 1927, o neurologista belga Paul Divry estudou alterações degenerativas no envelhecimento do cérebro e observou que o VC causava uma birrefringência verde-maçã quando visto sobre luz polarizada para fibras amilóides depositadas no tecido cerebral, revolucionando assim as pesquisas de degenerações amilóides e tornando o VC a principal sonda para detecção de acumulação de proteínas amilóides (FRIDA; ANISIMOV, 2007; CANGELOSI, et. al., 1999).

### **3.3.1 Propriedades Químicas do Vermelho Congo**

O VC (Figura 9) cuja fórmula molecular é  $C_{32}H_{22}N_6O_6S_2Na_2$  é um corante diazo, tóxico. Essa molécula liga-se a lipídios e lipoproteínas e uma gama de outras moléculas, possui peso molecular 696.66 g/mol, sua estrutura molecular é ilustrado na Figura 9 (BHATTACHARYA, et. al., 2011; KALZAR et al., 2013; HILL; LUKIW, 2015; KLUNK, et. al., 1989; CANGELOSI, et. al., 1999). Segundo KHURANA (2001) sugere, que a ligação à proteínas pode ocorrer através de uma combinação das interações hidrofóbicas e

eletrostáticas. Seu centro hidrofóbico é constituído por dois anéis benzênicos ligados por grupamentos diazo a duas naftaleno-sulfonaminas que podem estar na forma de um sal dissódico ou protonadas dependendo do pH do meio. Já sua parte hidrofílica inclui dois grupos amino e um grupo sulfato carregado negativamente (a pH neutro) O diâmetro da molécula é de aproximadamente 21 Å (2009; ROMHANYI, 1971; WU, et. al., 2012).

**Figura 9** – Estrutura molecular do vermelho Congo.



O VC é um corante sintético aniônico, sendo também anfifílico, solúvel em água e em etanol, pouco solúvel em acetona e insolúvel em éter, possuindo um ponto de fusão de 360 °C (WU, et. al., 2012; FORNARI, 2006; BHATTACHARYA, et. al., 2011). Dependendo do pH o VC apresenta forma *chinone* em solução ácida e forma *sulphonazo* em meio básico, sua cor é alterada para azul em pH abaixo de 3 para vermelho em pH acima de 5 (KALZAR et al., 2013).

O uso do VC foi interrompido na indústria têxtil devido à sua alta toxicidade. É conhecido por ser um inibidor muito potente da RNA polimerase, mas devido as suas propriedades espectroscópicas interessantes, ele ganhou ampla utilização nos estudos investigativos em microbiologia. Apresenta uma estrutura aromática complexa e tem como proprieda-

des físico-químicas, a estabilidade térmica e óptica, a resistência à biodegradação e à fotodegradação. Seu espectro de UV–Vis mostra uma banda de longo comprimento de onda centrada próximo de 500 nm e outras bandas perto de 340 nm e 235 nm. Sua absorvidade molar é de aproximadamente  $45.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 498 nm (ZHANG, et al., 2008; HILL; LUKIWI, 2015; WOODY, et. al., 1981). É um corante opticamente inativo quando livre, entretanto, pode adquirir quiralidade quando ligado a algumas proteínas. Este fenômeno é também conhecido como dicroísmo circular induzido, apresentando bandas ICD fortes quando ligado a proteínas (VASCONCELOS; XIMENES, 2015).

### 3.3.2 Aplicações do Vermelho Congo

O VC começou como um importante e valioso corante que revolucionou a indústria têxtil. Entretanto, devido à sua tendência de mudar de cor e devido a sua toxicidade, atualmente ele é pouco utilizado como um corante têxtil (STEENSMA, 2001). Além de sua aplicação como indicador de pH, devido a sua mudança de cor em pH baixo (vermelho para azul), ele também é utilizado na determinação da atividade enzimática, onde sua descoloração em meios de cultura para microorganismos indica a atividade (TEATHER; WOOD, 1982; YOON, et. al., 2007). É comumente usado na indústria de papel e destinado principalmente para a coloração de produtos de papel (BHATTACHARYA, et al., 2011). Mais de um século após sua descoberta, sua principal aplicação é no auxílio diagnóstico em pacientes com suspeita de amiloidose, na detecção histológica de placas amilóides associadas com diversos tipos de doenças (CANGELOSI, et. al., 1999; KLUNK, et. al., 1989; WU, et. al., 2012). A proteína amiloidal corada pelo VC adquire uma coloração verde-maça quando observada por microscopia óptica e produz uma birrefringência esverdeada quando sobre a luz polarizada, o que caracteriza a presença de fibras amilóides (ACEVEDO, et. al., 2018; KHURANA, et. al., 2001; HILL; LUKIWI, 2015).



A interação entre proteínas amilóides e o VC induz uma mudança característica na absorção máxima de 490 nm a 540 nm. Acredita-se que o mecanismo de interação do VC com fibras amiloidais é dependente da configuração secundária (folha- $\beta$ ) das fibrilas. A birrefringência positiva induzida pelo VC pode ser explicada pela orientação paralela do VC com as fibrilas e o confinamento físico resultante da proximidade das cadeias de polipeptídeos. Quando o VC se liga às fibrilas amilóides ricas em folha- $\beta$ , as moléculas VC adotam uma orientação específica (o eixo longo das moléculas de VC encontram-se paralelas ao eixo da fibrila) tornando-se restrito à torção, induzindo assim um aumento característico de absorção e um desvio para o vermelho no comprimento de onda de absorção máximo de 490-540 nm. Outro modelo postula o alinhamento do VC paralelo às cadeias peptídicas e perpendiculares à direção da fibrila (KLUNK, et. al., 1989; CARTER; CHOU, 1998; FRIDA; ANISIMOV, 2007; WU, et. al., 2012).

### **3.4 Quiralidade em Compostos Biarílicos**

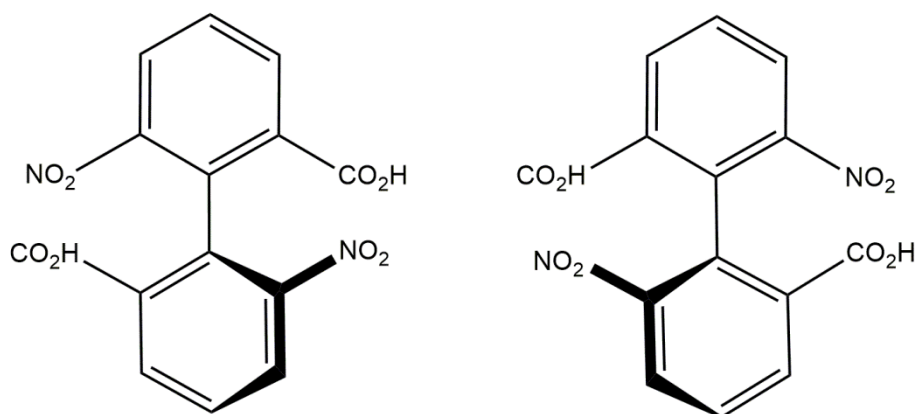
Compostos biarílicos quirais são amplamente estudados devido à sua importância na química de produtos naturais e, como reagentes ou catalisadores em metodologia sintética (VACHON, et. al., 2007). Existem algumas moléculas que possuem porções de biarilo e apresentam quiralidade intrínseca mesmo não possuindo centros quirais, que é uma consequência da barreira energética que impede a livre rotação em torno da ligação simples que ligam os anéis arilo. A quiralidade intrínseca destes sistemas resulta da coplanaridade dos dois anéis fenila ou arila e leva a interações repulsivas entre os substituintes na posição orto e ortho', e é, assim, evitada (HABERHAUER, et. al., 2013).

A isomeria causada pelo bloqueio da rotação interna em torno de uma ligação simples é denominada atropoisomerismo. Esse termo vem da palavra grega atropos, onde "a" significa não e "tropos" que significa virada. É atribuído a um tipo de estereoisomerismo característico de sistemas onde a rotação livre em torno de uma ligação simples é impedida,

produzindo uma barreira energética suficientemente elevada, de modo a permitir o isolamento ou simplesmente a detecção dos diferentes rotâmeros, chamados atropoisômeros (SILVERMAN; HOLLADAY, 2014; BRINGMANN, et. al., 2005; MIKAMI, et. al., 2005).

Os primeiros exemplos de atropisomerismo se referiam exclusivamente a compostos biarilos, e, portanto, atropisomerismo é também chamado isomerismo bifenila (MIKAMI, et. al., 2003; BRINGMANN, et. al., 2005). Este tipo de isomeria axial é caracterizada pela atividade ótica promovida por um eixo de ligação, não necessitando que a substância apresente carbono assimétrico como elemento de quiralidade. O fenômeno foi observado pela primeira vez por Christie e Kenner em 1922, após a resolução dos atropoisômeros do ácido 6,6'-dinitro-2,2'-difênico (Figura 10), os quais não se mostraram interconvertíveis à temperatura ambiente (GUO, et. al., 2014; BRINGMANN, et. al., 2005).

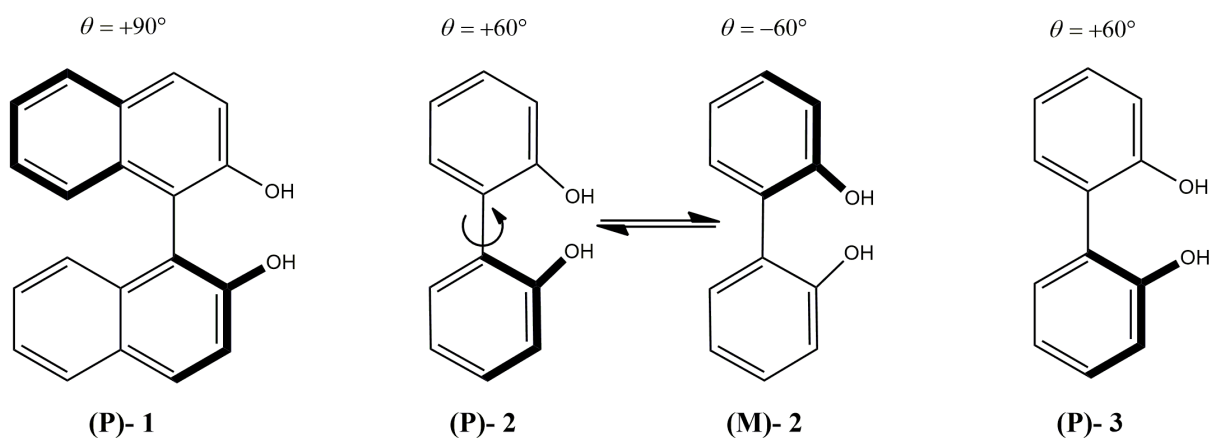
**Figura 10** – Atropoisômeros do ácido 6,6'-dinitro-2,2'-difênico.



O grau de bloqueio estérico promovido pelos grupos em torno do eixo quiral está relacionado com a estabilidade dos diferentes atropoisômeros (SILVERMAN; HOLLADAY, 2014). Dependendo da dinâmica do comportamento, os bifenilos são divididos em sistemas tropos e atropos (MIKAMI, et. al., 2005). Se os dois enantiômeros podem ser isolados a 300 K, eles são chamados atropos. Normalmente, os sistemas atropos são biarilos com

substituintes nas posições orto e orto' e uma barreira de rotação superior a 93 kJ/mol e apresentam quiralidade intrínseca mesmo não possuindo centros quirais. Derivados de bifenilo com pequenos substituintes na posição orto e orto' e que possuem rotação livre em torno do eixo são chamados tropos. Devido à baixa energia de rotação da barreira em torno da ligação C-C que liga as duas unidades de fenil, o isolamento de um único conformero não é possível, assim essa conformação é instável, não apresentando quiralidade intrínseca (HABERHAUER, et. al., 2013; WANG, et. al., 2010; VACHON, et. al., 2007). Um exemplo muito importante de biarilos atropos é o composto BINOL (Figura 11) e os seus derivados que encontram ampla aplicação na síntese assimétrica e catálises (HABERHAUER, et. al., 2013).

**Figura 11** – Sistema biarilo (1) atropos (2-3) tropos (HABERHAUER, et. al., 2013)



### 3.5 Vanilato de Metila

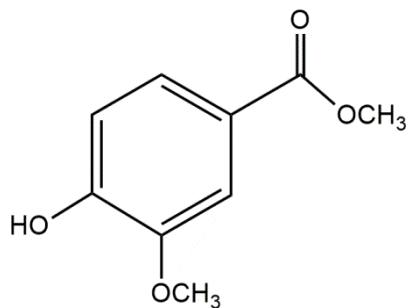
Os antioxidantes são substâncias que podem eliminar os radicais livres e ajudar a minimizar a incidência de danos provocados pelo estresse oxidativo, bem como manter o equilíbrio redox celular. Para este fim, houve um crescente interesse no uso terapêutico de antioxidantes no tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo (AMIN;SHAH;KIM, 2017).

O ácido vanílico foi associado a uma variedade de atividades farmacológicas, mas tornou-se mais popular pelo seu agradável odor cremoso (GITZINGER, et.al., 2011). Estes compostos são geralmente considerados seguros e são utilizados como fragrâncias e aditivo alimentar, são amplamente utilizados como agentes aromatizantes em produtos alimentares tais como sorvete, bebidas, pastelaria e confeitaria, e são conhecidos por terem atividade antimicrobiana em uma ampla gama de bactérias e leveduras (YEMIS, et. al., 2011). O ácido vanílico tem sido associado a múltiplas atividades farmacológicas, como a inibição da atividade do veneno de cobra, carcinogênese, apoptose, inflamação e antioxidantes. Seus mecanismos antioxidantes incluem atividade de eliminação de radicais livres, redução de potência e inibição da peroxidação lipídica. O ácido vanílico exerce efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes específicos que regularam o processo neuroinflamatório (AMIN;SHAH;KIM, 2017; GITZINGER, et.al., 2011).

Do ponto de vista biológico, os derivados ésteres do ácido vanílico foram menos estudados, mas alguns achados indicam que esses compostos também poderiam ser úteis, é o caso do vanilato de metila (4-hidroxi-3-metoxibenzoato de metila), um agente aromatizante, Figura 12, é um antioxidante cristalino de cor branca, peso molecular 182,175 g Mol<sup>-1</sup>, e possui fórmula molecular C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>. É a forma oxidada da vanilina e encontra-se em concentrações elevadas em baunilha e em *Angelica sinensis*, uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa (GITZINGER, et.al., 2011). O vanilato de metila mostrou forte efeito inibitório sobre a degranulação mediada por antígeno em células de leucemia

basofílica de ratos (ISHIMATA, et al, 2016). Também resgatou a perda óssea femoral trabecular ou cortical nos camundongos ovariectomizados sem induzir quaisquer alterações significativas de peso ou anormalidade no tecido hepático quando administrado oralmente (CHA, et al. 2014).

**Figura 12** – Estrutura molecular do vanilato de metila.

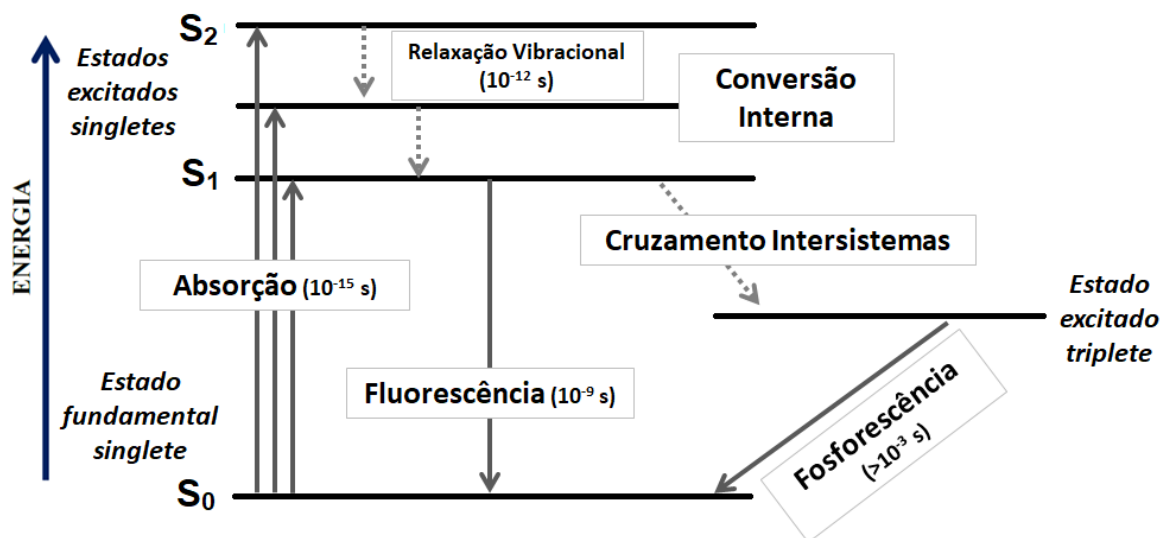


## 3.6 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS APLICADAS NESTE ESTUDO

### 3.6.1 Espectroscopia de Fluorescência

A luminescência é a emissão de luz de uma substância e ocorre a partir de um estado eletronicamente excitado, dependendo da natureza do estado excitado é dividido em duas categorias, fluorescência e fosforescência (FEREJA; HYMETE; GUNASEKARAN, 2013). O estado mais estável que uma molécula pode permanecer (estado fundamental) é caracterizado pela configuração de menor energia que seus elétrons podem ocupar. O estado excitado, que são energias acima do estado fundamental, que podem ser acessados absorvendo energia (fótons) que elevam a energia dos elétrons a estados quânticos excitados e menos estáveis. Após a excitação dos elétrons ocorre a relaxação vibracional, que leva ao retorno do elétron ao nível de menor energia vibracional. A molécula pode continuar perdendo energia até que o elétron retorne ao estado fundamental ou o elétron pode emitir a diferença de energia na forma de radiação. Quando essa fotoemissão depende do estado quântico singleto da molécula é chamado fluorescência e quando depende do estado quântico tripleto é denominado fosforescência. Fluorescência é o nome dado a essa emissão e terá sempre uma energia menor que a energia de excitação da molécula (LAKOWICZ, 1999; LAKOWICZ, 2010; FEREJA; HYMETE; GUNASEKARAN, 2013). O processo de formação e desativação dos estados excitados dos átomos e moléculas podem ser convenientemente representados através do diagrama de Jablonski. Neste diagrama as energias relativas dos estados envolvidos assim como os processos de desativação radiativos e não radiativos são mostrados (Figura 13) (DAVIDSON, 2009; DRUMMEN, 2012).

**Figura 13** - Diagrama de Jablonski ilustrando os diversos níveis de energia e suas transições. ( $S_0$ ) estado fundamental de singlete, ( $S_1$ ) primeiro estado excitado singlete, ( $S_2$ ) segundo estado excitado singlete (Adaptado de LAKOWICZ, 2010).



No fenômeno de fluorescência, os elétrons são mantidos emparelhados mesmo no estado ativado, o que ocasiona um tempo de vida curto, em torno de  $10^{-9}$  segundos. Quanto à fosforescência, o tempo de vida na fase excitada é maior devido a inversão do spin do elétron promovido, fazendo com que este apresente menor energia, tempo de vida maior, ou seja, maior que  $10^{-8}$  segundos. Os demais processos não radiativos apresentam taxa de transição em torno de  $10^{-12}$  segundos. São eles: Relaxação vibracional, cruzamento intersistemas, conversão externa e interna (FEREJA; HYMETE; GUNASEKARAN, 2013; OMARY; PATTERSON, 2017). A espectroscopia de fluorescência é um método analítico simples, não destrutivo, não-invasivo e relativamente barato, o qual pode ser utilizado para a análise de compostos fluorescentes a baixos níveis de concentração, proporcionando informações sobre a estrutura, formulação e estabilidade (PIS, et. al., 2011). A fluorescência baseia-se em dois fenômenos: absorção e emissão. A absorção de luz que promove a excitação eletrônica, ou seja, os elétrons da molécula são excitados e transferidos de orbitais moleculares do estado fundamental para orbitais ligantes e antiligantes do estado

excitado. E a emissão de radiação quando o elétron excitado regressa ao seu estado fundamental, emitindo ou não radiação, por determinados grupos presentes nas moléculas, os fluoróforos (espécie química capaz de absorver radiação eletromagnética). Dado que nem toda energia é absorvida e se perde em forma não radiante, a luz emitida sempre apresenta um comprimento de onda superior ao da luz absorvida. A eficiência da emissão é dada pelo rendimento quântico, que é a razão do número de fótons emitidos pelos absorvidos. Os processos não radiativos que geralmente competem com a emissão de radiação é a supressão, que resulta da interação das espécies fluorescentes com outras espécies presentes em solução e também pela perda de energia vibracional por parte das moléculas excitadas e relaxação vibracional (DEMCHENKO, 2015; LAKOWICZ, 2010; PIS, et. al., 2011).

A intensidade da fluorescência é determinada por uma técnica analítica e obtém-se como resultado de uma representação gráfica do espectro de emissão da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda. É uma técnica muito sensível devido a capacidade de se detectar o sinal proveniente de moléculas quando excitadas por um comprimento de onda específico e muito sensível a pequenas concentrações. Também é bastante seletiva, pois o sinal de fluorescência coletado é característico para cada molécula em estudo. As variações no sinal representam mudanças no caminho percorrido durante o decaimento do estado excitado e podem indicar transformações sofridas pela molécula (DRUMMEN, 2012; SHAHZAD; EDETSBERGER; KOEHLER, 2010; DEMCHENKO, 2015). Experimentos de fluorescência podem informar dados sobre posição espectral das bandas, rendimento quântico dos fluoróforos e anisotropia estática. Contudo, esses dados dependem das interações com o meio, constante dielétrica, polaridade e índice de refração, interações com espécies presentes no meio, pH, efeitos térmicos e alteração de viscosidade ou concentração (DRUMMEN, 2012; KAROUI; BLECKER, 2010; LAKOWICZ, 2010).

Em proteínas a fluorescência se origina dos seus aminoácidos aromáticos



fenilalanina, tirosina e triptofano, sendo que cada proteína apresenta vários resíduos diferentes e, uma vez que o ambiente de cada um é distinto, as propriedades espectrais de cada resíduo são geralmente diferentes. A fluorescência devido ao triptofano é particularmente a mais importante, pois apresenta maior rendimento quântico, emitem em um maior comprimento de onda (330-350 nm). As mudanças nos espectros de proteína podem indicar transições conformacionais, associação de subunidades, união de ligantes, desnaturação e todos os fenômenos que podem alterar o entorno dos anéis indólicos do triptofano (LAKOWICZ, 2010; DEMCHENKO, 2015).

Os espectros de fluorescência podem ser obtidos de três modos: emissão, excitação e varredura sincronizada (LAKOWICZ, 2010; RAO, 1991). A emissão ocorre em maiores comprimentos de onda que a radiação de excitação. Os espectros de emissão são obtidos medindo-se a intensidade relativa da radiação emitida como uma função do comprimento de onda mantendo-se constante o comprimento de onda de excitação (RAO, 1991; PATRA; MISHRA, 2002).

Os espectros de excitação são obtidos medindo-se a intensidade relativa de emissão num comprimento de onda fixo, enquanto o comprimento de onda de excitação é varrido. Nos espectros de excitação as bandas não são da mesma intensidade que os de emissão, pois a eficiência de conversão da energia de excitação à energia de emissão não é igual para o processo de absorção que originam cada banda no espectro (RAO, 199; PATRA; MISHRA, 2002).

Os espectros de varredura sincronizada são obtidos através da medida da intensidade de fluorescência enquanto simultaneamente são varridos os comprimentos de onda de excitação e emissão, mantendo-se constantes a diferença de comprimentos de onda entre eles, isto é:  $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$ . Quando essa diferença é usada, esta técnica pode aumentar a intensidade de alguns picos, aumentando a sensibilidade (PATRA; MISHRA, 2002; JI, et. al., 2015; CHEN, et. al., 2003; PIS, et. al., 2011). É um meio simples e eficaz

que pode fornecer algumas informações sobre a alteração do micro-ambiente molecular. Na fluorescência sincronizada quando os valores de  $\Delta\lambda$  são estabilizados a 15 nm a fluorescência sincronizada revela informação característica dos resíduos de tirosina, quando  $\Delta\lambda$  são estabilizados a 60 nm a fluorescência sincronizada revela informação característica do microambiente entorno dos resíduos de triptofano (PAUL, et. al., 2013; HOU, et. al., 2015; JI, et. al., 2015).

### 3.6.2 Supressão de Fluorescência

A supressão de fluorescência é uma ferramenta muito importante que permite obter informações sobre processos bioquímicos envolvendo moléculas, macromoléculas e agregados supramoleculares (KAROUI; BLECKER, 2010; DEMCHENKO, 2015). O *quenching* ou supressão de fluorescência é a redução da intensidade de fluorescência, que pode resultar de vários processos, supressão colisional ou dinâmica, supressão estática, transferência de energia, transferência de elétrons, etc. Destacando-se como principais os processos de supressão estática e dinâmica (SHAHABADI, et. al., 2015; SOARES, 2005; KIM; SAVIZKY, 2013). A supressão colisional ocorre quando o supressor e o fluoróforo colidem durante o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo, ou seja, ocorre quando os fluoróforos do estado excitado são desativados após contato com alguma outra molécula, o qual é chamado quencher ou supressor (KIM; SAVIZKY, 2013). A supressão estática consiste na formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor (LIU, et. al., 2015; SHAHABADI, et. al., 2015). Uma forma de quantificar a supressão estática ou dinâmica é pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_o}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + k_{sv} [Q] \quad (1)$$

Onde  $F$  e  $F_0$  são intensidades de fluorescência no estado estacionário na presença e na ausência do supressor,  $K_{sv}$  é a constante de supressão de Stern-Volmer,  $K_q$  é a constante de supressão bimolecular,  $t_0$  é o tempo de vida sem a supressão e  $[Q]$  é a concentração do supressor. Os gráficos de supressão normalmente são mostrados em gráficos  $F_0/F$  em função de  $[Q]$ , pois, se espera que a razão  $F_0/F$  tenha uma dependência linear com a concentração do supressor (LIU, et. al., 2015; RAGHURAMAN; CHATTOPADHYAY, 2004).

Um método eficiente para se distinguir entre os dois processos consiste em estudar a supressão de fluorescência em diferentes temperaturas. Através desse estudo é analisada a dependência dos valores de constantes de supressão em função da temperatura. No caso do mecanismo estático, a estabilidade do complexo é diminuída com o aumento da temperatura e, conseqüentemente, os valores de constantes de supressão ( $K_{sv}$ ) diminuem. Já o dinâmico o aumento da temperatura, induz o aumento de colisões entre fluoróforo e supressor, e como conseqüência, observa-se o aumento da constante de supressão (LIU, et. al., 2015; VALEUR, 2001; SOARES, 2005).

Em alguns casos o fluoróforo pode ser suprimido por ambos os processos, dinâmico ou estático. A característica peculiar do gráfico de Stern-Volmer é um gráfico com curvatura para cima. A expressão que descreve esse processo, equação modificada de Stern-Volmer, é dada pela seguinte equação (VALEUR, 2001; SOARES, 2005):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2 \quad (2)$$

### 3.6.3 Constante de Ligação

A afinidade de um composto com a albumina é um parâmetro muito relevante para o desenvolvimento de novos sensores, e pode ser inferida pelos valores da constante de ligação e pelo número de sítios ocupados pelo composto na estrutura proteica. Uma vez definido o processo de supressão, faz-se necessário avaliar o grau de interação entre a droga e a proteína. A afinidade de ligação é medida calculando-se a constante de ligação. Quanto maior a afinidade entre a droga e a proteína, maior sua constante de ligação. Um dos métodos para se calcular essa constante é pelo ensaio de supressão de fluorescência utilizando a equação de Stern-Volmer em sua forma logarítmica, onde  $K_a$  é a constante de ligação e  $n$  o número de sítios de ligação (SHAHABADI, et. al., 2015; LAKOWICZ, 2010; LIU, et. al., 2015; VACONCELOS; XIMENES, 2015).

$$\log_{10} \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_a + n \log [Q] \quad (3)$$

### 3.6.4 Determinação dos Sítios de Ligação em Albumina

Um procedimento usual para caracterização de sítios de ligação é o uso de sondas fluorescentes, tais como aminoácidos dansilados. Estas sondas fluorescentes foram propostas por Sudlow e colaboradores em 1975 (SUDLOW, et al., 1976/1975). Elas foram divididas em dois grupos, sendo elas: aquelas que se ligam ao sítio I e aquelas que se ligam ao sítio II da albumina. As que se ligam ao sítio I incluem o ácido dansil cisteico, dansil-L-arginina, dansil-L-glutamina e dansilamina. Para o sítio II, pode ser usado dansilsarcosina, ácido dansil- $\alpha$ -aminobutírico e dansil-L-prolina (WANG, et. al., 2011; PETERS JR, 1995, XU, et. al., 2012).

A larga aplicabilidade dos aminoácidos fluorescentes vem do fato que ao se ligarem em proteínas, ocorre um aumento significativo do rendimento quântico dos mesmos, o que serve como parâmetro analítico para verificação da ligação. Trata-se de um fenômeno associado à alteração do meio no qual o aminoácido dansilado está em contato. Ou seja, ao se deslocar do meio aquoso para o interior da proteína, o mesmo experimenta uma alteração profunda na hidrofobicidade do meio, o que afeta o seu rendimento de fluorescência (SUDLOW, et al., 1976/1975; INOUE, et. al., 2013).

### **3.6.5 Efeito de Filtro Interno**

Um obstáculo importante à utilização de métodos de fluorescência é a dependência não linear da intensidade de fluorescência com a concentração da substância fluorescente. A absorção de radiação pela amostra sofre atenuação da intensidade ao longo do percurso óptico, tanto da radiação que incide nos fluoróforos como a radiação emitida pelos mesmos, e pode provocar distorções espectrais. Essa atenuação aumenta proporcionalmente de acordo com o aumento da concentração da amostra. Este efeito, conhecido na literatura como o efeito de filtro interno (EFI), dificulta enormemente o registro de espectros de excitação de fluorescência, determinação dos parâmetros de ligação e constantes de extinção de fluorescência por desativadores externos. Esse efeito depende da capacidade das amostras de absorver radiação e dado que estas nem sempre tem a mesma absorvidade, uma mesma concentração em diferentes amostras irá provocar uma atenuação da radiação diferente (FONIN, et. al., 2014; LARSSON, et. al., 2007). O EFI é dividido em o "efeito de filtro interno primário", que é provocada pela absorção de luz de excitação de tal modo que à medida que o feixe de luz atravessa a amostra, a sua intensidade é atenuada progressivamente devido a sua absorção, e o "efeito de filtro interno secundário", onde a amostra é capaz de absorver radiação emitida pelos fluoróforos, é causado pela reabsorção de fluorescência resultando numa diminuição da intensidade do

feixe que é detectada pelo detector (FONIN, et. al., 2014; OHNO, 2002).

Assim sendo, para uma comparação de intensidades de fluorescência de bandas em espectros de diversas amostras é necessário que estes efeitos sejam minimizados ou corrigidos de modo que as interpretações sejam efetuadas de modo correto. Existem alguns modos de diminuir o EFI, um deles seria a diluição da amostra, que deve possuir absorvância suficientemente baixa. É o processo mais simples, entretanto pode levar a contaminação da amostra, a perturbações químicas, mudanças na conformação, ligação, solvatação e grau de associação das moléculas. Outra forma seria correções matemáticas que envolvem a medição da absorvância em aparelhos diferentes em que é medida a fluorescência, que propicia a introdução de erros na análise, pois são usadas diferentes fendas dos monocromadores dos espectrofluorímetros e espectrofotômetros (FONIN, et. al., 2014; KAROUI; BLECKER, 2011; LARSSON, et. al., 2007).

A correção do EFI pode ser feita através de metodologias corretivas matemáticas:

$$F_{corr.} = F_{obs.} \times 10^{\frac{A_{ex.} + A_{em.}}{2}} \quad (4)$$

Onde  $F_{corr}$  é a fluorescência corrigida para EFI,  $F_{Obs.}$  é a fluorescência detectada pelo detector,  $A_{ex.}$  e  $A_{em.}$  são absorvâncias registradas para um percurso óptico de 1 cm, ao comprimento de onda de excitação e emissão, respectivamente (LAKOWICZ, 2010; LARSSON, et. al., 2007).

### 3.6.6 Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência (FRET)

Outro processo importante que ocorre no estado excitado é a transferência de energia de ressonância. Os fenômenos de transferência de energia têm amplas aplicações

no processo de conversão de energia. Este processo ocorre sempre que o espectro de emissão do fluoróforo, chamado doador, sobrepõe com o espectro de absorção de outra molécula, chamado receptor. O receptor não precisa ser fluorescente. Tal processo de reabsorção é dependente em geral da concentração do receptor (LAKOWICZ, 2010). De acordo com a teoria da transferência de energia não radiativa de Förster, a transferência de energia ocorrerá sempre que o doador emitir fluorescência, o espectro de emissão do fluoróforo (doador) sobrepor o espectro de absorção de outra molécula (Receptor) e a distância entre doador e receptor for menor que 8 nm. Portanto, a FRET depende da distância entre a molécula dadora e receptora, bem como a orientação dos dipolos de transição do doador e do receptor (SIDDIQI, et. al., 2017). A distância em que a transferência de energia é 50% de eficiência é chamada de distância de Forster, a qual é tipicamente no intervalo de 20-60 Å. A eficiência de transferência de energia (E) para um par doador-receptor em uma distância fixa é:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (5)$$

Onde F é a fluorescência do doador na presença do receptor e F<sub>0</sub> é a fluorescência do doador na ausência do receptor, r é a distância de ligação entre doador e receptor, R<sub>0</sub> é a distância crítica quando a eficiência de transferência de energia para o receptor é de 50 %. A distância entre doador e receptor pode ser calculada utilizando a equação de Förster:

$$R_0 = 0,211(K^2 n^{-4} Q_D J)^{1/6} \quad (6)$$

Onde K é o fator de orientação espacial, n é o índice de refração, Q<sub>D</sub> é rendimento quântico do doador na ausência do receptor e J é a área da sobreposição do espectro de emissão do doador com o espectro de absorção do receptor, e pode ser avaliado integrando

a área espectral de sobreposição (LAKOWICZ, 2010). O uso da transferência de energia como um indicador de proximidade ilustra uma importante característica da transferência de energia. Transferência de energia pode ser assumida de forma confiável sempre que o doador e o receptor estiverem dentro das características da distância de Forster, e sempre que ocorrer a sobreposição espectral adequada. Os valores de  $R_0$  podem ser previstos de forma confiável a partir das propriedades espectrais do doador e receptor (LAKOWICZ, 2010).

### **3.7 Dicroísmo Circular (CD)**

Dicroísmo Circular é uma técnica espectroscópica particularmente útil para o estudo de moléculas quirais e macromoléculas, sobretudo proteínas, mas é no estudo das grandes moléculas biológicas, onde encontra suas aplicações mais importantes. A sua principal utilização é na análise da estrutura secundária ou conformação de macromoléculas, particularmente proteínas, embora também possa ser usada nos estudos de conformação de peptídeos e ácidos nucleicos. Como a estrutura secundária é sensível ao seu ambiente, a temperatura ou o pH, o CD pode ser utilizado para observar as alterações da estrutura secundária com condições ambientais ou de interações com outras moléculas. Essa técnica é amplamente utilizada porque requer amostras de baixa concentração ( $1-10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e fornece informações sobre o efeito dos ligantes adicionados. A informação estrutural, cinética e termodinâmica sobre macromoléculas podem ser derivadas a partir de espectroscopia de CD (WALLACE, et. al., 2003; GREENFIELD; 2006; ZSILA; BIKADI; SIMONYI, 2004).

É uma técnica muito utilizada para determinação de estruturas e monitoramento de mudanças estruturais de biomoléculas, baseia-se na absorção diferencial de luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita, e é aplicada quando uma molécula contém um ou mais cromóforos quirais. Nessa técnica a amostra é irradiada por



uma luz circularmente polarizada, que é transformada para luz elíptica se houver diferença na absorção de luz circularmente polarizada para direita (RHCP, da sigla em inglês *Right Hand Circularly Polarized*) e luz circularmente polarizada para esquerda (LHCP, da sigla em inglês *Left Hand Circularly Polarized*) (MICSONAIA, et. al., 2015; FASMAN, 2010; GREENFIELD; 2006; KELLY; PRICE, 2000).

Uma molécula que absorve luz circularmente polarizada para esquerda diferente da luz polarizada para direita é opticamente ativa, ou quiral. As proteínas possuem uma série de cromóforos que podem dar origem a sinais de CD. Na região UV distante (240-180 nm), que corresponde a absorção da ligação peptídica, o espectro pode fornecer informações referentes às características da estrutura secundária. Já a região UV próximo (320-260 nm) reflete o ambiente das cadeias laterais de aminoácidos aromáticos e, assim, fornece informações sobre a estrutura terciária da proteína (KELLY; PRICE, 2000). Os espectros de CD são medidos usando um espectrômetro de CD, que permite medir a dispersão da rotação óptica que é uma espectroscopia de birrefringência circular. Um sinal de CD pode ser positivo ou negativo, se a luz polarizada circularmente para esquerda é absorvida numa extensão maior do que a luz polarizada circularmente para direita (sinal positivo de CD) ou, em menor escala (sinal negativo de CD) (FASMAN, 2010; KELLY; PRICE, 2000; KELLY, et. al., 2005).

### **3.7.1 Dicroísmo Circular Induzido**

Um efeito interessante surge quando um composto quiral interage com um composto aquiral. Essas interações moleculares entre compostos quirais e aquirais pode dar origem ao ICD, que é extensivamente utilizado para o estudo da complexação. O ICD tem se mostrado ser uma técnica poderosa para os estudos das interações de moléculas orgânicas aquirais com solventes quirais para grandes sistemas tais como polímeros, ciclodextrinas e estruturas supramoleculares como micelas (MATEI, et. al., 2012). A técnica

pode fornecer informações exclusivas sobre eventos supramoleculares, não só em solução, mas também no estado sólido. Ocorre quando uma substância quiral é inserida em uma solução aquosa de um composto potencialmente aquiral, ele tornar-se-á quiral decorrente da localização no ambiente da cavidade quiral, essa indução é facilmente observada em um espectro de CD, chamado de fenômeno de indução de dicroísmo circular. Este efeito pode ser atribuído, principalmente, a atividade óptica da molécula induzida pela inclusão em uma cavidade quiral (VASCONCELOS; XIMENES, 2015; PUYALTO; VIDAL; TERRIZA, 2014; ALLENMARK, 2003; GAWRONSKI; GRAJEWSKI, 2003).

### **3.8 Docking Molecular**

O *docking* molecular tem se mostrado uma ferramenta muito útil no estudo da interação entre drogas e proteínas. É um método computacional usado no estudo das interações entre um ligante, geralmente pequeno, e uma macromolécula. Através deste método é possível prever a melhor orientação do ligante à macromolécula, caracterizar o comportamento no sítio de ligação de uma proteína bem como elucidar processos bioquímicos fundamentais. Dependendo do método utilizado, também é possível calcular a energia de ligação e as forças intermoleculares que regem a complexação (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017; MENG, et. al., 2011).

No *docking* molecular, o processo de complexação envolve a previsão da conformação, posição e orientação do ligante (pose) e a afinidade de ligação. Conhecer o sítio de ligação antes do processo de acoplamento aumenta significativamente a eficiência do método. Assim, um programa de *docking* é composto por um método de busca para o espaço conformacional e um método para avaliar a energia de cada conformação, ou seja, um algoritmo de busca e por uma função de escore. O algoritmo busca as possíveis conformações entre o ligante e a macromolécula e os resultados obtidos são avaliados pela função de escore, que avalia cada conformação, indicando da melhor à pior conformação.

Uma estratégia de encaixe é geralmente escolhida para corresponder ao objetivo e recursos computacionais disponíveis, e geralmente, a macromolécula é vista como rígida e o ligante flexível, pois, sua total flexibilidade seria muito demorada em termos de tempo e recursos, o que tornaria o método inadequado (YADAVA, 2018; BARTUZI, et. al., 2017; DU, et. al., 2016).

O constante crescimento em pesquisa e desenvolvimento de métodos de *docking* permite estudos cada vez mais avançados, possibilitando uma visão mais profunda de tais mecanismos e refletindo a importância da análise computacional. Sendo assim, o uso da metodologia de *docking* molecular combinado com estudos experimentais pode ser uma abordagem significativa para modelar a interação entre um ligante e uma proteína e entender as mudanças conformacionais que ocorrem (BARTUZI, et. al., 2017).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes e Soluções

Os reagentes e soluções utilizados neste estudo foram: albumina bovina 98% (BSA), albumina humana 98% (HSA), vermelho Congo 85% (VC -  $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ ), dansilglicina (DG -  $C_{14}H_{16}N_2O_4S$ ), dansilamida (DNSA -  $C_{12}H_{14}N_2O_2S$ ), ibuprofeno 98% ( $C_{13}H_{18}O_2$ ), varfarina ( $C_{19}H_{16}O_4$ ), naproxeno ( $C_{14}H_{14}O_3$ ), digitoxina 92% ( $C_{41}H_{64}O_{13}$ ), fenilbutazona 98% ( $C_{19}H_{20}N_2O$ ), tioflavina-T (Th-T -  $C_{17}H_{19}ClN_2S$ ), taurina bromamina (Tau-NHBr), ácido hipocloroso (HOCl), ácido hipobromoso (HOBr), metionina ( $C_5H_{11}NO_2S$ ), Cloreto de cobre II ( $CuCl_2$ ), Cloreto de Zinco ( $ZnCl_2$ ), Sulfato de Magnésio ( $MgSO_4$ ), fosfato dibásico de sódio ( $Na_2HPO_4$ ), vanilato de metila 99% ( $C_9H_{10}O_4$ ) fosfato monobásico de sódio 99% ( $NaH_2PO_4$ ), dimetilsulfóxido 99% (DMSO -  $C_2H_6OS$ ), sulfato ferroso heptahidratado ( $FeO_4S \cdot 7H_2O$ ), pentóxido de fósforo ( $P_2O_5$ ), sal hidratado de hemimagnésio de Ácido 8-Anilino-1-naftaleno-sulfonato 95% (ANS -  $C_{16}H_{12}Mg_{0.5}NO_3S \cdot xH_2O$ ) todos fornecidos pela Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Álcool etílico 99% ( $C_2H_6O$ ) fornecidos pela J. T Baker Chemical Company (Phillipsburg, New Jersey). Hidróxido de sódio 98% (NaOH) fornecido pela Carlo Erba Reagenti (Rodano, Itália) e ácido clorídrico 37% (HCl) fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha). Persulfato de potássio 99% ( $K_2S_2O_8$ ) fornecido pela Labsynth (Diadema, São Paulo, Brasil).

### 4.2 Preparo de Soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. A água foi purificada e deionizada em um sistema de purificação Milli-Q, M Millipore, Simplicity (Darmstadt, Germany). Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram usados tal como fornecidos sem purificação adicional.

#### **4.2.1 BSA**

Para o preparo da solução estoque de BSA  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  foram pesados 66 mg de BSA e diluídos em 1 mL de tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 em um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### **4.2.2 Dansilglicina**

Para o preparo de 5 mL da sonda DG a  $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (massa molar =  $308,35 \text{ g mol}^{-1}$ ), foram pesados 7,7 mg de DG e em um balão volumétrico de 5 mL, foi adicionado DMSO. E a partir desta fizeram-se as diluições necessárias em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 mM, para cada experimento.

#### **4.2.3 Vermelho Congo**

Para o preparo da solução estoque de VC  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  foram pesados 8,2 mg de VC (massa molar= $699,66 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 1 mL de água deionizada em um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### **4.2.4 Tampão Fosfato pH 7,0**

Para o preparo da solução tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0, foram preparadas soluções de fosfato dibásico de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (3,55 g em 0,5 L de água) e de fosfato monobásico de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (3,45 g em 0,5 mL de água). Em um béquer foram adicionados 250 mL da solução de fosfato monobásico de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . O ajuste do pH

foi realizado em um medidor de pH Analyser modelo 300 Digital (São Paulo, Brasil), adicionando-se cerca de 320 mL da solução de fosfato dibásico de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ .

#### **4.2.5 Dansilamida**

Para o preparo da solução estoque de DNSA  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ , foram pesados 6,25 mg de DNSA (massa molar =  $250,32 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento em água.

#### **4.2.6 Ibuprofeno**

Para o preparo da solução estoque de Ibuprofeno  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 2,06 mg de ibuprofeno (massa molar= $206,28 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 1 mL de etanol em um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### **4.2.7 Varfarina**

Para o preparo da solução estoque de varfarina  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 3,08 mg de varfarina (massa molar= $308,33 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 1 mL de etanol em um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### **4.2.8 Naproxeno**

Para o preparo da solução estoque de naproxeno  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 2,30 mg de naproxeno ( $230,26 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 1 mL de etanol em um tubo de

microcentrifugação de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### **4.2.9 Digitoxina**

Para o preparo da solução estoque de digitoxina  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 8,31 mg de digitoxina (massa molar= $764,94 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) em um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### **4.2.10 Fenilbutazona**

Para o preparo da solução estoque de fenilbutazona  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 3,08 mg de fenilbutazona (massa molar= $308,37 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 1 mL de etanol em um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### **4.2.11 Divanilato de Metila**

Para o preparo da solução estoque de DV  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 3,62 mg de DV (massa molar= $362,36 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### **4.2.12 Vanilato de Metila**

Para o preparo da solução estoque de V  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 3,64 mg de DV (massa molar= $182,18 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### 4.2.13 Tioflavina-T

Para o preparo da solução estoque de Th-T  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 3,18 mg de Th-T (massa molar= $318,86 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 1 mL de solução tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 em um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### 4.2.14 Ácido Hipocloroso, Ácido Hipobromoso e Taurina Bromamina

HOCl foi preparado através da diluição de uma solução concentrada de ( $1,53 \text{ mol L}^{-1}$ ). O HOCl foi diluído a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em água (66  $\mu\text{L}$  de HOCl para 934  $\mu\text{L}$  de água). HOBr foi sintetizado através da combinação de HOCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e NaBr  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  em água. Tau-NHBr foi preparado na proporção 100:1 (taurina:HOBr), pela combinação de Taurina  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e HOBr  $0,005 \text{ mol L}^{-1}$  (950  $\mu\text{L}$  de taurina  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  para 50  $\mu\text{L}$  HOBr  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

#### 4.2.15 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

Para o preparo da solução estoque de SDS  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 28,8 mg de SDS (Massa molar =  $288,38 \text{ g/mol}$ ) e diluídos em 10 mL de água deionizada, e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### 4.2.16 Cloreto de Cobre II

Para o preparo da solução estoque de Cloreto de cobre II ( $\text{CuCl}_2$ )  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 26,89 mg de  $\text{CuCl}_2$  (massa molar  $134,45 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 1 mL de tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 em um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.



#### **4.2.17 Cloreto de Zinco**

Para o preparo da solução estoque de Cloreto de Zinco ( $\text{ZnCl}_2$ )  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 27,26 mg de  $\text{ZnCl}_2$  (massa molar= $136,3 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 1 mL de tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 em um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### **4.2.18 Sulfato de Magnésio**

Para o preparo da solução estoque de Sulfato de Magnésio ( $\text{MgSO}_4$ )  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 24,07 mg de  $\text{MgSO}_4$  (massa molar= $120,37 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 1 mL de tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 em um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### **4.2.19 Ácido 8-Anilino-1-naftaleno-sulfonato (ANS)**

Para o preparo da solução estoque de ANS  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 32,63 mg de ANS (massa molar= $310 \text{ g mol}^{-1}$ ) e diluídos em 1 mL de solução tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 em um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

#### **4.2.20 HSA**

Para o preparo da solução estoque de HSA  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  foram pesados 66 mg de HSA e diluídos em 1 mL de tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 em um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

## 4.3 Procedimento

### 4.3.1 Ensaio de Fluorescência, Quenching e Correção de Filtro

Os espectros de fluorescência foram obtidos através do ajuste do espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Shelton, CT, USA) em 295 nm para excitação e varredura de emissão na faixa de 310 a 450 nm. As fendas foram ajustadas para 2,5 nm. Os experimentos foram realizados em uma cubeta de quartzo de 3 mL sob agitação magnética a temperatura de 25 °C. As medidas de *quenching* de fluorescência foram realizadas com a adição de quantidades variadas de VC (0-2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em concentração fixa de BSA (2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato de sódio 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0. As medidas de *quenching* de fluorescência também foram realizadas com a adição de quantidades variadas de DV (0-2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em concentração fixa de BSA (2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e HSA (2,5  $\mu\text{M}$ ) em tampão fosfato de sódio 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0. Depois da adição dos compostos de interesse, as misturas foram incubadas por 5 minutos antes das medidas de fluorescência. As intensidades de fluorescência foram corrigidas pelo EFi causado pela atenuação dos sinais de excitação e emissão provocadas pela absorção do composto. Todos os ensaios foram executados em triplicata.

### 4.3.2 Efeito da Elipticidade Induzida em Vermelho Congo e Divanilato de metila

Os estudos de CD foram realizados em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Japan) equipado com controle termostático e agitação magnética no compartimento de amostra. Todas as leituras foram corrigidas para a absorção do tampão fosfato 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0. Para os estudos na região UV próximo (*near-UV-CD*), foi utilizado uma cubeta de quartzo de 3 mL de 10 mm de caminho óptico, concentração de 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BSA na ausência e na presença de VC 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Também foram feitos estudos com BSA e HSA nas concentrações 30  $\mu\text{M}$  em diferentes concentrações de DV 10,

20 e 30  $\mu\text{M}$ . As amostras foram encubadas por 5 min antes de cada medida. Os estudos foram realizados em tampão fosfato 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0. Os espectros foram obtidos em comprimento de onda entre 600-250 nm, com uma resolução de 1 nm, tempo de resposta 1 s e velocidade de escaneamento 50 nm/min. Todos os ensaios foram executados em triplicata.

#### **4.3.3 Ensaio de Deslocamento Utilizando Sondas Fluorescentes**

Os estudos de deslocamento das sondas fluorescente para análise de sítios de ligação foram realizados através da utilização das sondas dansilglicina (sítio II) e dansilamida (sítio I). Para os ensaios de deslocamento o espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Shelton, CT, USA) foi ajustado em 340 nm para excitação e varredura de emissão na faixa de 400 a 650 nm. As fendas foram ajustadas para 2,5 nm. Os experimentos foram realizados em uma cubeta de quartzo de 3 mL de 10 mm de caminho óptico, sob agitação magnética a temperatura de 25 °C. Os estudos foram realizados em tampão fosfato 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0. Foram adicionadas diferentes quantidades de VC (0-5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  BSA e 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  das sondas (dansilglicina e dansilamida). Depois da adição de cada composto, a mistura foi incubada por 5 minutos antes da realização de cada medida. O mesmo procedimento foi realizado para diferentes concentrações de DV, fenilbutazona, Ibuprofeno e varfarina (0-15  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  BSA e 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  das sondas. O experimento também foi realizado para proteína HSA na concentração de 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Todos os ensaios foram executados em triplicata.

#### **4.3.4 Ensaio de Deslocamento Utilizando Ligante de Sítio I**

Os estudos de deslocamento de sonda de sítio I para análise de sítios de ligação foram realizados através da utilização da sonda varfarina (sítio I). Para os ensaios de

deslocamento o espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Shelton, CT, USA) foi ajustado em 310 nm para excitação e varredura de emissão na faixa de 330 a 450 nm. Os experimentos foram realizados em uma cubeta de quartzo de 3 mL de 10 mm de caminho óptico, sob agitação magnética a temperatura de 25 °C. Foram adicionados diferentes quantidades de DV, fenilbutazona e ibuprofeno ( $0-10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), mantendo fixas as concentrações de proteína e varfarina ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Neste experimento foram utilizadas as proteínas BSA e HSA. Depois da adição de cada composto, a mistura foi incubada por 5 minutos antes da realização de cada medida. Todos os ensaios foram executados em triplicata.

#### **4.3.5 Efeito dos Ligantes de Sítio I, II e III da Albumina na Elipticidade Induzida em Vermelho Congo e Divanilato**

Para os estudos na região UV próximo (*near-UV-CD*), foi utilizado um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Japan). As medidas foram realizadas em uma cubeta de 3 mL de 10 mm de caminho óptico, concentração de  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  de proteína, VC  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  e concentrações crescentes dos compostos em estudo: varfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, naproxeno, dansilglicina e digitoxina ( $0-120 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Os estudos foram realizados em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, 25 °C Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda entre 600-250 nm, com uma resolução de 1 nm, tempo de resposta 1 s e velocidade de escaneamento 50 nm/min. Os estudos foram realizados nas mesmas condições para o DV na concentração de  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ , proteína (BSA e HSA)  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  e concentrações crescentes dos compostos em estudo: varfarina, ibuprofeno e digitoxina ( $0-60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Todos os ensaios foram executados em triplicata.

#### 4.3.7 Fluorescência Sincronizada

Os espectros de varredura sincronizada foram obtidos medindo a intensidade de fluorescência enquanto simultaneamente são varridos os comprimentos de onda de excitação e emissão, mantendo-se constante uma diferença de comprimentos de onda entre eles. Essa técnica pode aumentar a intensidade de alguns picos, aumentando a sensibilidade do método. As medidas de fluorescência sincronizada foram obtidas usando um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Shelton, CT, USA) ajustado em varredura de emissão na faixa de 250 a 500 nm e  $\Delta\lambda$  com valores de 15 e 60 nm. As fendas foram ajustadas para 2,5 nm. Os experimentos foram realizados em uma cubeta de quartzo de 3 mL de 10 mm de caminho óptico, sob agitação magnética. Foram feitas medidas de BSA, VC e do complexo BSA:VC, nas concentrações finais  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os estudos foram realizados em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Todos os ensaios foram executados em triplicata.

#### 4.3.8 Efeito da Ligação do Vermelho Congo na Estrutura da Albumina

Para os estudos no UV distante (*Far-UV-CD*) foi usada uma cubeta de quartzo de 1 mL e 2 mm de caminho óptico. As medidas foram feitas em um espectrofluorímetro Jasco J-815 (Jasco, Japan) com concentração de BSA  $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  no comprimento de onda entre 195-250 nm. As mesmas medidas foram feitas acrescentando VC com concentração final de  $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os estudos foram realizados em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os espectros foram realizados em duplicata, obtidos com uma resolução de 1 nm, tempo de resposta de 1 s e velocidade de escaneamento de 50 nm/min. As curvas de desnaturação térmica foram determinadas por monitoração da modificação na elipticidade a 222 nm na faixa de temperatura de 25-95  $^\circ\text{C}$  com uma velocidade de aquecimento de  $1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . A

temperatura foi medida em intervalos de 1 °C, mantendo durante 30 s antes das medições a cada temperatura. Todos os ensaios foram executados em triplicata.

#### 4.3.9 Interação entre Proteína e Oxidante

Para os estudos de CD na região UV próximo (*near-UV-CD*) foi utilizada uma cubeta de 10 mm de caminho óptico, sob agitação magnética, concentração final de 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BSA, 300 e 600  $\mu\text{mol L}^{-1}$  dos oxidantes: HOCl, HOBr, Tau-NHBr e mantido em repouso por 12 horas a 25 °C. Foi preparada uma amostra controle contendo apenas proteína na concentração final de 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BSA. Em seguida foi adicionado metionina em concentração final de 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para reagir com qualquer excesso de oxidante que não tenha reagido. Os estudos foram realizados em tampão fosfato 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0. Após 1 hora foi adicionado VC na concentração final de 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os espectros foram realizados em duplicata, na faixa de comprimento de onda entre 600-250 nm, com uma resolução de 1 nm, tempo de resposta 1 s e velocidade de escaneamento 50 nm/min. Foram realizadas medidas de fluorescência usando um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Shelton, CT, USA) ajustado em 295 nm excitação e varredura de emissão na faixa de 310 a 450 nm. As fendas foram ajustadas para 2,5 nm. Os experimentos foram realizados em uma cubeta de quartzo de 3 mL. Para os estudos UV distante (*Far-UV-CD*) foi utilizado um espectrofluorímetro Jasco J-815 (Jasco, Japan). As medidas foram realizadas em uma cubeta de 1 mL de 2 mm de caminho óptico sobre comprimento de onda entre 195-250 nm e as amostras foram diluídas a 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os espectros foram realizados em duplicata e obtidos com uma resolução de 1 nm, tempo de resposta de 1 s e velocidade de escaneamento de 50 nm/min. Todos os ensaios foram executados em triplicata.

#### **4.3.6 Espalhamento de Luz**

Os estudos de espalhamento de luz foram realizados utilizando uma solução de BSA, VC e da mistura BSA:VC com concentração final de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ . As medidas foram realizadas em um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Shelton, CT, USA) com abertura de fenda de excitação e emissão ajustados para 5 e 15 nm respectivamente. Os experimentos foram realizados em uma cubeta de quartzo de 3 mL de 10 mm de caminho óptico, sob agitação magnética a temperatura de 25 °C. Os espectros de fluorescência foram obtidos em comprimento de onda de excitação de 350 nm e varredura de emissão na faixa de 300 a 400 nm. Todos os ensaios foram executados em triplicata.

#### **4.3.10 Efeito da Temperatura na Elipticidade Induzida em Vermelho Congo**

As alterações induzidas pela temperatura do sinal de ICD do vermelho do Congo foram monitoradas em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Japan), por análise dos espectros (350-600 nm) na faixa de temperaturas de 30-90 °C com uma velocidade de aquecimento de 1 °C/min, mantendo em repouso por 30 s antes de cada medida e cada espectro foi obtido no intervalo de 2 °C. Foram realizados estudos na região do UV próximo (near-UV-CD), foi utilizado uma cubeta de 3 mL de 10 mm de caminho óptico. As medidas foram feitas para solução de BSA:VC  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ . A curva de desnaturação térmica foi obtida por monitoração da modificação na elipticidade a 490 nm na faixa de temperatura de 25-95 °C com uma velocidade de aquecimento de 1 °C/min. A temperatura foi medida em intervalos de 1 °C, mantendo durante 30 s antes das medidas a cada temperatura. As experiências foram realizadas utilizando um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Japan) equipado com um suporte de célula termostaticada controlada (Jasco, Tóquio, Japão). Todos os ensaios foram executados em triplicata.

#### 4.3.11 Caracterização de Agregados Amilóides

Foram encubadas amostras de BSA na concentração de  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tubos de microcentrifugação de 2 mL, por 2,5 horas, sob agitação contínua de aproximadamente 300 rpm a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  em um agitador de microtubos com aquecimento (Agimaxx, modelo AG-100). Foi preparada uma amostra controle com mesma concentração de BSA, mantida a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para monitorar a formação das fibras amilóides as amostras foram divididas em quatro partes e foram empregados os métodos com Th-T, VC, espalhamento de luz e medidas de ICD. As medidas de fluorescência e absorbância foram realizadas em um multidetector adaptado para microplacas Molecular Devices Spectra Max M2 (Sunnyvale, CA, EUA). As concentrações finais das sondas, Th-T e VC foram  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  que foram adicionadas a cada amostra e mantidas sobre agitação por 15 minutos. As amostras foram monitoradas pela excitação da Th-T em 435 nm e pela emissão de fluorescência nos comprimentos de onda entre 450 a 600 nm. As medidas foram feitas em uma placa 96 poços em PS, Labsystems, preta. O monitoramento pelo VC foi feito pelas medidas de absorbância, na varredura de comprimento de onda de 400 a 650 nm, em uma placa 96 poços em PS, Greiner, transparente.

A dispersão de luz, uma indicação da agregação de proteínas, foi medida em um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Shelton, CT, USA) ajustado com excitação a 350 nm e varredura de emissão entre 300 e 400 nm, largura de fenda de 2,5 nm tanto para excitação como para emissão. As aberturas de fenda de excitação e emissão foram ajustados para 5 e 15 nm respectivamente. Foi utilizado uma cubeta de quartzo de 3 mL de 10 mm de caminho óptico sob agitação magnética. O estudo foi realizado diluindo a amostra inicial para uma concentração final de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de BSA. Os estudos de CD na região UV próximo (*near*-UV-CD) foram realizados em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Japan), equipado com controle termostaticado e agitação magnética no compartimento de amostra. As medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 3 mL de 10 mm de caminho óptico adicionando VC na concentração final de  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  nas amostras. Os



espectros foram obtidos em duplicata, em comprimento de onda entre 600-250 nm, resolução de 1 nm, tempo de resposta 1 s e velocidade de escaneamento 50 nm/min. Todos os ensaios foram executados em triplicata.

#### **4.3.12 Efeito da Temperatura na Elipticidade Induzida em Divanilato**

BSA e HSA foram incubadas nas concentrações de 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em tubos de microcentrifugação de 2 mL, por 2,5 horas, sob contínua agitação de aproximadamente 300 rpm a 70 °C em um agitador de microtubos com aquecimento (Agimaxx, modelo AG-100). Foi preparada uma amostra controle com mesma concentração de cada proteína, mantida a 25 °C. Para monitorar a formação das fibras amilóides foi empregado os métodos com Th-T. As medidas de fluorescência foram realizadas em um multidetector adaptado para microplacas Molecular Devices Spectra Max M2 (Sunnyvale, CA, EUA). A concentração final da sonda Th-T foi de 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  que foi adicionada a cada amostra e mantida sobre agitação por 15 minutos. As amostras foram monitoradas pela excitação da Th-T em 435 nm e pela emissão de fluorescência nos comprimentos de onda entre 450 a 600 nm. As medidas foram feitas em uma placa 96 poços em PS, Labsystems, preta. Os estudos de CD na região UV próximo (*near-UV-CD*) foram realizados em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Japan), equipado com controle termostático e agitação magnética no compartimento de amostra. As medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 3 mL de 10 mm de caminho óptico adicionando VC na concentração final de 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  nas amostras. Os espectros foram obtidos em duplicata, com extensão de comprimento de onda entre 600-250 nm, resolução de 1 nm, tempo de resposta 1 s e velocidade de escaneamento 50 nm/min. Todos os ensaios foram executados em triplicata.

#### 4.3.13 Estudos de FRET – Transferência de Energia

Os ensaios de fluorescência foram executados em um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Shelton, CT, USA) ajustando o comprimento de onda em 295 nm para excitação e varredura de emissão na faixa de 310 a 450 nm. As fendas foram ajustadas para excitação (10 nm) e emissão (10 nm). Os experimentos foram realizados com 3 mL de volume total de solução em uma cubeta de quartzo de 3 mL com 10 mm de caminho óptico sob agitação magnética constante em temperatura de 25°C. As medidas de fluorescência foram realizadas em BSA (5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e para mistura BSA-Dianilato (5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato de sódio 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0. Depois da adição dos compostos de interesse, as amostras foram incubadas por 2 minutos antes da realização das medidas de fluorescência. Todos os valores máximos de fluorescência foram corrigidos devido ao EFI causado pela atenuação dos sinais de excitação e emissão provocadas pela absorção das espécies. As absorvâncias foram medidas em um espectrofotômetro, Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS (Shelton, CT, USA) realizando a leitura na faixa de 280 nm a 400 nm a temperatura de 25°C em uma cubeta de quartzo de 3 mL com um volume total de solução de 3 mL. Os ensaios foram executados em triplicata para concentrações de DV (5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e DV-proteína (5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0. As proteínas utilizadas foram BSA e HSA.

#### 4.3.14 Síntese do Divanilato de Metila

Para a síntese do DV foram dissolvidos 6 mmol de vanilato (1,1g) em 200 mL de água sob aquecimento. Em seguida, em aquecimento e agitação constante, foram adicionados 0,3 mmol de sulfato ferroso heptahidratado (85 mg) e 3 mmol de persulfato de potássio (810 mg). O aquecimento foi cessado após três minutos e a solução mantida em repouso por 30 minutos. O precipitado foi filtrado e lavado com 500 mL de água quente e em seguida com 400 mL de água gelada. O produto obtido foi levado ao forno por 96 horas a

60°C e em seguida submetido a secagem a vácuo sobre pentóxido de fósforo por 24 horas. A determinação da pureza foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em linha com um detector de arranjo de diodos e monitorado em 230 a 600 nm (Jasco, Tóquio, Japão). As análises foram feitas numa coluna de fase reversa Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) utilizando solvente A (solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%) e solvente B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila) como fase móvel. O gradiente utilizado para o solvente foi: solvente A (80% a 20%) em 20 min. A taxa de fluxo foi de 5 mL/min. Para a análise foram preparadas soluções padrões de vanilato e DV em tampão fosfato, 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, na concentração de 100 µmol L<sup>-1</sup>. A caracterização da amostra foi realizada por RMN para <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro de RMN Bruker DRX 400 (MA, USA). Para as análises de RMN foi utilizado solução de DMSO- *d*<sub>6</sub> como referência interna para <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, operando em frequência de prótons de 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C e deslocamento químico (δ) em ppm.

#### 4.3.15 Estudos de *Docking* molecular

A interface Autodock (Versão 4.2.6) foi usado para simulação de *docking* para a interação do DV junto às proteínas HSA e BSA. As estruturas cristalográficas das proteínas foram obtidas do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) sob os códigos 3v03 e 4or0 (BSA) e 1a06 e 1e7a (HSA), e somente a cadeia A de ambas as proteínas foram selecionadas para o estudo.

Os *dockings* foram realizados nos sítios de interesses das respectivas proteínas, limitando-se a uma região do sítio ativo em estudo, denominados *box 1* e *box 2* (região dos sítios I e II, respectivamente). Durante o acoplamento molecular, a proteína foi mantida rígida e o ligante flexível. Para gerar diferentes conformações, foram geradas 100 poses para cada tipo de *box* e para os quatro PDBs citados acima, produzindo assim 100

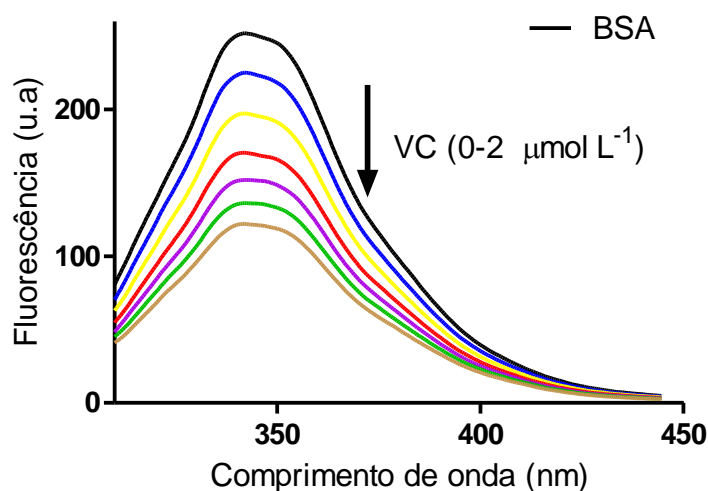
conformações para cada box e para cada proteína. Seguindo os critérios *default* adotados pelo AutoDock, as conformações com diferença em RMSD, menores que 2 Å, foram agrupadas, pelo próprio programa, em um mesmo conjunto, clusters, representado pela conformação de energia mais favorável (menor energia). As interações foram calculadas pelo programa Binana. Os estudos de *docking* molecular foram realizados por Ana Ligia Scott, Angelica Nakagawa Lima e Eric Allison Philot da Universidade Federal do ABC.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO: Estudos com o corante vermelho Congo

### 5.1 Interação do Vermelho Congo com BSA

Inicialmente estudamos as características da interação entre o VC e BSA. A abordagem analítica utilizada foi o ensaio por supressão (*quenching*) de fluorescência, um fenômeno associado com a diminuição da fluorescência e que pode ser induzido por diferentes mecanismos (ANAND, et. al., 2011; ZHU, et. al., 2018). O espectro de emissão de fluorescência da BSA é caracterizado por uma banda com máximo em 345 nm. Os resultados apresentados na Figura 14 mostram que a intensidade de fluorescência da proteína foi fortemente suprimida pela adição de VC. Esta diminuição de intensidade de fluorescência pode ser causada por desativação colisional (*quenching* dinâmico) ou formação de um complexo no estado fundamental não fluorescente (*quenching* estático), entre outros mecanismos (ZHU, et. al., 2018; SHAHABADI, et. al., 2015).

**Figura 14** - Espectro de emissão da BSA ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de VC ( $0-2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $20^\circ\text{C}$ , com excitação em 295 nm e emissão de 310 a 450 nm.



Visto que a interação do VC com a BSA resultou na supressão da fluorescência

intrínseca da biomolécula, fez-se necessário determinar por qual mecanismo esse processo ocorreu. Para isso, a supressão de fluorescência foi analisada utilizando a equação de Stern-Volmer em diferentes temperaturas (Eq. 1):

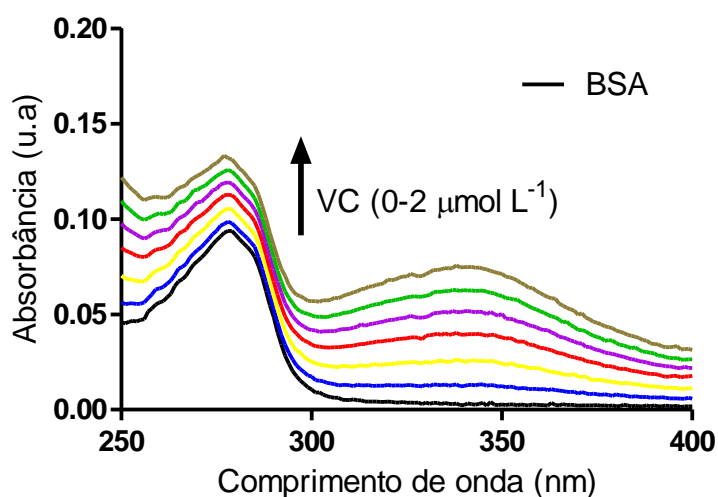
$$\frac{F_o}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + k_{SV} [Q] \quad (1)$$

Para este estudo, torna-se indispensável que as intensidades de fluorescência sejam corrigidas para minimizar o efeito de filtro interno (EFI) causado pela atenuação da emissão provocada pela absorção do composto em estudo (Eq. 4) (ZHU, et. al., 2018):

$$F_{corr.} = F_{obs.} \times 10^{\frac{A_{ex.} + A_{em.}}{2}} \quad (4)$$

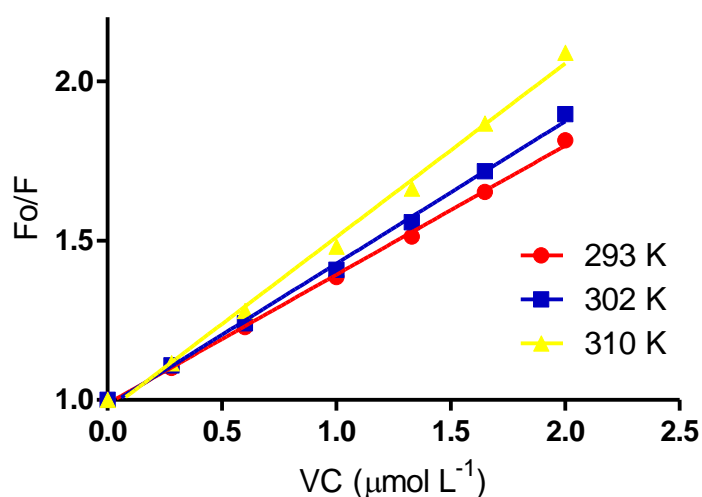
A Figura 15 mostra o espectro de UV-Vis da BSA na presença de diversas concentrações de VC, a partir das quais as medidas de absorbâncias foram utilizadas para cálculos do efeito de filtro interno, onde foram aplicados na Eq. 4 os dados obtidos em 295 nm ( $A_{ex}$ ) e 345nm ( $A_{em}$ ).

**Figura 15** - Espectro de UV-Vis da BSA ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de VC ( $0-2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $20^\circ\text{C}$ .



Aplicando o tratamento matemático de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência com os valores corrigidos verificou-se que o gráfico  $F_0/F$  em função da concentração do complexo apresentou perfil linear (Figura 16). A partir da regressão linear da equação de Stern-Volmer (Eq. 1) foram obtidos os valores da constante de supressão de Stern-Volmer ( $k_{sv}$ ), que são os coeficientes angulares das retas, para o sistema nas diferentes temperaturas estudadas (Tabela 1). Na Eq. 1,  $\tau_0$  ( $10^{-8}$  s) é o tempo de vida da proteína em estado excitado (SHAHABADI, et. al., 2015). A partir desse valor, calculou-se também a constante de supressão bimolecular ( $k_q$ ) utilizando a Eq. 7 (ZHU, et. al., 2018).

**Figura 16** - Gráfico de Stern-Volmer da BSA ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de VC ( $0-2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, com excitação em 295 nm e emissão entre 310 e 450 nm, nas temperaturas de 293, 302 e 310 K.



**Tabela 1** - Constantes de Stern–Volmer ( $k_{sv}$ ) e constante bimolecular do quenching ( $k_q$ ) para interação entre VC e BSA em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, em diferentes temperaturas.

Temperatura (K)	$k_{sv}$ ( $10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ )	$k_q$ ( $10^{13} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
293	4,0 ( $\pm 0,1$ )	4,0 ( $\pm 0,1$ )
301	4,5 ( $\pm 0,1$ )	4,5 ( $\pm 0,1$ )
310	5,5 ( $\pm 0,1$ )	5,5 ( $\pm 0,1$ )

$$k_{SV} = k_q \tau_0 \quad (7)$$

Sabe-se que a constante de velocidade para um processo bimolecular controlado por difusão, por exemplo, colisão entre moléculas, tem valor máximo de cerca de  $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Portanto, valores acima mostram que o processo de supressão não pode ser causado apenas por colisão, ou seja, processo de supressão (*quenching* dinâmico). Acima disso considera-se que ocorra formação de complexo no estado fundamental entre a proteína e o supressor (SHAHABADI, et. al., 2015). Como o valor calculado para  $k_q$  foi  $4,0 \times 10^{13} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , o qual está muito acima do valor máximo para difusão, conclui-se que a supressão na fluorescência da BSA foi causada pela complexação com o VC, isto é, ocorreu por um mecanismo de supressão estático. Em outras palavras, estes resultados indicam que ocorre a complexação entre o VC e a BSA.

Outra forma de determinar o mecanismo de supressão é pela dependência da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) em função da temperatura da amostra (WANG *et al.*, 2011). Como bem estabelecido, o processo de *quenching* dinâmico é favorecido pelo aumento de temperatura devido ao ganho cinético do sistema que proporciona maior número de colisões entre as moléculas. Já para o *quenching* estático, o aumento da temperatura leva à uma perda de estabilidade da ligação entre a proteína e o ligante e conseqüentemente diminui o valor da constante (Li *et al.*, 2014; LI; TANG; BI, 2015). Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que ao invés da diminuição da  $K_{SV}$  com o aumento da temperatura, o que indicaria um mecanismo de supressão estático, os valores de  $K_{SV}$  obtidos aumentaram com o aumento da temperatura, o que indica um mecanismo de supressão dinâmico. Em resumo, a avaliação do tipo de *quenching* utilizando os dois métodos tradicionais, ou seja, cálculo de constante bimolecular e efeito de temperatura levaram a resultados

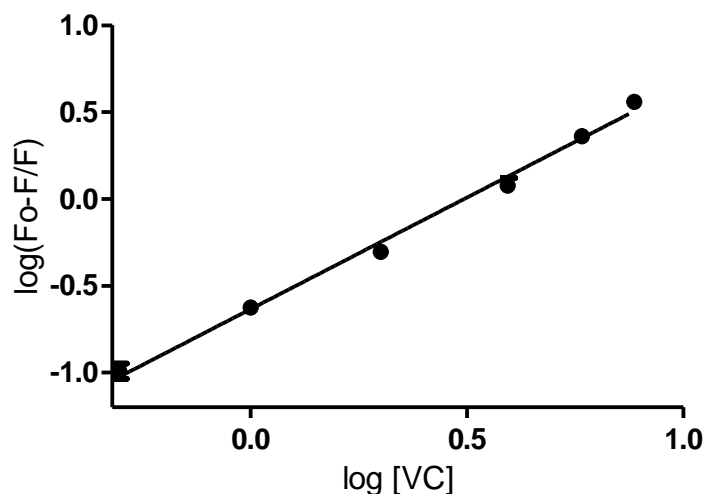


contraditórios. Vale ressaltar que não encontramos na literatura algo similar verificado para outros ligantes de albumina. Uma proposta para esta aparente contradição seria a sensibilidade que o VC apresenta no que diz respeito ao efeito de temperatura sobre a BSA como será demonstrado adiante nos estudos de ICD. Inclusive estes resultados de ICD nos fizeram aceitar como correto os valores de constante bimolecular e, portanto, aceitar que o mecanismo estático é o mais provável para explicar a supressão de fluorescência observada.

Uma vez definido que o processo de fluorescência era provocado pela complexação entre a proteína e o corante VC, pôde-se utilizar os dados de supressão para o cálculo da constante de ligação. A afinidade do VC com a BSA é um parâmetro muito relevante para o desenvolvimento de uma nova sonda, e pode ser inferida pelos valores da constante de ligação e pelo número de sítios ocupados pelo composto na estrutura protéica. Por isso, levando em conta os resultados obtidos, a afinidade de ligação (constante de ligação) entre BSA e VC foi obtida utilizando a equação (Eq. 3) (Figura 17) (LIU, et. al., 2015).

$$\log_{10} \frac{(F_0 - F)}{F} = \log Ka + n \log[Q] \quad (3)$$

**Figura 17** - Gráfico de Stern-Volmer modificado (Forma logarítmica) da BSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de VC ( $0-8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, com excitação em 295 nm e emissão entre 310 e 450 nm, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .



A partir do coeficiente linear da reta, que é o logaritmo da constante de ligação, calculou-se a mesma, resultando em  $2,2 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ , o que indica uma forte ligação do VC a BSA. É importante notar que o valor obtido é da mesma ordem de grandeza daqueles obtidos para fármacos bem estabelecidos na literatura científica como ligantes de BSA, por exemplo: ibuprofeno =  $1,3 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$  (LI, et. al., 2011) e naproxeno =  $3,8 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$  (LAMMERS, et. al., 2013). Por fim, cabe ressaltar que a constante de ligação obtida para o VC é similar daquelas publicadas por Zhang e colaboradores em 2009 ( $1,94 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ ) e mais recentemente por Paula e colaboradores em 2017 ( $5,91 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ ).

## 5.2 Elipticidade Induzida em Vermelho Congo

Sabe-se que alguns compostos podem apresentar quiralidade intrínseca, mesmo não possuindo carbono quiral. Um dos meios para que isso ocorra é quando existe uma barreira energética que impeça a livre rotação em torno da ligação simples que une anéis arílicos. Exemplo desse caso foi apresentado na introdução para com o composto ácido 6,6'-

dinitro-2,2'-difênico (GUO, et. al., 2014; BRINGMANN, et. al., 2005).

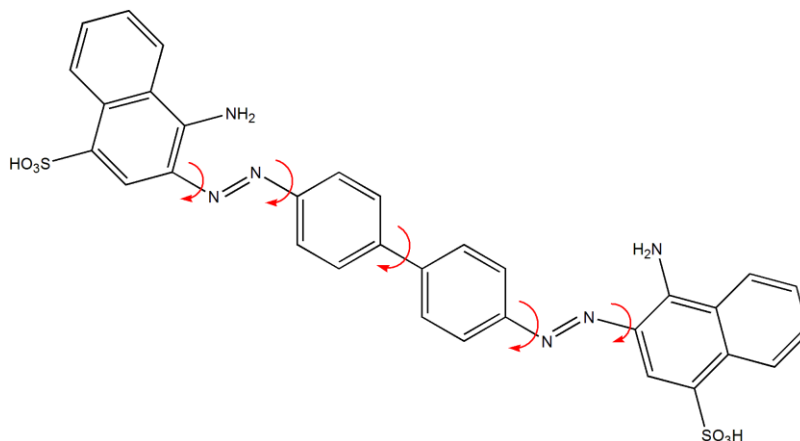
A Figura 18 mostra a estrutura molecular do VC onde estão destacadas ligações simples para as quais um impedimento energético na rotação poderia conduzir à uma molécula quiral, especificamente, quiralidade axial. No entanto, não parece haver barreira energética significativa que impeça a livre rotação na temperatura estudada, pois não foi possível observar qualquer sinal de CD para o VC em solução aquosa como apresentado na Figura 19A. A BSA por sua vez apresenta espectro de CD característico abaixo de 300 nm, que é atribuído aos resíduos de triptofanos e as ligações dissulfureto (SUN, et. al., 2005). No entanto, a ligação do VC com BSA resultou no aparecimento de um forte espectro de CD, com uma banda positiva em 412 nm e as duas bandas negativas uma a 356 nm e outra mais intensa em 490 nm (Figura 19A). Esta é uma típica evidência experimental da quiralidade induzida em uma molécula provocada por sua interação com o meio e que leve a formação de um grupo cromofórico quiral e/ou que leve à uma conformação quiral. Esta quiralidade induzida, também chamada ICD, é uma prova adicional da complexação entre BSA e VC, uma vez que surge da ligação do VC no ambiente assimétrico dentro do sítio de ligação da albumina. Resultados similares foram relatados para divanilina (VENTURINI, et. al., 2017), dansilglicina (GRACIANI; XIMENES, 2013), fenilbutazona e diazepam (NOZAKI, et. al., 2009).

Uma evidência adicional da complexação entre BSA e VC foi obtida pela análise do espectro de absorção UV-Vis do VC. É conhecido que um desvio no comprimento de onda de absorção é típico de muitas moléculas quando complexado com proteínas (VENTURINI, et. al., 2017; GRACIANI; XIMENES, 2013). Como pode ser observado, houve um desvio para o vermelho no comprimento de onda do espectro de absorção UV-Vis do VC na presença da BSA (Figura 19B).

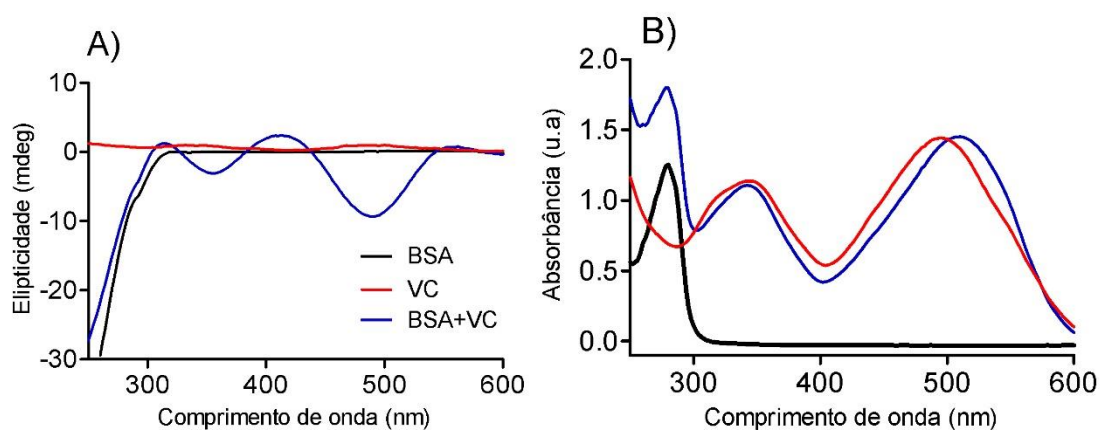
A partir dessas constatações, conclui-se que a ligação do VC com o ambiente assimétrico da BSA provocou o impedimento da livre rotação em torno da ligação simples

nos fragmentos bifenílicos do corante gerando uma estrutura quiral. A estabilização e fixação de uma conformação torcida do VC seriam responsáveis pelo espectro de ICD. Em outras palavras, o VC, um sistema tropos tornou-se atropos quando complexado com BSA.

**Figura 18** - Estrutura molecular do vermelho Congo, destacando as ligações simples onde qualquer barreira energética poderia impedir a livre rotação levando a uma molécula quiral.



**Figura 19** - A) Elipticidade induzida em VC ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) por BSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$ . B) Espectros de UV-Vis do VC ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença e na ausência de BSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$ .

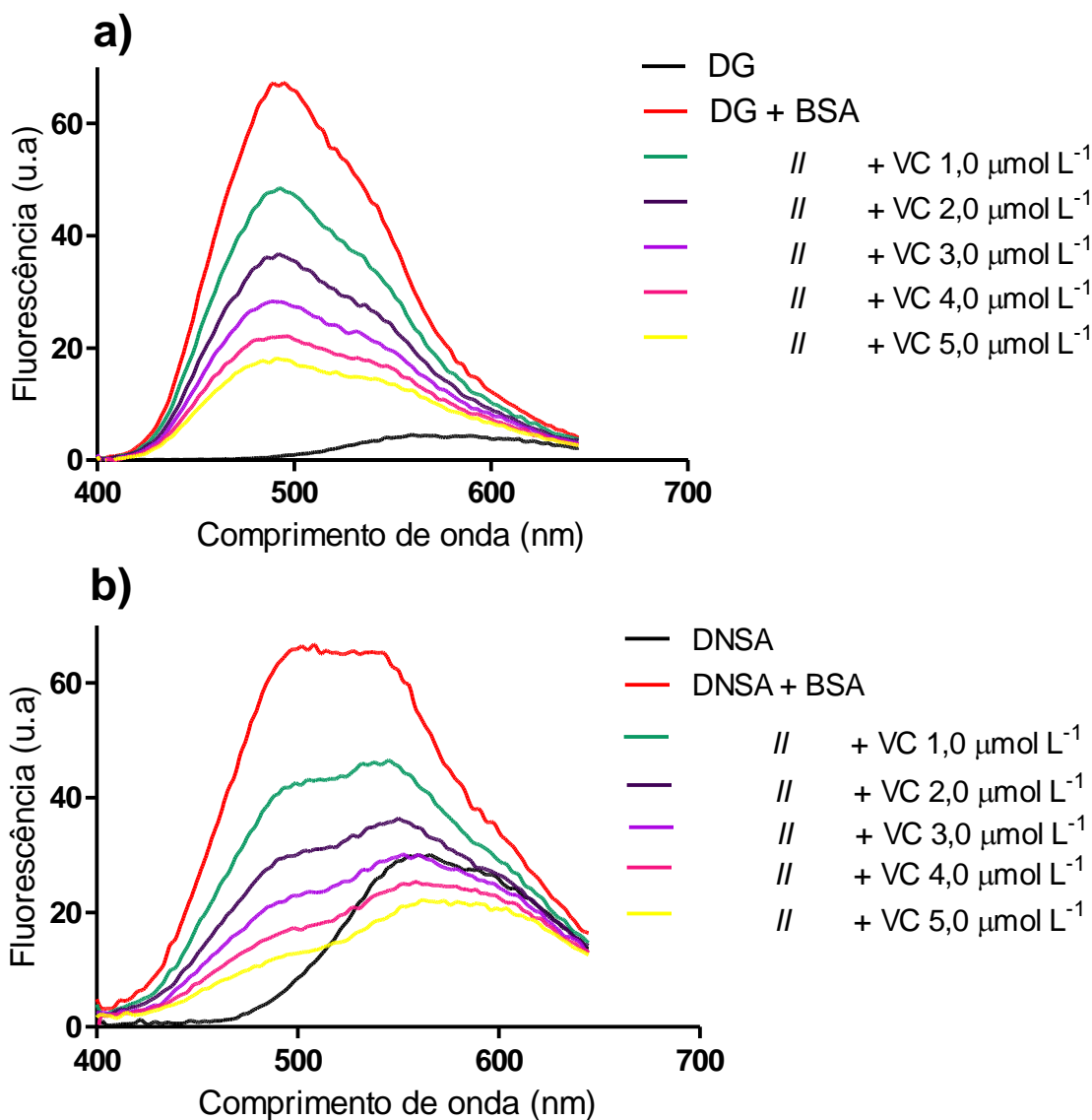


### 5.3 Determinação do Sítio de Ligação do Vermelho Congo em BSA

A partir dos ensaios de supressão de fluorescência e ICD confirmamos que o VC se ligou de forma eficiente à BSA. Na sequência realizamos estudos para elucidar o sítio de ligação do mesmo à proteína por meio de deslocamento dos marcadores fluorescentes, dansilamida (DNSA, para o sítio I em BSA) e dansilglicina (DG, para o sítio II em BSA) (VAYÁ, et. al., 2014).

Estes marcadores têm o seu rendimento quântico de fluorescência aumentado e a banda de fluorescência máxima deslocada para um comprimento de onda inferior quando ligado ao microambiente hidrofóbico da proteína. Neste modelo experimental, o deslocamento destas sondas fluorescentes, através da adição de drogas concorrente, provoca um decréscimo no rendimento quântico de fluorescência das sondas (VAYÁ, et. al., 2014, 2013; SUDLOW, et al., 1976). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 20 e mostram as características típicas deste ensaio, ou seja, o aumento da intensidade de fluorescência dos marcadores, DNSA e DG, e o desvio para o azul no máximo da banda de fluorescência quando a proteína foi adicionada. Com a adição do VC houve a diminuição da intensidade de fluorescência dependente da concentração tanto para a sonda de sítio I como para sítio II, DNSA e DG, respectivamente.

**Figura 20** - Ensaio de deslocamento de sondas fluorescêntes: A) Espectro de emissão da BSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DG ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e VC ( $0\text{-}5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$  com excitação em 340 nm. B) Espectro de emissão da BSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DNSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e VC ( $0\text{-}5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$  com excitação em 340 nm.



Portanto, o VC como um forte ligante de BSA, foi capaz de provocar o deslocamento de DNSA e DG dos seus respectivos sítios de ligação em BSA. A partir destes resultados, pode concluir-se que o VC foi capaz de se ligar a ambos os sítios de ligação da BSA. Vale ressaltar que esta conclusão baseou-se no decréscimo da fluorescência causada pela remoção do marcador do sítio de ligação da proteína. Estes resultados sugerem que o VC

pode ser considerado um ligante de sítio I e II. Este resultado é similar ao obtido por Zhang e colaboradores usando a técnica de supressão de fluorescência na presença de marcadores de sítio I e II e analisados pela equação de Stern Volmer, indicando uma preferência significativa do VC pelo sítio I e uma pequena influência pelo sítio II (ZHANG, et. al., 2009). Da mesma forma, Paula e colaboradores realizaram ensaios de competição de ligantes de sítio I, II e III da albumina e concluíram que o VC liga-se preferencialmente ao sítio I e sugerem que a ligação entre VC e BSA ocorre em regiões próximas ao sítio II e III (PAULA, et. al., 2017).

#### **5.4 Efeito dos Ligantes de Sítio I, II e III na Elipticidade Induzida em Vermelho Congo**

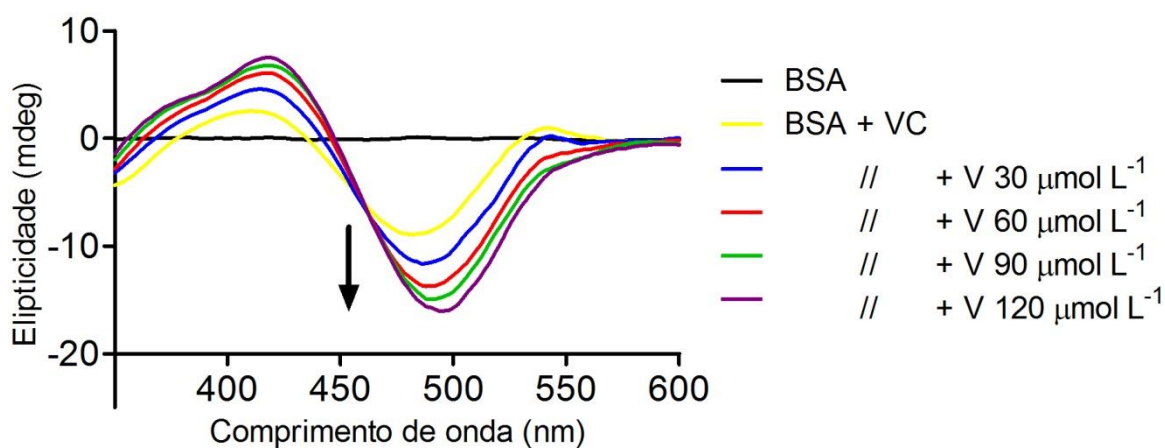
Como demonstrado por ensaio de deslocamento de sondas fluorescentes, o VC foi capaz de deslocar de forma eficiente os ligantes de sítio I e II. Assim, levando em conta que o mesmo é também suscetível a quiralidade induzida, o próximo passo foi inverter o experimento e estudar se ligantes amplamente aceitos de sítios I, II e III da BSA poderiam provocar o deslocamento do VC, isto é, provocar a perda do sinal de ICD.

Nestes estudos, o espectro ICD do VC foi utilizado para monitorar a sua remoção a partir dos locais de ligação de proteína. Vale a pena notar que, comparado a outros métodos espectroscópicos, o monitoramento de um espectro ICD pode ser um método altamente seletivo para a caracterização de locais de ligação. Em primeiro lugar, porque um espectro ICD é uma evidência inequívoca de que o ligante está ligado à proteína; segundo, porque é menos influenciado por EFI e *quenching* dinâmico, que são geralmente uma desvantagem dos experimentos à base de fluorescência e absorvância. Além disso, deve-se ressaltar que os ligantes da BSA utilizados neste estudo, varfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, naproxeno, DG e digitoxina, não possuem bandas de ICD a 490 nm, a banda escolhida para estudo do VC. Na verdade, alguns desses ligantes, tais como a varfarina (DOCKAL, et. al., 1999),

fenilbutazona (NOZAKI, et. al., 2009) e dansilglicina (GRACIANI; XIMENES, 2013), são susceptíveis a quiralidade, mas em comprimentos de onda mais baixos.

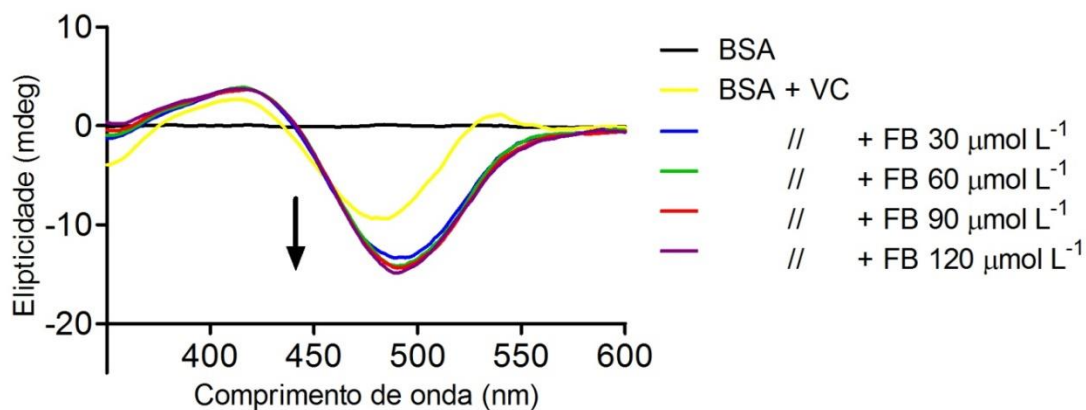
As Figuras 21 e 22 mostram os efeitos no espectro de ICD do VC após a adição de diferentes concentrações de varfarina, fenilbutazona, ambos ligantes de sítio I (MORENO; JIMÉNEZ, 1999). Considerando que a varfarina e fenilbutazona são fortes ligante de sítio I na BSA, os resultados foram opostos ao esperado, uma vez que após a adição dos mesmos houve um aumento do sinal de ICD na banda negativa em 490 nm, em vez de sua diminuição, que indicaria o deslocamento do VC de seu sítio de ligação (MAES, et. al., 1981). Além disso, também se observou um ligeiro deslocamento na banda de ICD para maior comprimento de onda, que foi dependente da concentração de varfarina. Resultados semelhantes foram obtidos por adição de fenilbutazona.

**Figura 21** - Efeito da adição de varfarina (0-120  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no espectro de ICD do complexo BSA:VC (30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.



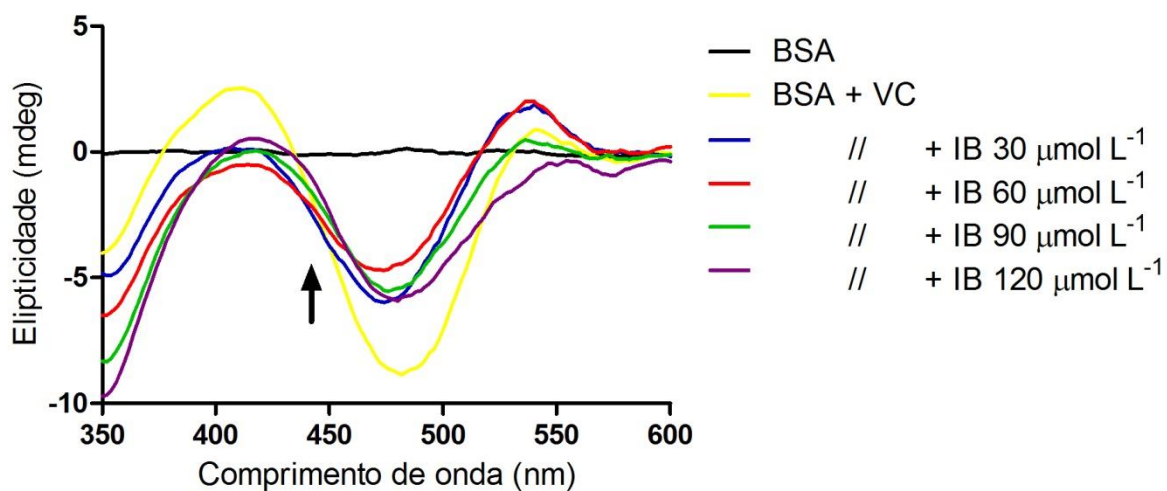


**Figura 22** - Efeito da adição de fenilbutazona ( $0-120 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) no espectro de ICD do complexo BSA:VC ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$ .

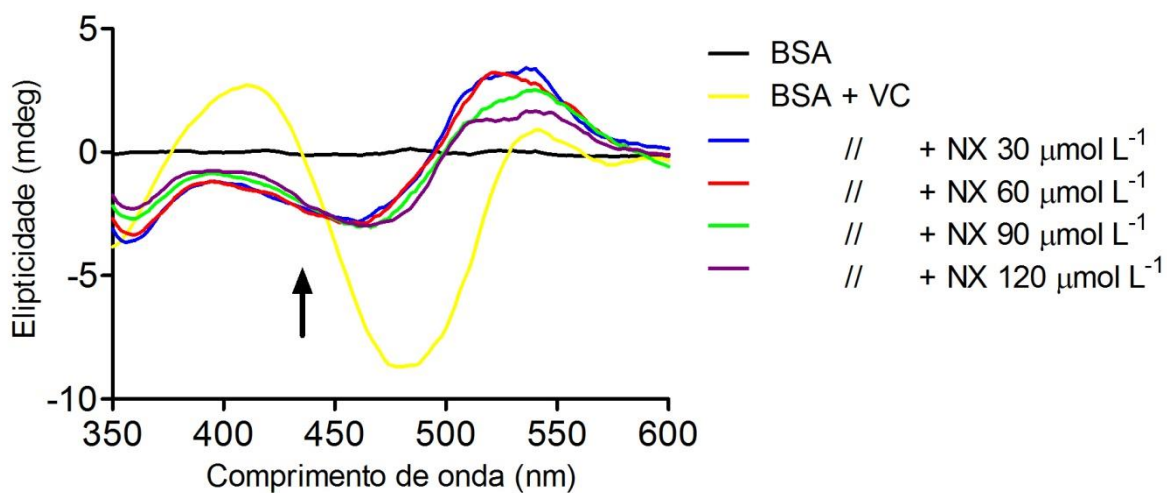


Por outro lado, a adição de dansilglicina, ibuprofeno e naproxeno, que são ligantes do sítio II, provocou efeitos opostos em comparação com os ligantes de sítios I (VAYÁ, et. al., 2014; RAHMAN, et. al., 2005). As Figuras 23, 24 e 25 apresentam os resultados obtidos para os ligantes de sítio II, ibuprofeno, naproxeno e dansilglicina, respectivamente. Como pode ser visto, o sinal ICD do VC diminuiu com a adição destes ligantes. No entanto, o sinal de ICD não foi totalmente perdido, embora a concentração do ligante competidor tenha sido quatro vezes mais elevada em comparação com a do VC.

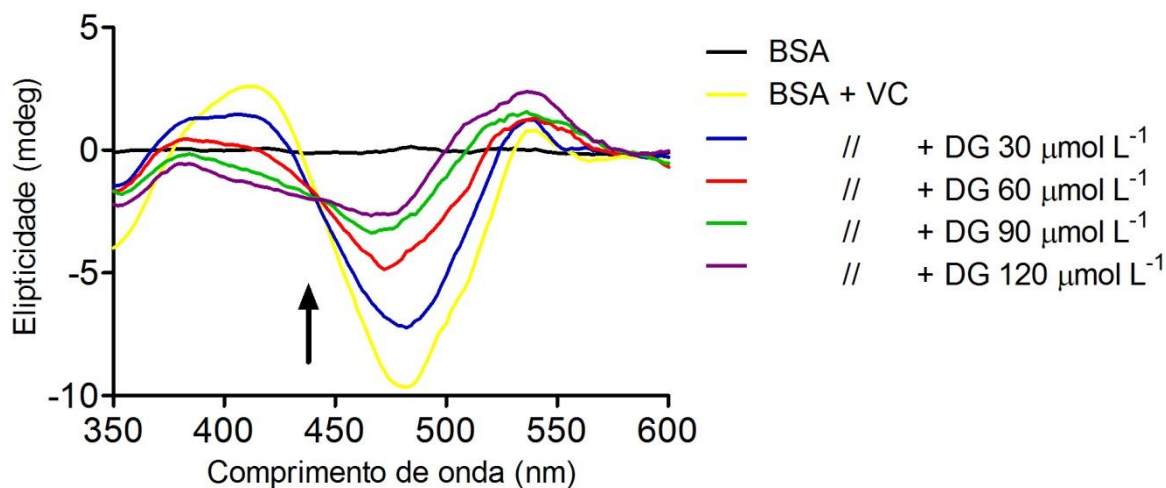
**Figura 23** - - Efeito da adição de ibuprofeno (0-120  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no espectro de ICD do complexo BSA:VC (30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C.



**Figura 24** - Efeito da adição de naproxeno (0-120  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no espectro de ICD do complexo BSA:VC (30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,05  $\text{mol L}^{-1}\text{M}$ , pH 7,0 a 25°C.

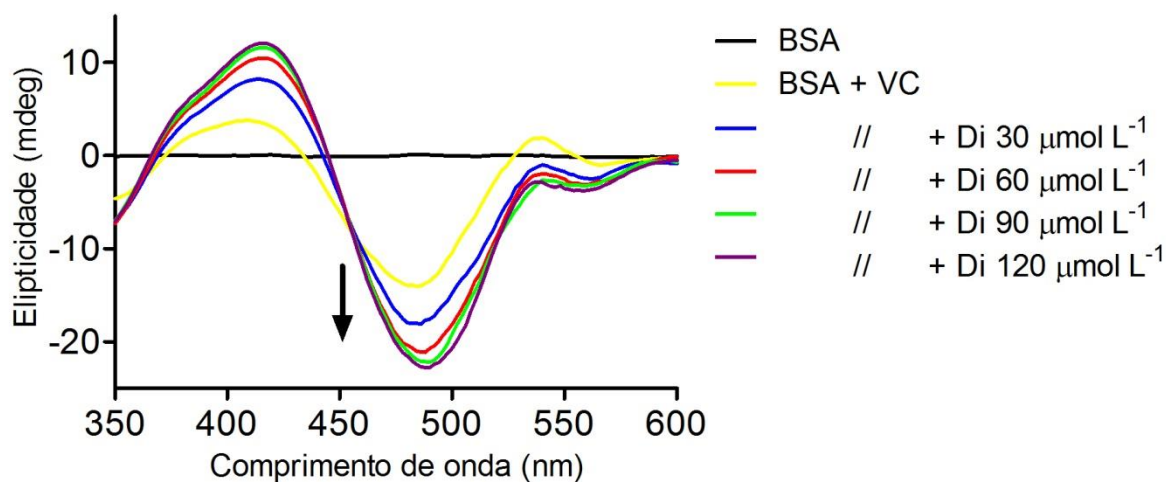


**Figura 25** - Efeito da adição de dansilglicina ( $0-120 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) no espectro de ICD do complexo BSA:VC ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$ .



A Figura 26 ilustra a análise de CD para o complexo BSA:VC acrescentando o ligante digitoxina, que é conhecido como ligante de sítio III (SJÖHOLM, et. al., 1979). A adição do ligante de sítio III provocou alteração semelhante ao sítio I, com o aumento da intensidade do sinal ICD.

**Figura 26** - Efeito da adição de digitoxina ( $0-120 \mu\text{M}$ ) no espectro de ICD do complexo BSA:VC ( $30 \mu\text{M}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$ .



Em resumo, estas drogas não foram capazes de substituir eficientemente o VC da BSA. A explicação mais óbvia para estes efeitos seria a maior afinidade do VC por BSA em comparação com estes ligantes. No entanto, uma comparação entre as constantes de ligação para estes medicamentos não permite esta conclusão, vejamos: VC =  $2,18 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ , fenilbutazona =  $1,3 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$  (MARCIAZEK-JURCZYK, et. al., 2011), a varfarina =  $4,2 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$  (MAES, et. al., 1982), ibuprofeno =  $13 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$  (LI, et. al., 2011), naproxeno =  $3,8 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$  (LAMMERS, et. al., 2013) e dansilglicina =  $3,5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$  (GRACIANI; XI-MENES, 2013), são da mesma ordem de grandeza. Além disso, a incapacidade de remover VC de seu local de ligação em BSA não pode explicar a intensificação do sinal de ICD observado para ligantes de sítio I.

Uma segunda explicação para os resultados observados seria a capacidade do VC em se ligar a mais de um local de ligação da BSA, como demonstrado nos experimentos de deslocamento de sondas fluorescentes. Pode-se supor que a adição de ligantes de sítio I poderia deslocar o VC para o sítio II, e vice-versa. Esta possibilidade também poderia explicar a mudança e intensidade da banda ICD do VC, quando ligantes de sítio I e III foram adicionados ao complexo BSA:VC. Por exemplo, pode-se supor que na presença de ligantes de sítio I, VC poderia ocupar sítio II. Coerente com isso, varfarina e fenilbutazona (sítio I) provocou alterações semelhantes no sinal ICD do VC. Em resumo, na presença de ligantes de sítio I, o espectro ICD deslocado do VC pode representar exclusivamente a sua ligação ao sítio II. Concordante com esta proposta, os três ligantes de sítio II utilizados (ibuprofeno, naproxeno e DG) causaram alterações similares no ICD do VC, mas diferentes dos obtidos por sítio I. Neste caso, o novo sinal ICD pode ser atribuído como um resultado da interação do VC com o sítio I, exclusivamente.

Esta proposta baseia-se no fato de que diferentes sítios de ligação da BSA têm diferentes resíduos de aminoácidos e estruturas tridimensionais, por conseguinte, diferentes conformações de VC podem ser estabilizadas, conduzindo a alterações no sinal de ICD.

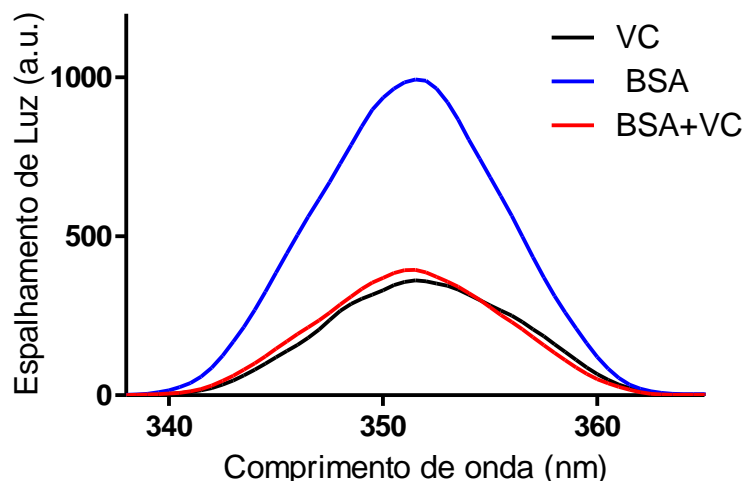
## 5.5 Alteração Estrutural da BSA: Ensaio de Espalhamento de Luz, Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada e Dicroísmo Circular (Far-UV-CD)

### 5.5.1 Espalhamento de Luz Ressonante (RLS)

Quando a luz incide sobre a partícula, ela pode ser desviada, absorvida ou transmitida. Para as partículas que são grandes em comparação com o comprimento de onda de luz emitida, ocorre a reflexão, refração ou difração. Para as partículas menores ou de mesmo tamanho do comprimento de onda incidente, ocorre o espalhamento de luz.

A técnica de espalhamento de luz ressonante (do inglês, “*resonante light scattering*”, RLS) é empregada como uma ferramenta poderosa pois possui alta rapidez, sensibilidade e simplicidade. Tem sido aplicada para determinação de íons inorgânicos, nanopartículas, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros. É uma técnica sensível para detecção de agregados em solução (KHAN, et. al., 2017; MALEKI; MADRAKIAN; AFKHAMI, 2018). O espalhamento de luz em 350 nm é um parâmetro que reflete a extensão da agregação de proteínas. Quando o comprimento de onda do espalhamento luz está localizado na faixa de absorção molecular ou próximo a ela, a frequência da onda eletromagnética absorvida pelo elétron é igual à frequência do espalhamento de luz e a re-dispersão ocorre, causando assim um maior espalhamento de luz ressonante (KHAN, et. al., 2014; PAN, et. al., 2018). Com base nesse fundamento teórico, o próximo passo foi estudar se a ligação do VC à BSA causaria alguma alteração estrutural na proteína. As alterações na dispersão da BSA em 350 nm na ausência, bem como a presença de VC são mostradas na Figura 27.

**Figura 27** - Espectro de emissão da BSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), VC ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e do complexo BSA:VC ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$  com excitação em 350 nm e varredura de emissão em 300-400 nm.



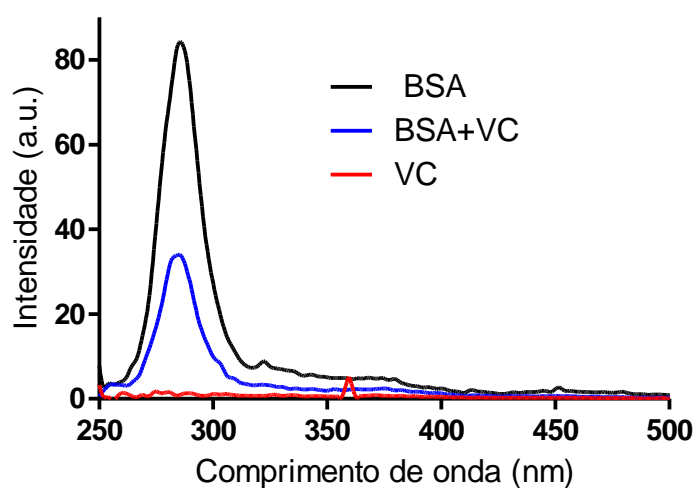
Os resultados mostram que a complexação (BSA:VC), causou apenas um decréscimo no sinal, o que sugere apenas efeito de filtro interno. Em suma, os resultados não indicaram agregação ou qualquer alteração da proteína causada pela complexação com VC.

### 5.5.2 Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada

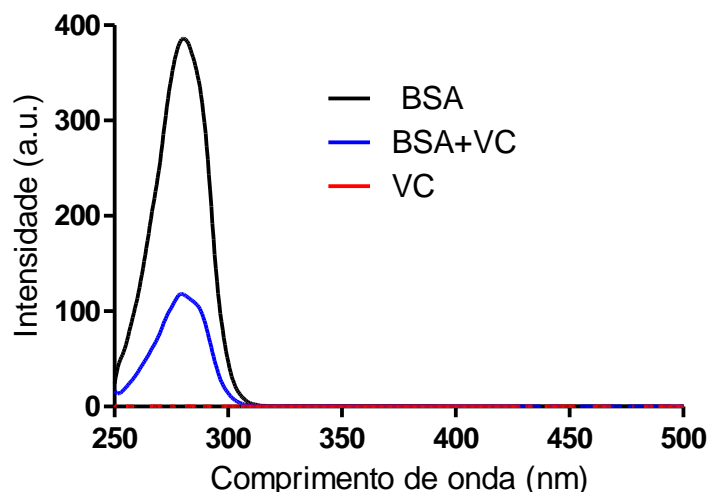
Outra técnica utilizada no estudo de alterações de estrutura de proteínas é a espectroscopia de fluorescência sincronizada. A espectroscopia de fluorescência sincronizada pode fornecer algumas informações sobre a alteração do micro-ambiente molecular. A técnica proporciona informação sobre o ambiente molecular na vizinhança das moléculas cromóforas e tem várias vantagens, tais como a sensibilidade, a simplificação espectral e a redução da largura de banda espectral. Um possível deslocamento do máximo de fluorescência está relacionado à alteração da polaridade em torno do microambiente do cromóforo (LIU, et. al., 2015; JI, et. al., 2015). Quando os valores de  $\Delta\lambda$  são fixados em 15 ou 60 nm, a fluo-

rescência sincronizada fornece a informação característica dos resíduos de tirosina e triptofano na proteína, respectivamente (ZHANG, et. al., 2009). Através da técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada fez-se a varredura simultâneo dos monocromadores de excitação e emissão, com uma diferença de comprimento de onda fixa,  $\Delta\lambda = 15$  e  $60$  nm. Os espectros de fluorescência sincronizado são apresentados nas Figuras 28 e 29.

**Figura 28** - Espectro de fluorescência sincronizada ( $\Delta\lambda = 15$  nm): BSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), VC ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e complexo BSA:VC ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$  com excitação/emissão em 250-500 nm.



**Figura 29** - Espectro de fluorescência sincronizada ( $\Delta\lambda=60$  nm): BSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), VC ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e complexo BSA:VC ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$  com excitação/emissão em 250-500 nm.



Nota-se que a fluorescência dos resíduos de tirosina foi mais fraca e a posição do máximo de emissão de comprimentos de onda não se deslocou quando  $\Delta\lambda$  foi de 15 nm, confirmando que não houve alterações significativas nas proximidades do resíduo de tirosina causada pela complexação. O decréscimo no sinal pode ser atribuído a supressão de fluorescência, como demonstrado anteriormente. O EFS em  $\Delta\lambda$  igual a 60 nm mostrou que a fluorescência dos resíduos de Trp foi bem mais intensa e houve uma maior queda da fluorescência ao adicionar VC. Contudo, o comprimento de onda do máximo de emissão também não foi deslocado. Em outras palavras, não houve indicações de alterações na vizinhança deste fluoróforo devido à presença de VC.

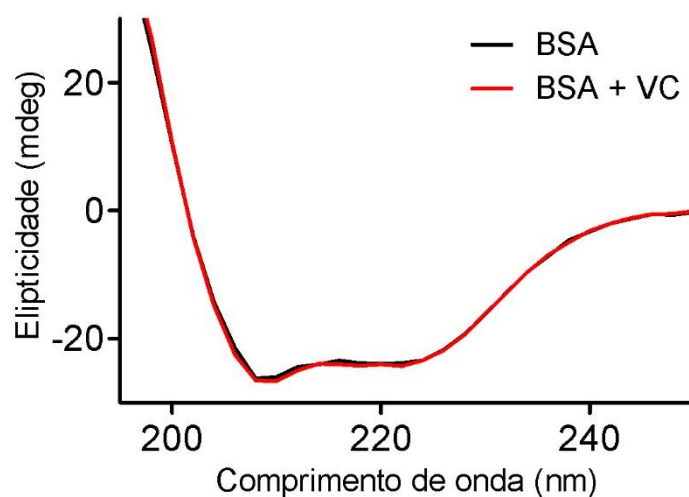
### 5.5.3 Dicroísmo Circular

A espectroscopia de CD é um dos melhores métodos para identificação de alterações na estrutura de proteínas. Nas medidas de CD os cromóforos de interesse são as ligações peptídicas que absorvem abaixo de 240 nm, os resíduos de aminoácidos



aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano que possuem absorção na faixa dos 250 a 290 nm, e as ligações de dissulfeto com fraca absorção, por volta de 260 nm. Deste modo, as bandas de CD para as proteínas ocorrem em duas regiões espectrais. A região do UV distante (180–240 nm) que é dominada pelas contribuições das ligações peptídicas e a região do UV próximo (260–320 nm) que é originada principalmente pelas contribuições dos aminoácidos aromáticos e ligações dissulfeto. As duas regiões espectrais dão informações diferentes à estrutura da proteína, sendo o UV distante relacionado à estrutura secundária e o próximo a terciária (SUN, et. al., 2005; KELLY; PRICE, 2000). A Figura 30 ilustra a análise de CD da BSA pura e após sua complexação com VC.

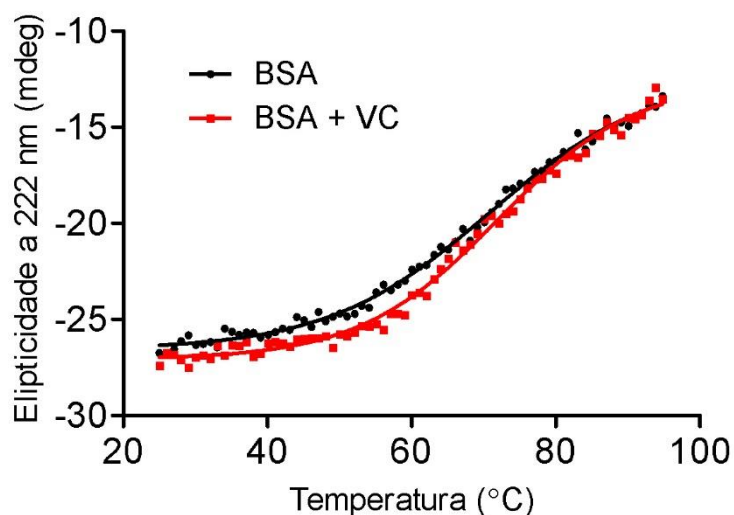
**Figura 30** - Espectro de CD da BSA ( $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e do complexo BSA:VC ( $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$ .



A região analisada que fornece informações de alterações na estrutura secundária da proteína não apresentou nenhuma alteração significativa do espectro. Indicativo de que não houve alteração na estrutura secundária da BSA após a adição do VC (SUN, et. al., 2005; KELLY; PRICE, 2000).

Outra forma de monitorar alterações na estrutura de proteínas por CD é pela análise da curva de desnaturação térmica da proteína. Para isso foi medido o CD em um comprimento de onda fixo 222 nm, variando a temperatura na ausência e na presença de VC (Figura 31). As curvas de desnaturação mostram o aspecto típico sigmoidal para o qual foram obtidas as temperaturas médias de transição de desnaturação ( $T_{50}$ ) (HUANG, et. al., 2015). O ponto de transição ( $T_{50}$ ), representa o ponto médio da temperatura de fusão da proteína, neste caso, está de próximo aos valores relatados na literatura: 72,9 °C (BAIER;MCCLEMENTS;2001). Além disso, a presença do VC não causou alterações significativas no ponto médio da temperatura de transição BSA ( $T_{50} = 71,9 \pm 0,6$  °C) e BSA:VC ( $T_{50} = 70,8 \pm 0,5$  °C). Estes resultados confirmam que a ligação do VC na BSA não alterou a estrutura secundária e a estabilidade térmica da mesma.

**Figura 31** - Curva de desnaturação térmica da BSA ( $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e do complexo BSA:VC ( $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C, a um comprimento de onda fixo de 222 nm.



As medidas de espalhamento de luz, espectroscopia de fluorescência sincronizada e CD confirmam que não houve alteração da estrutura da BSA após a complexação com o VC.

## 5.6 Efeito da Oxidação da BSA na Elipticidade Induzida em Vermelho Congo

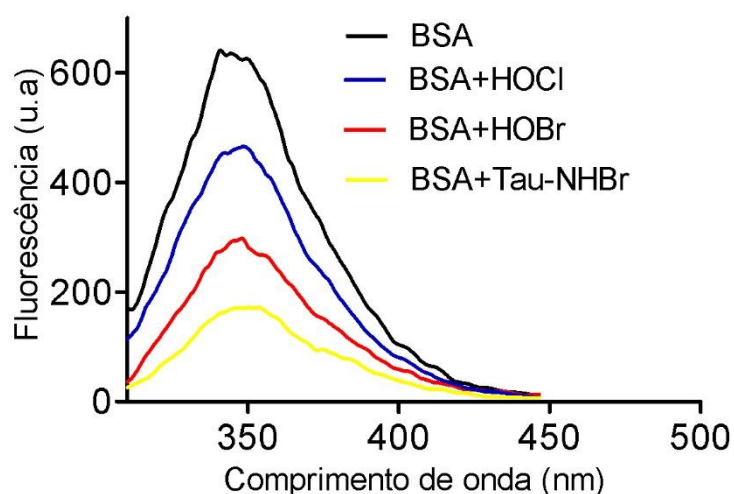
A capacidade de ligação da albumina pode ser alterada pela sua oxidação. Uma consequência da interação de agentes oxidantes com proteínas pode ser a oxidação de resíduos de aminoácidos, formação de ligações cruzadas e agregados protéicos, os quais alteram a estrutura secundária e terciária das proteínas. Esta é uma questão importante em relação à sua eficácia como um transportador de drogas em pacientes que sofrem de doenças crônicas, onde o estresse oxidativo é um componente fisiopatológico. Por exemplo, uma publicação recente mostrou uma relação entre o aumento das frações do plasma sanguíneo da albumina oxidada e a diminuição da capacidade de ligação para dansilsarcosine, um ligante de sítio II (MACIAZEK-JURCZYK, et. al., 2011; OETTL, et. al., 2013).

Por este motivo, estudamos se a oxidação prévia da BSA poderia alterar o sinal de ICD do VC. Em outras palavras, estudou-se a potencialidade do sinal de ICD do VC como parâmetro analítico para detecção de alterações provocadas por oxidação. Para isso a proteína foi oxidada utilizando ácido hipobromoso (HOBr), ácido hipocloroso (HOCl) e taurina-bromamina (Tau-NHBr). Estes agentes oxidantes são capazes de promover a oxidação da cisteína, metionina, tirosina e resíduos de triptofano nas proteínas, provocando alterações nas suas propriedades biofísicas, incluindo a capacidade de ligação. Ao final da reação, o excesso de oxidantes foi neutralizado pela adição de metionina, para evitar a oxidação do VC (OETTL, et. al., 2013; MACIAZEK-JURCZYK, et. al., 2011; PETRONIO; XIMENES, 2013).

A Figura 32 apresenta o espectro de emissão da proteína nativa e na presença dos agentes oxidantes (HOBr, HOCl e Tau-NHBr). Pode ser visto pela queda da intensidade de fluorescência da BSA que a proteína foi eficazmente oxidada usando um excesso de dez vezes mais de oxidante. Nota-se que a queda de fluorescência foi bem maior em Tau-NHBr,

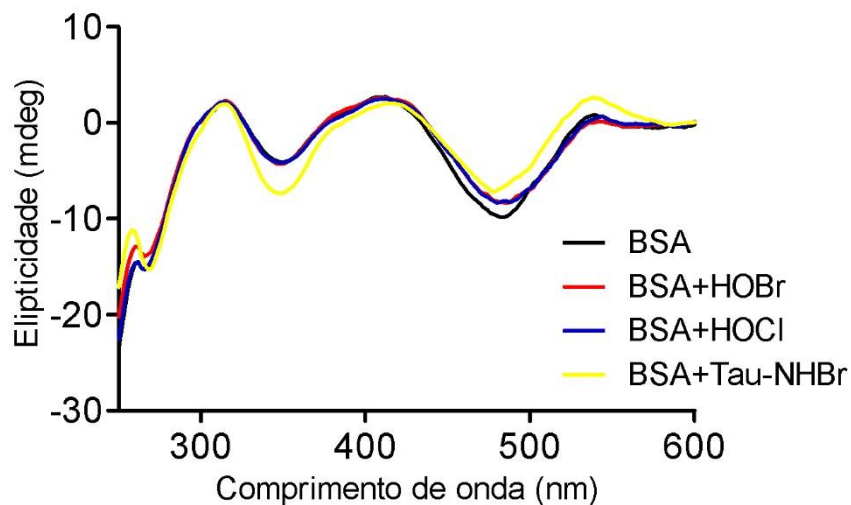
confirmando assim sua maior eficiência na oxidação da proteína, seguida por HOBr e HOCl, que também oxidaram a proteína (PETRONIO; XIMENES, 2013).

**Figura 32** – Espectro de fluorescência com excitação em 295 nm do complexo BSA:VC ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na ausência e na presença dos oxidantes HOBr, HOCl e Tau-NHBr, ambos ( $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Experimentos realizados em tampão fosfato,  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$ .

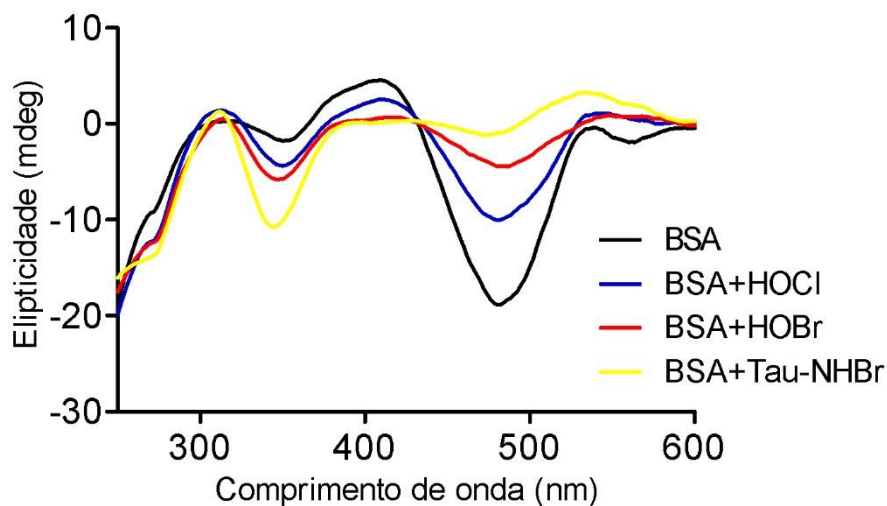


A Figura 33 apresenta as alterações nos espectros de ICD onde a adição de um excesso de dez vezes dos oxidantes não alteraram significativamente os mesmos. Ao aumentar a quantidade de oxidantes para o excesso de trinta vezes, uma perda significativa no sinal de ICD foi obtida (Figura 34). Pode também ser observado que a Tau-NHBr foi um oxidante mais eficaz devido à sua seletividade em relação aos resíduos de triptofanos nas proteínas (XIMENES, et. al., 2010).

**Figura 33** - Espectro de ICD do complexo BSA:VC ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na ausência e na presença dos oxidantes HOBr, HOCl e Tau-NHBr, ambos ( $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Experimentos realizados em tampão fosfato,  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$ .



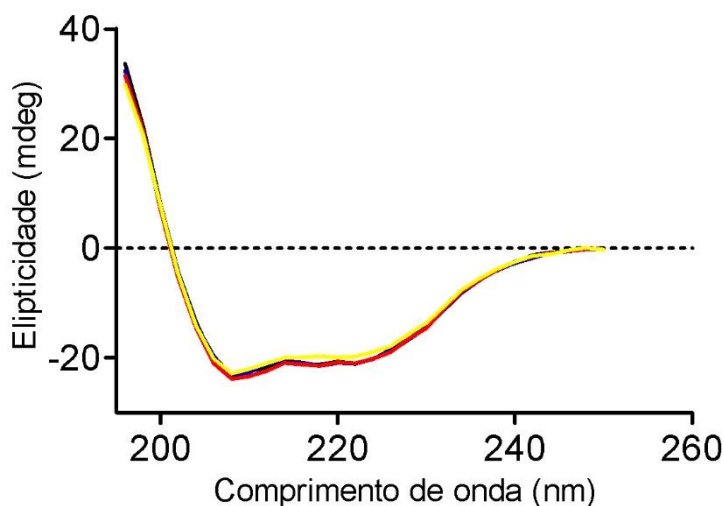
**Figura 34** - Espectro de ICD do complexo BSA:VC ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na ausência e na presença dos oxidantes HOBr, HOCl e Tau-NHBr, ambos ( $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Experimentos realizados em tampão fosfato,  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$ .



Estes resultados são indicativos da perda da capacidade de ligação da BSA ao VC, quando submetida a uma degradação oxidativa grave. Finalmente, é também interessante

notar que a estrutura secundária de BSA não foi afetada por esta oxidação intensa (Figura 35).

**Figura 35** - Espectro de CD do complexo BSA:VC ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na ausência e na presença dos oxidantes HOBr, HOCl e Tau-NHBr, ambos ( $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Experimentos realizados em tampão fosfato,  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$ .

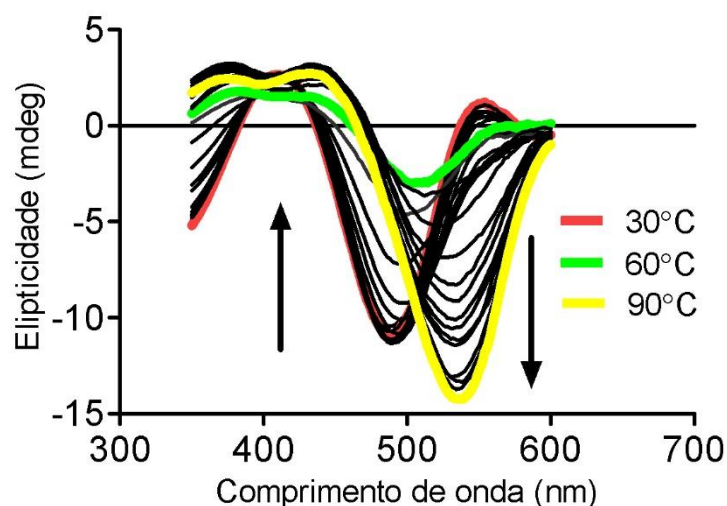


### 5.7 Efeito da Temperatura na Elipticidade Induzida em Vermelho Congo

A associação entre as proteínas e os seus ligantes são geralmente enfraquecidas em temperaturas mais elevadas, o que é um indicador da formação do complexo no estado fundamental entre a proteína e o ligante (LAKOWICZ, 2010). A dissociação do complexo também pode ser monitorada por ICD, isto é, a banda ICD pode ser totalmente ou parcialmente perdida quando o complexo proteína-ligante é aquecido (GRACIANI; XIMENES, 2013). Com base neste conhecimento experimental e teórico, o efeito da temperatura na ligação entre o VC e BSA também foi estudado. Nestes experimentos, a temperatura foi aumentada na faixa de  $30\text{-}90^\circ\text{C}$  com uma velocidade de aquecimento de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . As medidas de ICD foram realizadas a cada intervalo de  $2^\circ\text{C}$  mantendo equilibrado em cada ponto durante 30 s antes de serem obtidas.

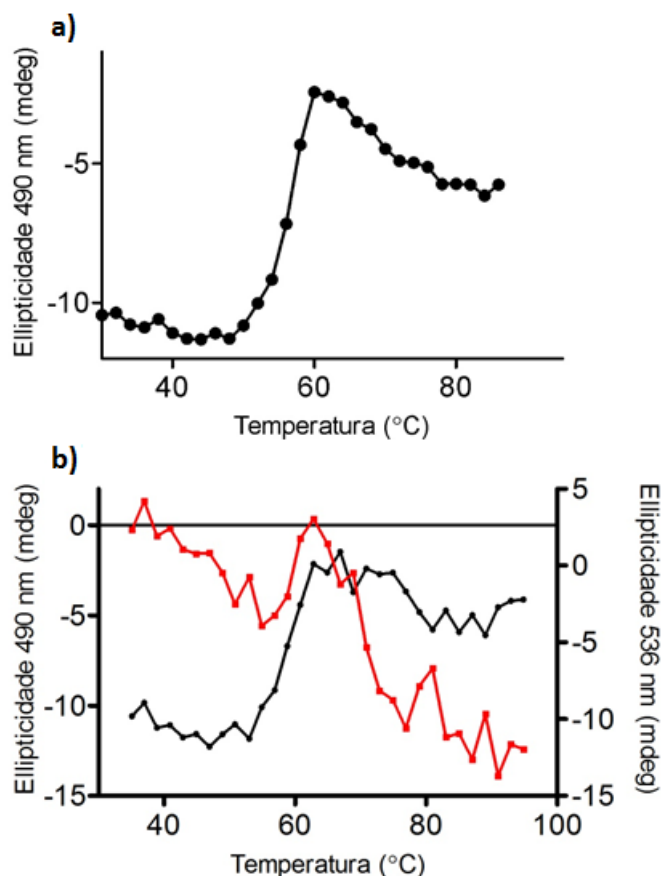
Os resultados mostram que, em vez de uma redução, o que indicaria a dissociação do vermelho do Congo de BSA, o espectro ICD foi deslocado para um comprimento de onda maior quando a temperatura foi aumentada (Figura 36). Especificamente, depois da diminuição da banda centrada a 490 nm, uma nova banda com um máximo a 536 nm foi progressivamente formada.

**Figura 36** - Espectro de ICD UV próximo para o complexo BSA:VC ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em diferentes temperaturas (30-90 °C). Experimentos realizados em tampão fosfato,  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.



Considerando a formação de uma nova banda a 536 nm, novos experimentos foram realizados por monitoração do sinal de ICD a 490 e 536 nm (Figuras 37a e b). Ao fixar o comprimento de onda em 490 nm, uma curva sigmoidal foi obtida para as alterações no sinal de ICD do VC dependente da temperatura (Figura 37a). Uma curva sigmoidal é característica de alterações cooperativas, incluindo transição de fase em proteínas induzidas por calor, agentes de desnaturação, etc (NAGARAJAN, et. al., 2015). Como pode ser observado, é possível ver a transição na estrutura da proteína entre 60 °C e 70 °C. O ponto médio da curva a 490 nm foi de 58 °C e coincidente com a diminuição acentuada de ICD a 536 nm (Figura 37b).

**Figura 37** - Efeito da temperatura no espectro de ICD para complexo BSA:VC ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Experimentos realizados em tampão fosfato,  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, variando a temperatura de 30 a  $90^\circ\text{C}$ . a) Mudança do espectro de ICD a 490. b) Medidas simultâneas de ICD a 490 e 536 nm.



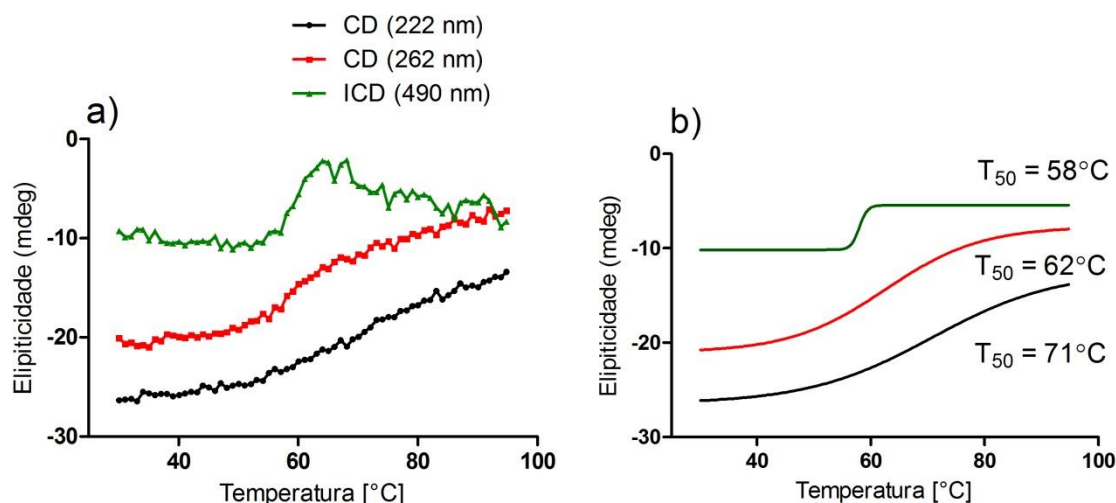
A alteração, mas não a perda do sinal de ICD do VC quando a temperatura foi aumentada é um indicativo da forte associação entre o VC e BSA. Além disso, esses resultados mostram que o sinal de ICD em VC pode ser útil para a monitoração de transição de fase na proteína. A partir destes resultados, a próxima pergunta a ser respondida foi se o VC poderia ter alguma influência sobre a alteração estrutural do BSA induzida pela temperatura. Os resultados apresentados nas Figuras 30 e 31 confirmaram que a presença de VC não alterou a estrutura secundária e a estabilidade térmica de BSA. Contudo, a comparação entre a desnaturação térmica induzida pela BSA monitorada a 222 nm (Figura 31) com indução térmica da mudança de ICD (Figura 37) mostram que o ponto médio das curvas não foram equivalentes. Assim, novos experimentos foram realizados por



monitoração das alterações no sinal de CD da BSA dependente da temperatura: a 262 nm, o que é devido à presença de resíduos de cisteína e aromáticos e, geralmente, relacionada com a estrutura terciária da proteína, a 222 nm, um parâmetro da estrutura secundária, e a 490 nm ponto máximo da banda de ICD do VC (SUN, et. al., 2005).

Os resultados apresentados na figura 38 mostram uma comparação das três curvas e respectivo *fit* não-linear, utilizando a equação sigmoidal de Boltzmann (GraphPad software Prisma 5.0). Como observado, o ponto médio para a alteração de ICD em 490 nm ( $T_{50} = 58^{\circ}\text{C}$ ) foi mais perto do valor obtido em 262 nm ( $T_{50} = 62^{\circ}\text{C}$ ). Estes resultados são indicativos de que a mudança de ICD por indução do VC está essencialmente relacionada com alterações na estrutura terciária da proteína.

**Figura 38** - Comparação da alteração induzida por temperatura na BSA seguida de alterações secundárias (222 nm), terciárias (262 nm) e ICD (490 nm). (a) As misturas consistiram em BSA  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ , vermelho Congo  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Para a medida a 222 nm, as soluções foram diluídas para  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (b) Adaptação sigmoidal Boltzmann para determinação do ponto médio das curvas (software GraphPad Prisma 5,0).



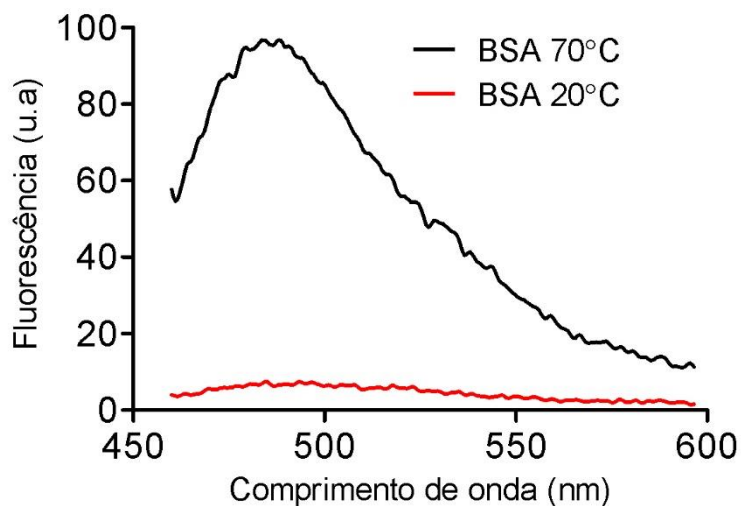
## **5.8 Caracterização de Agregados Amilóides por Dicroísmo Circular Induzido em Vermelho Congo**

Os ensaios anteriores revelaram que o VC é capaz de se ligar em BSA nas formas nativa ou termicamente alterada e que o seu espectro ICD pode ser usado para monitorar esta mudança estrutural. Estas descobertas levantaram a possibilidade de que a formação da forma amilóide da BSA poderia estar envolvida nesta alteração estrutural.

Sabe-se que tratamento térmico é um protocolo experimental muito usado para a produção de proteínas amiloidais e o VC é um corante clássico usado na caracterização estrutural dessas fibras amiloidais (MOVAGHATI, et. al., 2014). Para avaliar esta possibilidade, a BSA foi induzida a sua forma amilóide por incubação durante 2,5 horas a 70 °C, e a formação da estrutura amilóide foi caracterizada utilizando diferentes tipos de técnicas (HOLM, et. al., 2007). Vale à pena notar que, nesses experimentos, o VC não estava presente durante o tratamento térmico, mas adicionado posteriormente.

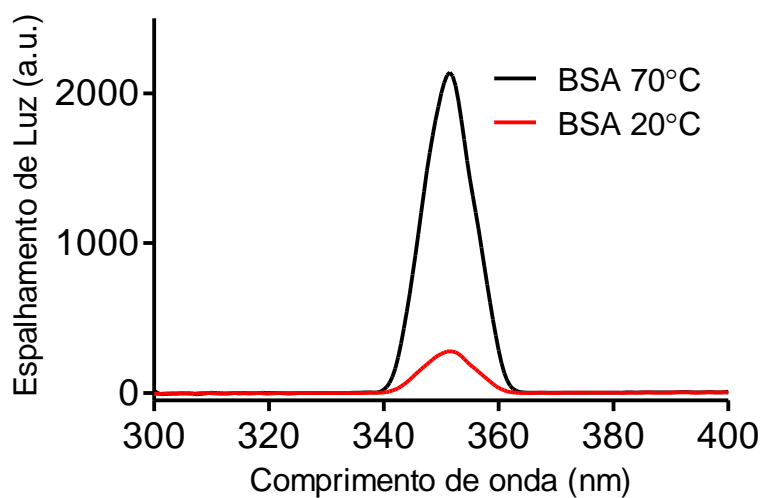
A Th-T, é uma sonda fluorescente bastante utilizada como método de detecção de fibras amiloidais em solução e de fácil utilização. Baseia-se no aumento do rendimento quântico da sonda a 482 nm causada por sua fixação nas fibrilas amilóides (FREIRE, et. al. 2015; AMDURSKY, et. al., 2012). A Figura 39 apresenta os resultados utilizando a sonda Th-T para detecção das fibras amiloidais. Nota-se que somente a BSA sem aquecimento não apresentou um sinal significativo, no entanto, ao aquecer a proteína há um aumento considerável do sinal de fluorescência, com máximo de emissão em aproximadamente 482 nm.

**Figura 39** - Efeito da temperatura no espectro de emissão da BSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de Th-T ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com excitação em 435 nm, em pH 7,0.



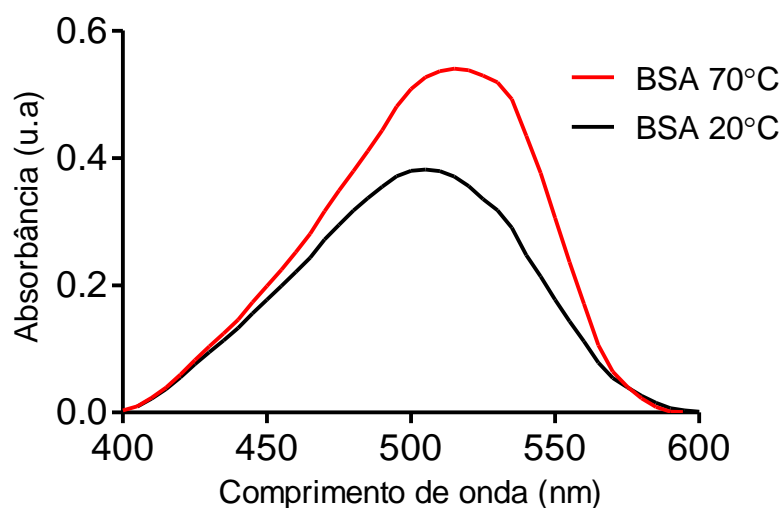
No mesmo sentido, a agregação da proteína provoca um aumento na dispersão de luz que pode ser observada por espalhamento Rayleigh (Figura 40).

**Figura 40** - Efeito da temperatura no espectro de dispersão de Rayleigh da BSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) a 20 e 70°C, em pH 7,0.



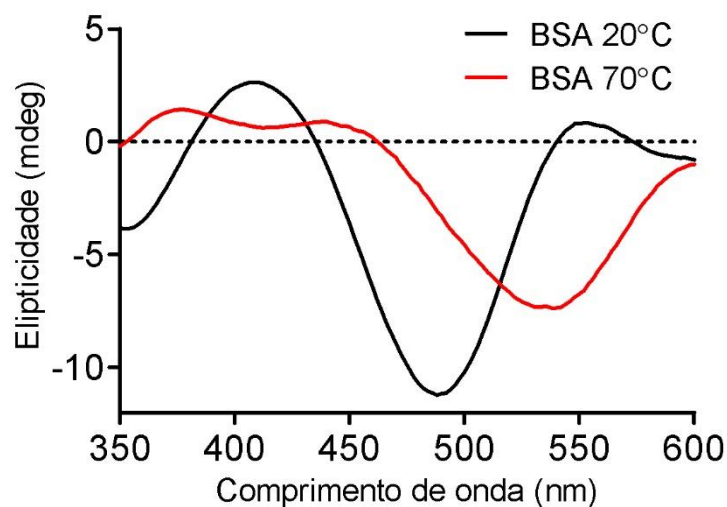
Fibrilas amilóides também podem ser caracterizadas por um aumento e um desvio para o vermelho na absorbância do vermelho do Congo (DOBSON, 1999; DUTTA, et. al., 2016). A Figura 41 apresenta os resultados para os testes feito com VC. Nota-se que a BSA sem aquecimento com a sonda gera um máximo em 500 nm. Já para a BSA aquecida observa-se um sinal mais intenso e um ligeiro deslocamento do máximo de absorbância para 510 nm, um indicativo da agregação da proteína.

**Figura 41** - Efeito da temperatura no espectro de UV-vis do complexo BSA: VC ( $30 \mu \text{ mol L}^{-1}$ ) em pH 7,0.



E finalmente, as fibrilas amilídes foram detectadas pela alteração no sinal de ICD do VC, ou seja, a técnica aqui desenvolvida (Figura 42). A proteína aquecida apresentou um deslocamento para um maior comprimento de onda do sinal de ICD do VC, indicando assim a agregação da proteína. Em conjunto, estes resultados confirmam que a BSA foi induzida a sua forma de amilóide quando incubada a  $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e que o espectro de ICD do VC pode ser uma nova abordagem analítica para caracterizar esta transformação.

**Figura 42** - Efeito da temperatura no espectro de ICD do VC na concentração final de ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), em pH 7,0.



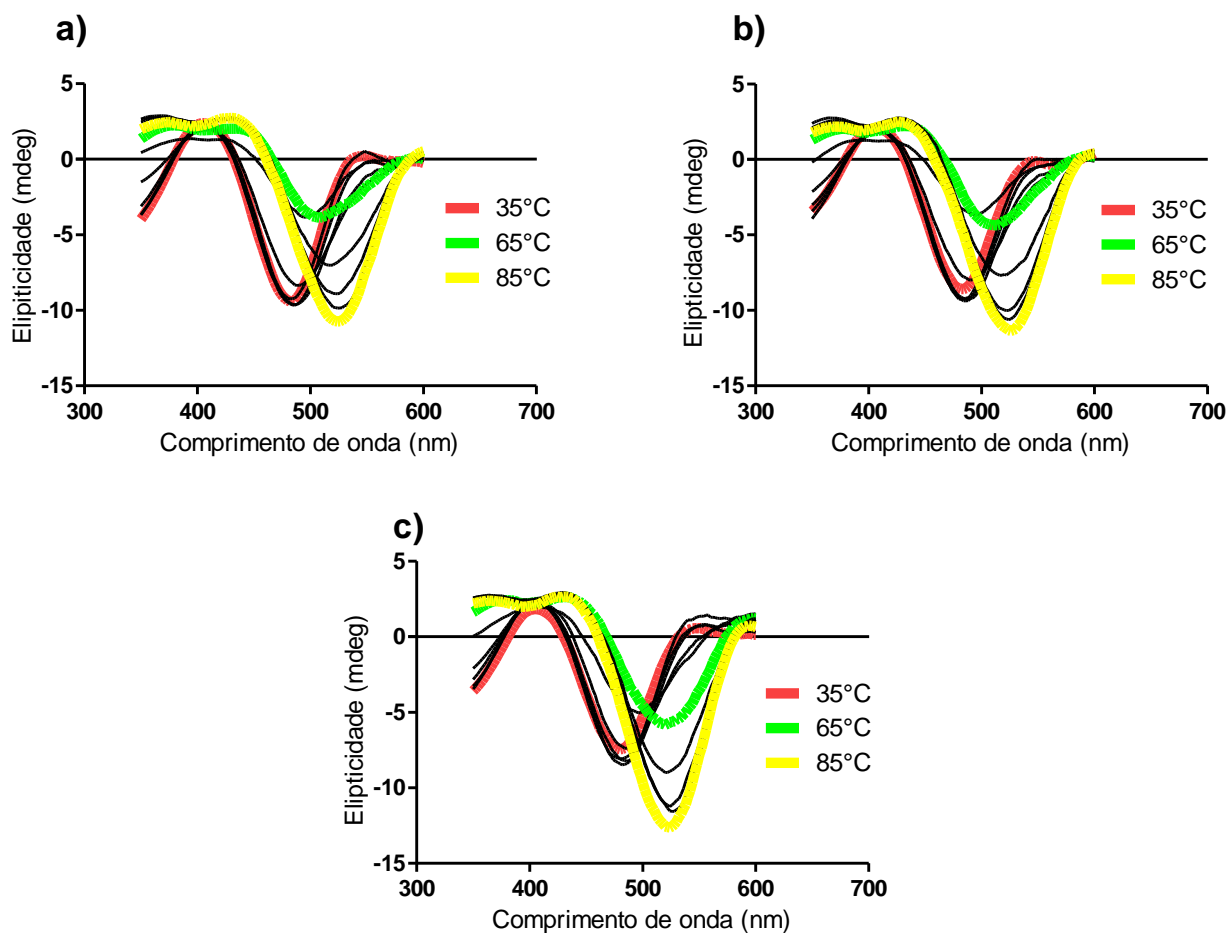
### 5.9 Efeito de Metais Pesados na Elipticidade Induzida em Vermelho Congo

Metais desempenham várias funções importantes nos processos biológicos de sistemas vivos, tais como a transmissão nervosa, a síntese e metabolismo de neurotransmissores e de transporte de oxigênio (JOMOVA; VALKO, 2011; CRICHTON, et. al., 2008). No entanto, quando ocorre acumulação excessiva tornam-se tóxicos (KOZLOWSKI, et. al., 2009). Em particular, o efeito de metais sobre a agregação em proteínas tem atraído grande atenção e são amplamente estudados (LU, et. al., 2015). Por exemplo, mudanças no controle homeostático de íons metálicos em regiões específicas do cérebro, conduz à geração de espécies reativas de oxigênio, o que danifica diretamente a proteína e cria um ambiente que pode resultar em agregação, acelerando, assim, condições degenerativas (CRICHTON; DEXTER; WARD, 2008; ZHANG; ROCHET; STANCIU, 2015). Tem sido proposto que estes íons desempenham um papel central no processo de agregação amiloide (HUREAU; DORLET, 2012). Estudos sugerem que metais como zinco, ferro e cobre podem contribuir para patogênese de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e a doença de Parkinson,

facilitando a formação de depósitos de amiloide e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em estresse oxidativo, neurotoxicidade e enfraquecimento cognitivo (LU, et. al., 2015; NAKAMURA, et. al., 2007; JOMOVA; VALKO, 2011). Com base neste conhecimento teórico, o efeito de metais na alteração de sinal de ICD do VC provocado pela temperatura também foi estudado. O objetivo foi avaliar se a alteração de ICD poderia ser útil para avaliar o papel dos íons metálicos na formação de agregados amilóides.

Nestes experimentos a temperatura foi aumentada na faixa de 30-90 °C com uma velocidade de aquecimento de 1 °C/min na presença de magnésio e zinco. As medidas de ICD foram realizadas a cada intervalo de 2 °C mantendo equilibrado em cada ponto durante 30 s antes de serem adquiridas. Os resultados mostram que não houve alteração significativa no sinal de ICD do VC em função da temperatura na presença desses metais. Como já observado nos experimentos anteriores houve a diminuição da banda centrada a 490 nm, uma nova banda com um máximo a 536 nm foi formada, mas não uma alteração na velocidade de formação que pudesse sugerir algum efeito dos metais.

**Figura 43** - Espectro de ICD UV próximo para o complexo BSA:VC ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em diferentes temperaturas (35-85 °C), na ausência e na presença de metais: a) Complexo BSA:VC; b) Sulfato de Magnésio ( $2,5 \times 10^3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); c) Cloreto de Zinco II ( $2,5 \times 10^3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Experimentos realizados em tampão fosfato,  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

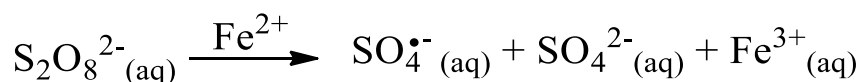


## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO: Estudos e aplicação do divanilato de metila

### 6.1 Síntese e Caracterização do Divanilato de Metila

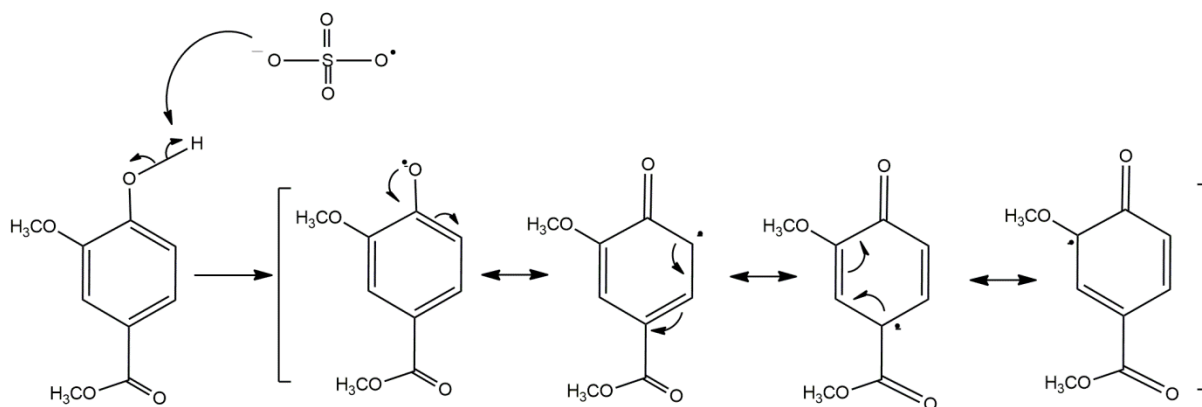
O DV foi sintetizado a partir do vanilato de metila através de uma reação de dimerização oxidativa na presença de sulfato ferroso (catalisador) e persulfato de potássio como descrito na literatura (ISMAIL, et. al., 2014; MARIN, et. al.; 2017). A primeira etapa reacional consistiu na ativação do persulfato pelo catalisador, o íon ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) para formação do ânion radical sulfato (Figura 44):

**Figura 44** - Ativação do persulfato de potássio pelo  $\text{Fe}^{+2}$  com formação do radical sulfato ( $\text{SO}_4^{\cdot-}$ ).



A reação é iniciada pelo ataque do ânion radical sulfato ao hidrogênio do grupo hidroxila (OH) no vanilato, levando a quebra da ligação e a formação de um radical fenoxila.

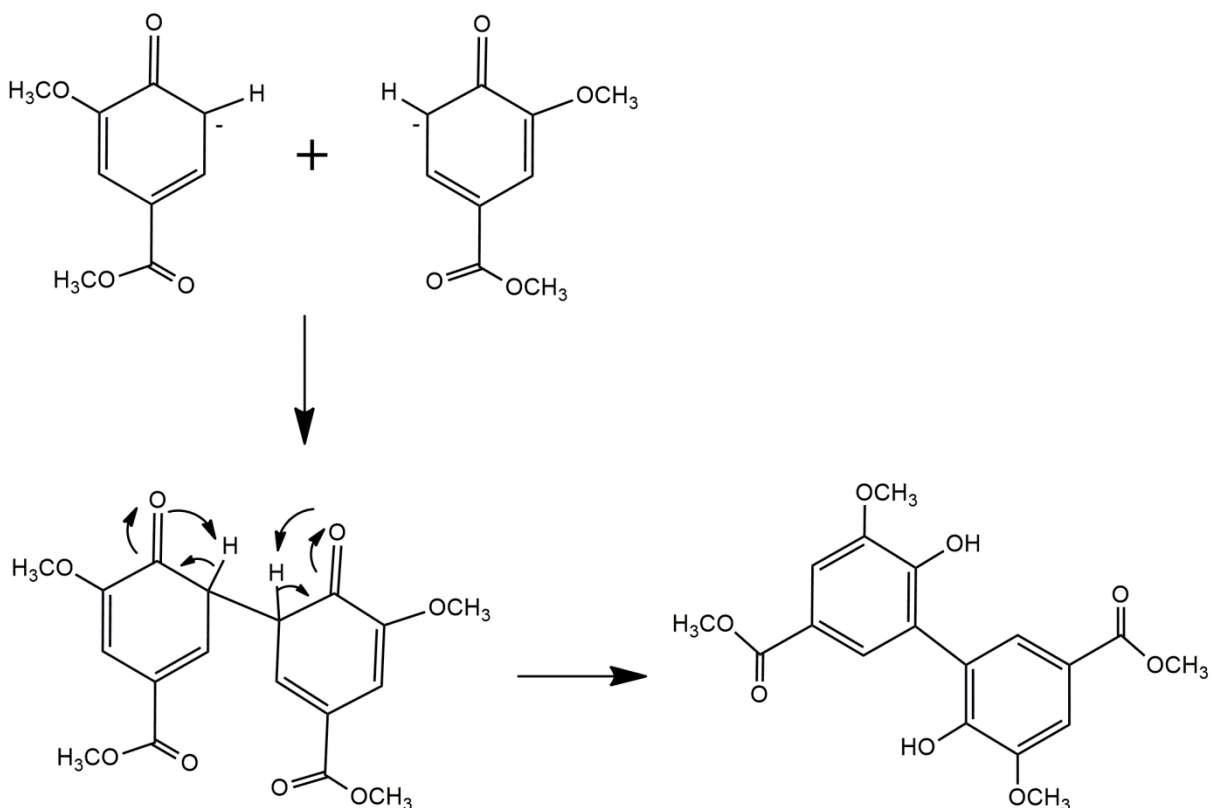
**Figura 45** - Ataque do radical sulfato ao grupo hidroxila do vanilato com formação do radical fenoxila.





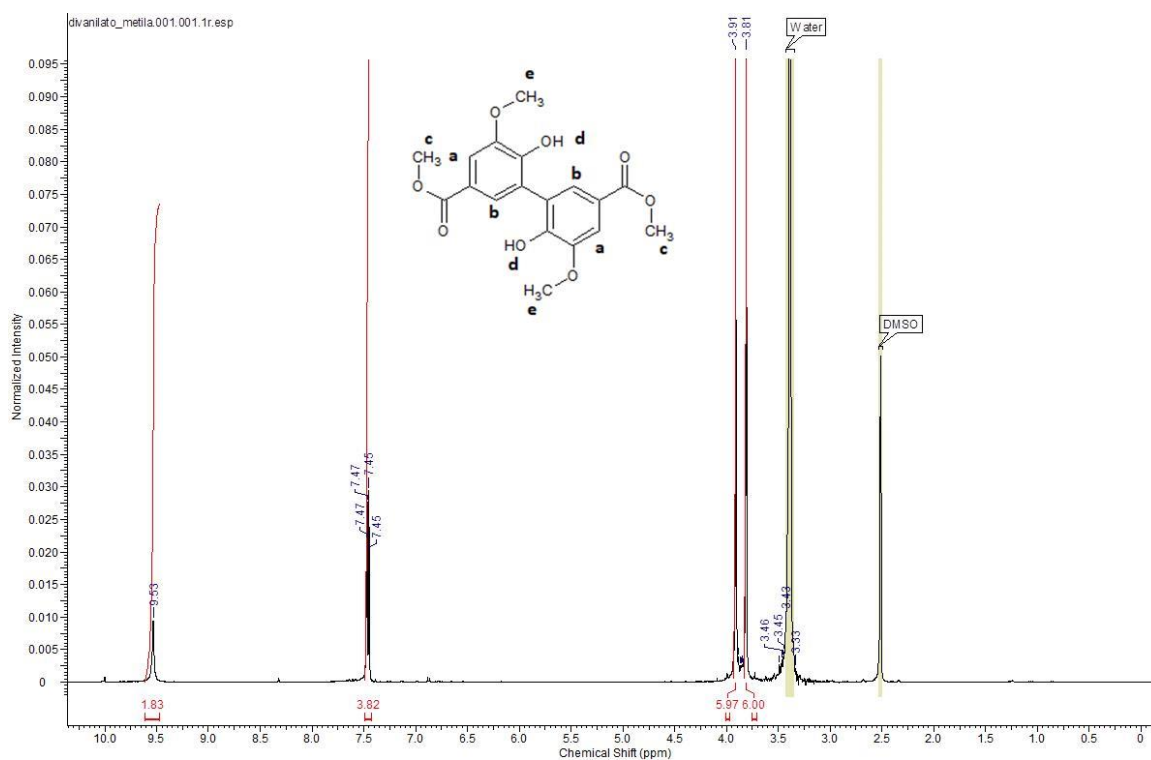
Devido a presença do grupo carboxilato na posição “*para*” o acoplamento entre os radicais fenoxilas ocorre principalmente em posições *orto* em relação à hidroxila. A molécula de DV é formada após o dímero estabelecer um equilíbrio ceto-enólico (Figura 46).

**Figura 46** – Formação da molécula de divanilato.



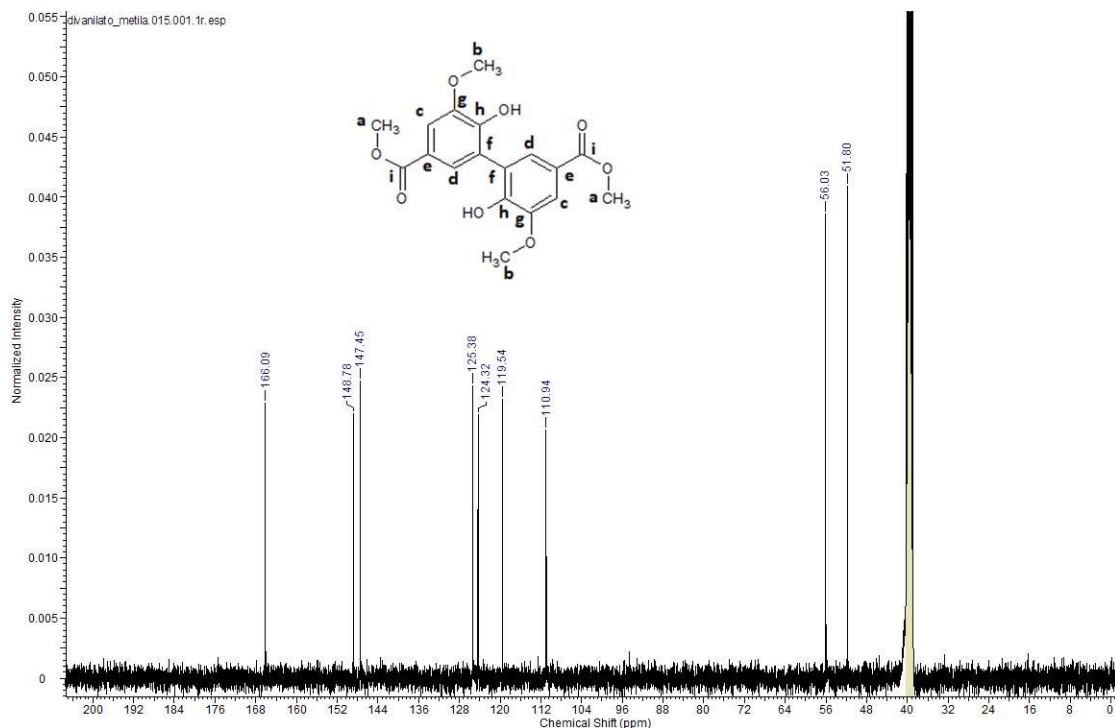
A reação de oxidação ocorreu instantaneamente e gerou um precipitado marrom, que foi filtrado e lavado diversas vezes com água quente e seco em forno a 62°C por 48 horas e então seco em dessecador à vácuo sobre pentóxido de fósforo. Obteve-se um pó de cor marrom claro com rendimento de 71,6%. A caracterização do DV foi realizada por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A Figura 47 apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para a amostra preparada  $\delta$  (ppm): 9.53 (d, 2OH), 7.47 (a, 2CH-Ar,  $J=2.0$  Hz), 7.44 (b, 2CH-Ar,  $J=2.0$  Hz), 3.91 (c, 2 OCH<sub>3</sub>), 3.81 (e, 2 OCH<sub>3</sub>).

Figura 47 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o divanilato  $\delta$  (ppm).



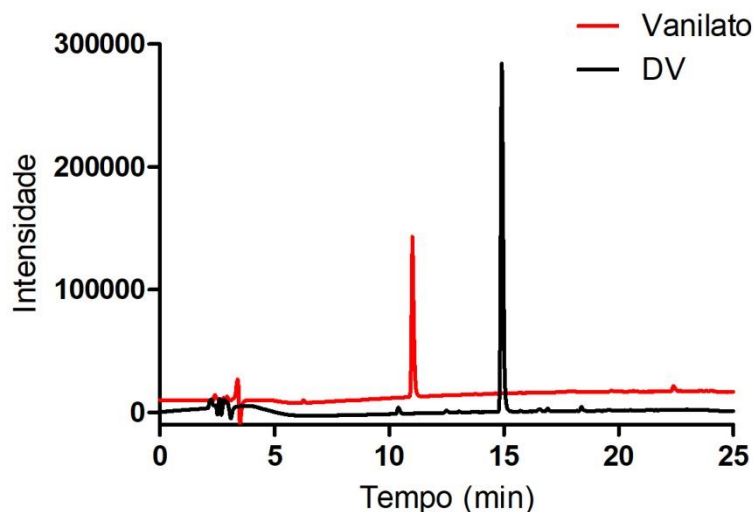
A Figura 48 apresenta o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para a amostra preparada  $\delta$  (ppm): 166.1 (i, 2C=O), 148.8 (h, 2C), 147.4 (g, 2C), 125.4 (f, 2CH), 124.3 (e, 2C), 119.5 (d, 2C), 110.9 (c, 2CH), 56.0 (b, 2OCH<sub>3</sub>), 51.8 (a, 2OCH<sub>3</sub>).

Figura 48 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o divanilato  $\delta$  (ppm).



Os espectros de RMN permitiram confirmar o êxito na preparação do DV. Todos os dados analíticos estão de acordo com aqueles apresentados na literatura (ABRAHAM et al., 2010). A análise de pureza do DV foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para isso foi empregada uma matriz estacionária hidrofóbica (C18) e dois eluentes como solventes, solvente A: 0,1% de ácido fórmico em água e, solvente B: 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila, vazão de 1 mL/ min e gradiente de 80-20%. A Figura 49 mostra o perfil cromatográfico para o vanilato e DV. Como pode ser observado o tempo de retenção para o vanilato foi de 11 minutos e para o DV foi de aproximadamente 15 minutos.

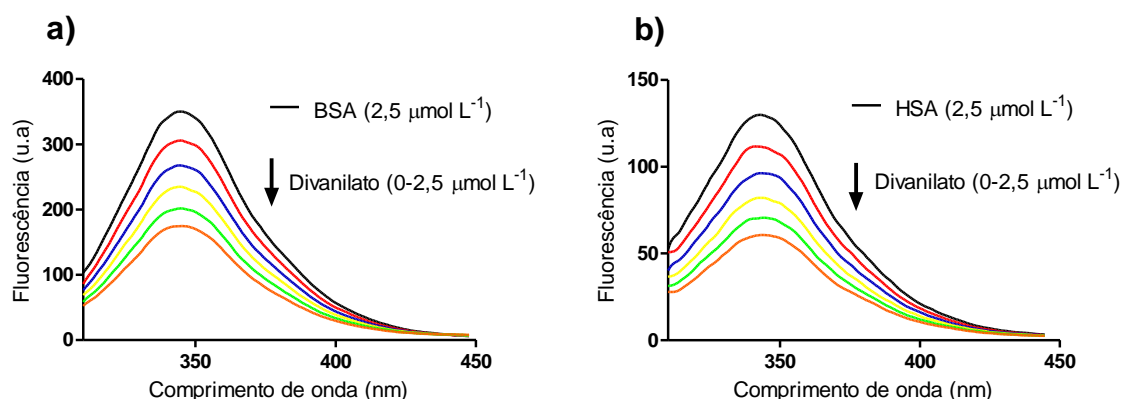
**Figura 49** - Cromatograma: Vanilato ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), DV controle ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), DV sintetizado ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Condições: Coluna de fase reversa C18, fluxo de  $5 \text{ mL/ min}$ , solvente A (solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%) e solvente B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), gradiente para solvente A (80% a 20%) em 20 min, monitorado em 230 a 600 nm.



## 6.2 Determinação das Constantes de Ligação entre o Divanilato de Metila e as proteínas BSA e HSA

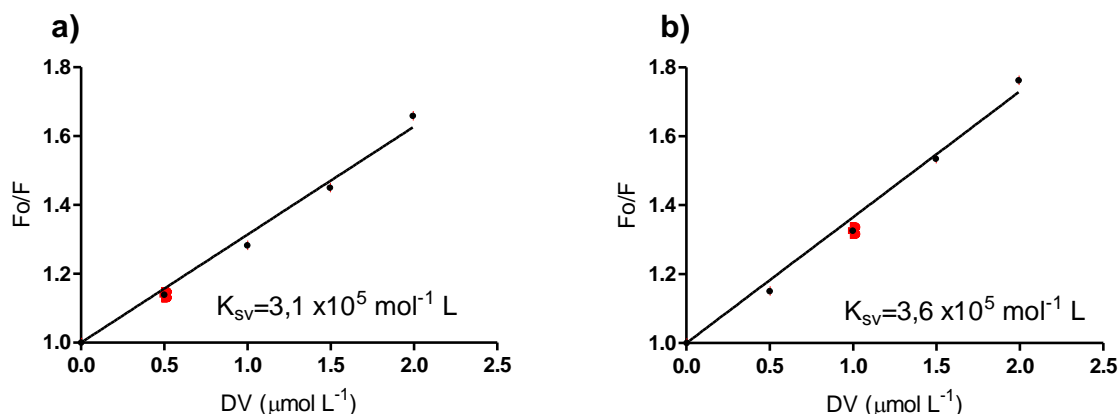
A interação entre o DV e as proteínas foi estudada pelo método de supressão de fluorescência. A Figura 50 apresenta o espectro de emissão de Fluorescência para BSA e HSA, respectivamente. O espectro inicial (em preto) é referente a emissão de fluorescência da proteína nativa, na ausência de agente supressor. BSA possui uma intensidade máxima de fluorescência em 344 nm, três vezes maior que HSA, que possui intensidade máxima de fluorescência em 342 nm, quando o comprimento de onda de excitação é de 295 nm. Os resultados apresentados na Figura 50 mostram que as intensidades de fluorescência das proteínas HSA e BSA foram suprimidas pela adição do DV. Como destacado no capítulo anterior, esta diminuição na intensidade de fluorescência pode ser causada por desativação colisional ou formação de um complexo não fluorescente, entre outros mecanismos.

**Figura 50** - Espectro de emissão: a) BSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e b) HSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DV ( $0-2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $20^\circ\text{C}$ , com excitação em 295 nm e emissão de 310 a 450nm.



Considerando que a interação do DV resultou na supressão da fluorescência intrínseca tanto da HSA como da BSA e a supressão de fluorescência pode ser causada por diversos mecanismos, fez-se necessário determinar por qual mecanismo esse processo ocorreu. Para analisar o mecanismo de supressão de fluorescência a equação de Stern-Volmer (Eq. 1) foi utilizada. Para este estudo torna-se indispensável que as intensidades de fluorescência sejam corrigidas através de correções matemáticas utilizando a Equação 4, de modo a minimizar o efeito de filtro interno (EFI) causado pela atenuação dos sinais de excitação e emissão provocadas pela absorção do composto. Assim, aplicando o tratamento matemático de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência com os valores corrigidos, verificou-se que o gráfico de  $F_0/F$  em função da concentração de DV, apresentou perfil linear para ambas as proteínas (Figura 51).

**Figura 51** - Gráfico de Stern-Volmer: a) BSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e b) HSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DV ( $0-2 \mu\text{M}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, com excitação em 295 nm e emissão de 310 a 450 nm, a  $20^\circ\text{C}$ .



A partir da regressão linear da equação de Stern-Volmer (Eq. 1) foram obtidos os valores das constantes de supressão de Stern-Volmer e a constante de supressão bimolecular ( $k_q$ ) (Tabela 2). Utilizando  $\tau_0$  ( $10^{-8}$  s) que é o tempo de vida da proteína em estado excitado (SHAHABADI, et. al., 2015) (Eq. 7). (ZHU, et. al., 2018; SOARES, 2005). Como descrito no capítulo precedente, constantes de velocidade para processos bimolecular controlado por difusão tem valor máximo de cerca de  $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (SHAHABADI, et. al., 2015). Como o valor calculado para  $k_q$  para ambas as proteínas foram muito acima do limite aceito para ocorrência de processos de difusão, conclui-se que a supressão na fluorescência foi causada pela complexação entre proteína e supressor, ou seja, ocorreu um mecanismo de supressão estático (*quenching* estático).

**Tabela 2** - Constantes de Stern-Volmer ( $k_{sv}$ ) e constante bimolecular de quenching ( $k_q$ ) para interação entre DV e proteínas, em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, a  $20^\circ\text{C}$

Proteína	$k_{sv} (10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L})$	$K_q (10^{13} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$
BSA	3,1 ( $\pm 0.1$ )	3,1 ( $\pm 0.1$ )
HSA	3,6 ( $\pm 0.1$ )	3,6 ( $\pm 0.1$ )

Uma vez definido que o processo de fluorescência era provocado pela complexação entre a proteína e o DV, puderam-se utilizar os dados de supressão para o cálculo da constante de ligação. Utilizando os dados de supressão de fluorescência e a equação matemática derivada da expressão de constante de equilíbrio entre as proteínas e o ligante (Eq. 8):

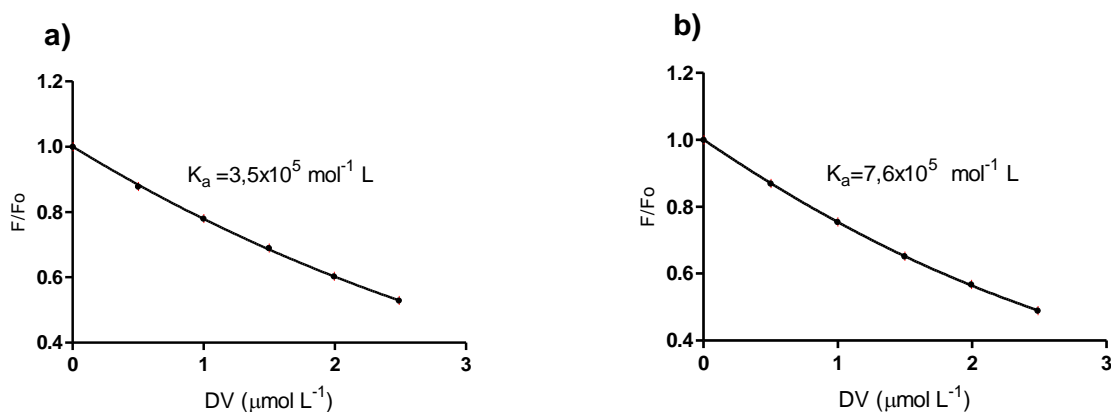
$$\frac{F}{F_0} = 1 - \frac{\varphi \left[ (Kd+nP+L) - \sqrt{(Kd+P+L)^2 - 4nPL} \right]}{2nP} \quad (8)$$

Nesta equação,  $F_0$  é a fluorescência na ausência de ligante;  $F$  é a fluorescência na presença de ligante;  $\varphi$  é a amplitude de alteração da razão de fluorescência;  $P$  é a concentração de proteína;  $L$  é a concentração de ligante;  $Kd$  é a constante de dissociação; e  $n$  é o número de sítios de ligação (GRACIANI; XIMENES, 2013). Aqui, assumimos a formação de um complexo 1:1,  $n$  foi definido como 1, Eq. 9:

$$\frac{F}{F_0} = 1 - \frac{\varphi \left[ (Kd+P+L) - \sqrt{(Kd+P+L)^2 - 4PL} \right]}{2P} \quad (9)$$

Foi construído o gráfico  $F/F_0$  em função da concentração de DV, como representado na Figura 53 para os sistemas BSA:DV e HSA: DV. Os valores da constante de dissociação ( $Kd$ ) foram obtidos utilizando uma regressão não linear da Eq. 9. Os valores de  $K_a$  foram calculado como  $1/Kd$ , e foram obtidos os valores de  $3,5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}\text{L}$  para BSA:DV e  $7,6 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}\text{L}$  para HSA:DV. Como pode ser observado, o valor de  $K_a$  para DV:HSA foi superior ao obtido para DV:BSA. No entanto, nos dois casos, as constantes obtidas para o DV, indicam uma forte ligação do ligante a proteína. Alguns estudos revelam um maior valor de constante de ligação entre ligantes e HSA comparado a BSA (NUSRAT, et. al., 2016), no entanto isso não é uma regra, esses valores podem variar tanto para BSA como HSA.

**Figura 52** - Gráfico obtido pela regressão não linear da equação 9 para o cálculo da constante de ligação: a) BSA (2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e b) HSA (2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DV (0-2,5  $\mu\text{M}$ ) em tampão fosfato 0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0, com excitação em 295 nm e emissão de 310 a 450 nm, a 20°C.



### 6.3 Determinação dos parâmetros termodinâmicos de ligação

As forças de interações entre uma pequena molécula orgânica e uma macromolécula ocorrem principalmente por: interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações eletrostáticas (CHENG, 2012). Portanto, as forças de ligação entre o DV e as proteínas foram estudadas com base nos cálculos dos parâmetros termodinâmicos  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  (RAZA, et.al, 2017; HUANG, et.al, 2016). Para isso, as constantes de ligações foram obtidas em diferentes temperaturas, e, assumindo que  $\Delta H$  não varia na faixa de temperatura estudada, os parâmetros termodinâmicos foram obtidos utilizando a equação de Van't Hoff (RAZA, et.al, 2017; SURYAWANSHI, et. al., 2016) (Eq 10).

$$\ln \left( \frac{K_2}{K_1} \right) = \frac{\Delta H^\circ}{R} \left[ \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \quad (10)$$

Nesta equação, R é constante universal dos gases ( $8,324 \text{ J.K}^{-1}.\text{Mol}^{-1}$ ) (OLSSON, et. al., 2008) e  $K_1$  e  $K_2$  as constantes de equilíbrio obtidas nas temperaturas  $T_1$  e  $T_2$ , respecti-



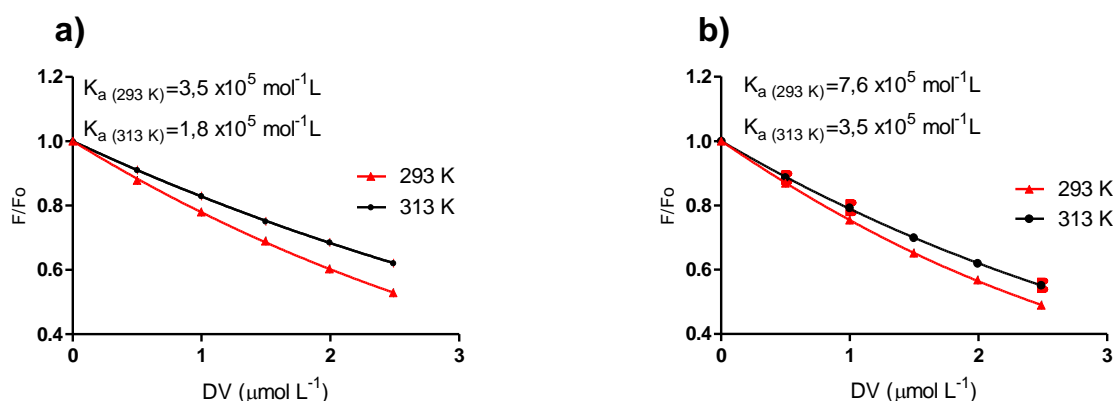
vamente. A equação de energia livre de Gibbs (Eq. 11) fornece o  $\Delta G^\circ$  da reação nas duas temperaturas estudadas. De posse de  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta G^\circ$ , pôde-se obter a variação de entropia da interação  $\Delta S^\circ$  por meio da equação 12. Os valores de  $K_a$ , em diferentes temperaturas, foram obtidos pela supressão de fluorescência e aplicação da equação 9 (Fig. 53).

Os parâmetros termodinâmicos para o sistema BSA-DV e HSA-DV estão listados na Tabela 3.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad (11)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (12)$$

**Figura 53** - Gráfico obtido pela regressão não linear da equação 9, em diferentes temperaturas, para o cálculo da constante de ligação: a) BSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e b) HSA ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DV ( $0-2 \mu\text{M}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, com excitação em 295 nm e emissão de 310 a 450 nm, a  $20^\circ\text{C}$  e  $40^\circ\text{C}$ .



**Tabela 3** - Constante de ligação e parâmetros termodinâmicos dos sistemas DV-HSA e DV-BSA em diferentes temperaturas.

Proteína	T(K)	$K_a (10^5 \text{ mol}^{-1}\text{L})$	$\Delta H^\circ (\text{KJ mol}^{-1})$	$\Delta G^\circ (\text{KJ mol}^{-1})$	$\Delta S^\circ (\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1})$
BSA	293	3,5	-24,9	-31,1	20,9
	313	1,8		-31,5	
HSA	293	7,6	-29,8	-32,9	10,8
	313	3,5		-33,2	

Valores negativos de  $\Delta G^\circ$  indicam a ocorrência de um processo espontâneo nos dois casos (SURYAWANSHI, et. al., 2016). Os valores de  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  para a interação de ligação entre DV e BSA foram de  $-24,9 \text{ kJ mol}^{-1}$  e  $20,9 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ , respectivamente, e os valores de  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  para a interação de ligação entre DV e HSA foram de  $-29,8 \text{ kJ mol}^{-1}$  e  $10,8 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ , respectivamente. Os valores negativos de  $\Delta G^\circ$  para as diferentes temperaturas, acompanhados de valores positivos de  $\Delta S^\circ$  e negativos de  $\Delta H^\circ$ , demonstram claramente a formação dos complexos BSA-DV e HSA-DV, indicativo de espontaneidade das interações entre proteína e ligante. Também é possível caracterizar como exotérmica a reação entre DV e proteína a partir do sinal negativo dos valores de  $\Delta H^\circ$ .

Segundo ROSS e SUBRAMANIAN (1981), as diferentes interações que podem ocorrer no processo de associação de proteínas podem ser caracterizadas pelos sinais e magnitudes dos parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ ), isto é, se  $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$  a força principal é a interação hidrofóbica. Se  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$ , as forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio desempenham papéis importantes na interação.

Valores positivos de  $\Delta S^\circ$  evidenciam frequentemente a ocorrência de interações hidrofóbicas, pois as moléculas de água que estão dispostas de maneira ordenada em torno do ligante e da proteína e adquirem uma configuração mais aleatória após a entrada do ligante no sítio de ligação (LI, et. al., 2011). Os valores negativos de  $\Delta H^\circ$  indicam que há ligações de hidrogênio entre proteína e ligante (HE, et. al., 2016). Portanto, não é possível explicar os parâmetros termodinâmicos com base em um único modelo de força intermolecular. Estes resultados indicam que ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas desempenham o papel principal no processo de ligação dos complexos de DV-BSA e DV-HSA (TIAN, et. al., 2005; LI, et. al., 2011). Resultado semelhante foi obtido por He e colaboradores (2016), onde o fármaco em estudo, prometazina, ligou-se a HSA por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

## 6.4 Transferência de Energia

Os fenômenos de transferência de energia têm amplas aplicações nos estudos de interação em moléculas. De acordo com a teoria da transferência de energia não radiativa de Förster (FRET), a transferência de energia entre duas moléculas (doador, aceitador) ocorrerá sempre que o espectro de emissão do doador se sobrepor ao espectro de absorção de molécula aceitadora e a distância entre doador e aceitador for menor que 8 nm. Portanto, a FRET depende da distância entre a molécula doadora e aceitadora, bem como a orientação dos dipolos de transição doador e aceitador (SIDDIQI, et. al., 2017).

Para aplicar esse tipo de estudo na complexação entre ligantes e proteínas, uma maneira útil e sensível baseia-se no estudo da fluorescência intrínseca da proteína como doador no processo de FRET e o ligante como aceitador. Para HSA, a fluorescência do Trp 214 é o mais freqüentemente examinada entre os três fluoróforos aromáticos intrínsecos em moléculas de HSA. Este resíduo está localizado no subdomínio IIA da HSA (um dos dois principais locais de ligação de HSA) na posição 214 ao longo da cadeia (SHAFAEI, et. al., 2017). A distância crítica entre doador e aceitador quando a eficiência de transferência de energia para o aceitador é de 50 % ( $R_0$ ) foi calculada utilizando a equação de Förster:

$$R_0 = 0,211(K^2 n^{-4} Q_D J)^{1/6} \quad (6)$$

Onde  $K$  é o fator de orientação espacial,  $n$  é o índice de refração,  $Q_D$  é rendimento quântico do doador na ausência do aceitador e  $J$  é a área da sobreposição do espectro de emissão do doador com o espectro de absorção do aceitador, e pode ser avaliado integrando a área espectral de sobreposição (Eq. 13) (LAKOWICZ, 2010).

$$J = \int_0^{\infty} \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 f_D(\lambda) d\lambda \quad (13)$$

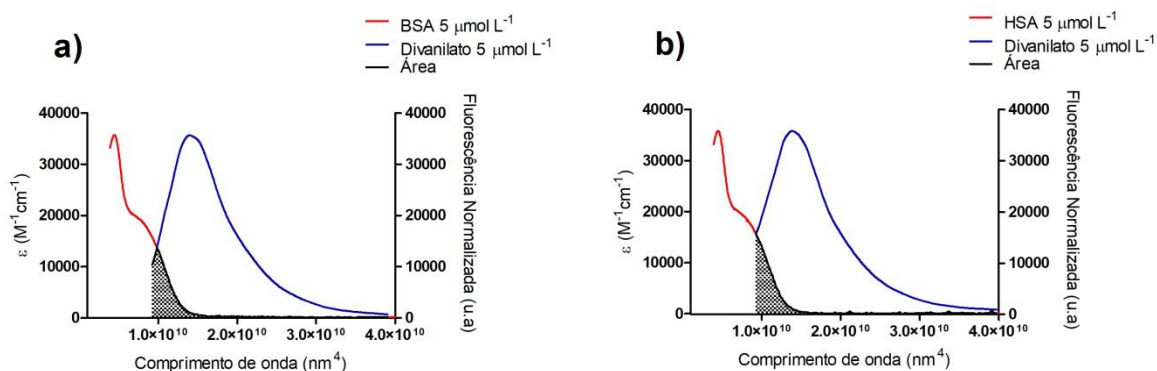
Onde  $J$  é a área da sobreposição do espectro de emissão do doador com o espectro de absorção do aceitador,  $\epsilon_A$  é espectro de absorção do aceitador expresso em absortividade molar,  $f_D$  é o espectro de emissão do doador normalizado na área.

A eficiência de transferência de energia ( $E$ ) e a distância ( $R$ ) entre proteína (doador) e DV (aceitador) foram calculadas utilizando a equação 5:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (5)$$

Onde  $F$  é a fluorescência doador-aceitador,  $F_0$  é a fluorescência do doador,  $r$  é a distância de ligação entre doador e aceitador,  $R_0$  é a distância crítica quando a eficiência de transferência de energia para o aceitador é de 50 %. A Figura 54 apresenta a sobreposição do espectro de absorção do DV com o espectro de emissão para ambas as proteínas, BSA e HSA.

**Figura 54** - Gráfico da sobreposição do espectro de emissão (proteína) e absorção (DV) para os sistemas: a) BSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e DV ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); b) HSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e DV ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $20^\circ\text{C}$ , com excitação em 295 nm e emissão de 310 a 450nm.



Observa-se a sobreposição espectral, condição necessária para ocorrência de

FRET, portanto, a partir destes dados, com os espectros de absorção do DV e emissão de fluorescência da proteína (ambos normalizados), calculamos a integral de sobreposição, a área (J) (Eq. 13, Fig. 54). Para o cálculo da distância de Förster utilizamos a Equação 5 e assumindo  $K^2 = 2/3$ ,  $n = 1,33$  e  $Q_D = 0,13$ . A eficiência de transferência de energia foi calculada utilizando a Equação 6, os valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Valores de Área (J), Distância de Förster ( $R_0$ ), Eficiência de Transferência de Energia (E) e Distância entre DV e Proteína (r) dos sistemas DV-BSA e DV-HSA.

Sistema	J ( $M^{-1}cm^{-1}nm^4$ )	$R_0$ (Å°)	E	r (Å°)
HSA-DV	36.928.694.970.054	21,17	0,59	20,0
BSA-DV	37.525.785.225.838	21,24	0,53	20,1

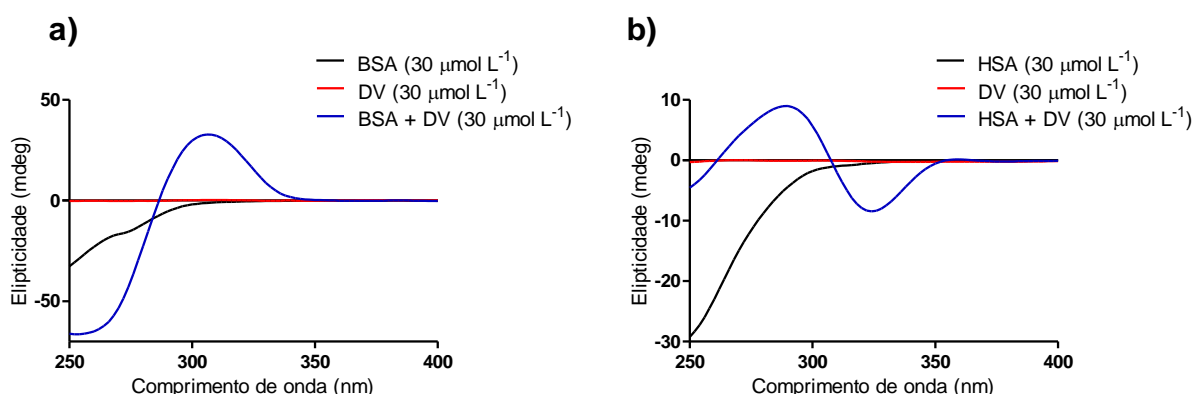
Os valores de r e  $R_0$  estão abaixo de 2,1 nm, dentro do intervalo permitido para que ocorra a transferência de energia entre DV e o triptofano da proteína ( $0,5 R_0 < r < 1,5 R_0$ ) (SIDDIQI, et. al., 2017). Os dados sugerem que a transferência de energia das proteínas, BSA e HSA, para o DV tem alta probabilidade de ocorrer. De acordo com o previsto pela teoria de transferência de energia não radiativa de Förster, esses resultados indicam que ocorreu um mecanismo de supressão estático e houve a formação de um complexo entre DV e as proteínas BSA e HSA.

## 6.5 Efeito da Elipticidade Induzida em Divanilato

A monitoração do sinal de ICD é uma técnica muito útil e livre de interferência para o estudo da interação ligante proteína. Trata-se de uma evidência direta da complexação e pode contribuir significativamente para a elucidação do processo de ligação. A técnica de ICD foi utilizada neste trabalho para avaliar a ocorrência de ligação entre DV e proteína e estimar o grau de associação entre ambos, ou seja, calcular a constante de ligação (VENTURINI, et. al., 2017). A Figuras 55 apresenta os espectros de CD para o DV e BSA e

DV e HSA. Como pode ser observado, a ligação DV e BSA resultou no aparecimento de um significativo sinal de dicroísmo circular com uma banda intensa positiva próxima a 312 nm. Já a complexação entre HSA e DV resultou no aparecimento de duas bandas de ICD, uma mais intensa a 292 nm e uma banda negativa a 320 nm. Neste caso, chama a atenção ainda a inversão do sinal de ICD quando comparado a ligação nas duas proteínas. Isso sugere diferentes conformações do DV e conseqüentemente diferentes interações nos sítios de ligação das proteínas.

**Figura 55** – a) Elipticidade induzida em DV ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) por: a) BSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); b) HSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$ .



O próximo passo foi avaliar a afinidade de ligação entre DV e proteína, utilizando alterações dependentes da concentração no sinal de ICD como um parâmetro analítico para avaliar a constante de ligação entre DV e proteína. Para os cálculos, a intensidade do sinal ICD ( $\theta$  mdeg) foi tomada como proporcional à concentração do complexo ligante-proteína (LP), Equações 14 e 15.



$$\theta \text{ (mdeg)} = K[PL] \quad (15)$$

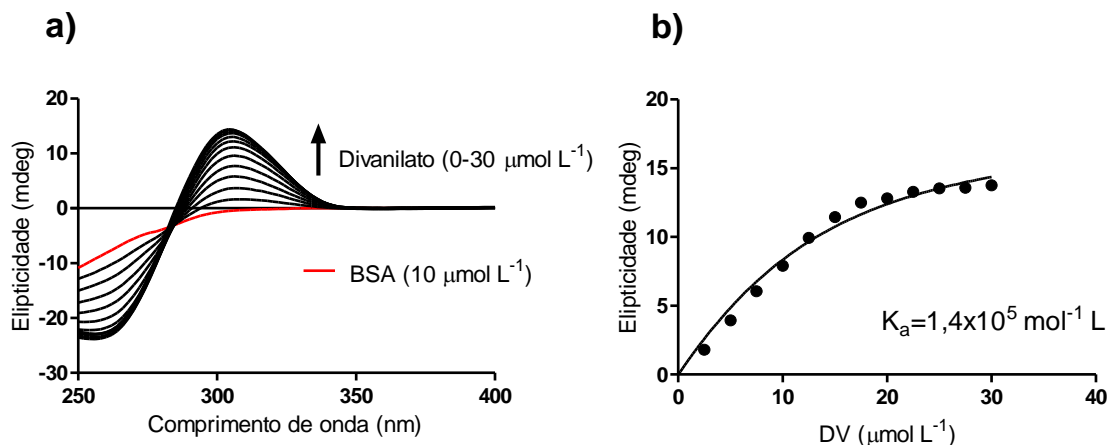
A constante de ligação ( $K_a$ ) foi obtida pelo tratamento não-linear da Equação 16. Onde,  $K$  é uma constante de proporcionalidade,  $P$  e  $L$  são as concentrações adicionadas de proteína e DV, respectivamente (ZSILA; HAZA; SAWYER, 2005).

$$\theta(\text{mdeg}) = \frac{K}{2} \left[ P + L + \frac{1}{K_a} - \sqrt{\left( P + L + \frac{1}{K_a} \right)^2 - 4PL} \right] \quad (16)$$

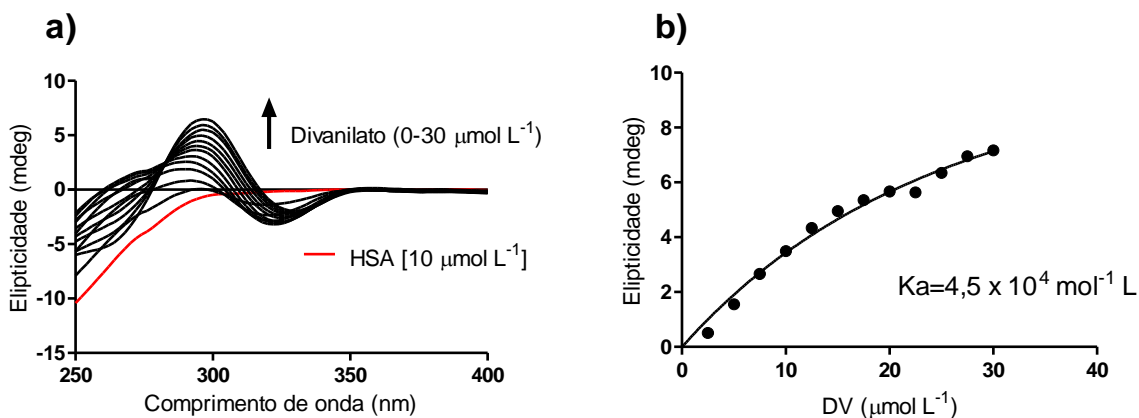
Os resultados representados na Figura 56a e 57a representam a evolução do sinal ICD em função de quantidades crescente de DV para as proteínas BSA e HSA, respectivamente. Da mesma forma as Figura 56b e 57b representam o tratamento matemático da Equação 16, onde para o cálculo das constantes foram considerados as alterações do sinal de ICD no comprimento de onda de 312 nm para BSA e 292 nm para HSA. A partir dos valores obtidos e seguido pelo tratamento matemático foram obtidos os valores de  $K_{a(BSA)}$  ( $1,4 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ ) e  $K_{a(HSA)}$  ( $4,5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ ).

Como pode ser observado, esses valores são menores em comparação com as constantes obtidas por supressão de fluorescência  $K_{a(BSA)}$  ( $3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) e  $K_{a(HSA)}$  ( $7,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). Uma explicação para este valor mais baixo tem seu fundamento na origem do sinal ICD do DV. Considera-se que o sinal de ICD observado é o resultado apenas de um excesso enantiomérico de uma conformação específica preferencial do DV fixada nos locais de ligação da proteína. Em outras palavras, que existe mais de uma conformação para se ligar, mas uma tem maior preferência. O método por supressão de fluorescência independe da forma conformacional que DV se liga a proteína, e os cálculos levam em conta o total de moléculas ligadas. Como o sinal de ICD de um conformador poderia ser parcialmente ocultado pelo par enantiomérico, esse fato poderia explicar a menor constante de ligação obtida usando esta técnica.

**Figura 56** – a) Elipticidade induzida em DV (0-30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) por BSA (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), em tampão fosfato 0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C. b) Comportamento não linear dos sinais de ICD de BSA na presença de diversas concentrações de DV (0-30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Sinal observado em 312 nm.



**Figura 57** – a) Elipticidade induzida em DV (0-30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) por HSA (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), em tampão fosfato 0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a 25°C. b) Comportamento não linear dos sinais de ICD de HSA na presença de diversas concentrações de DV (0-30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Sinal observado em 292 nm.

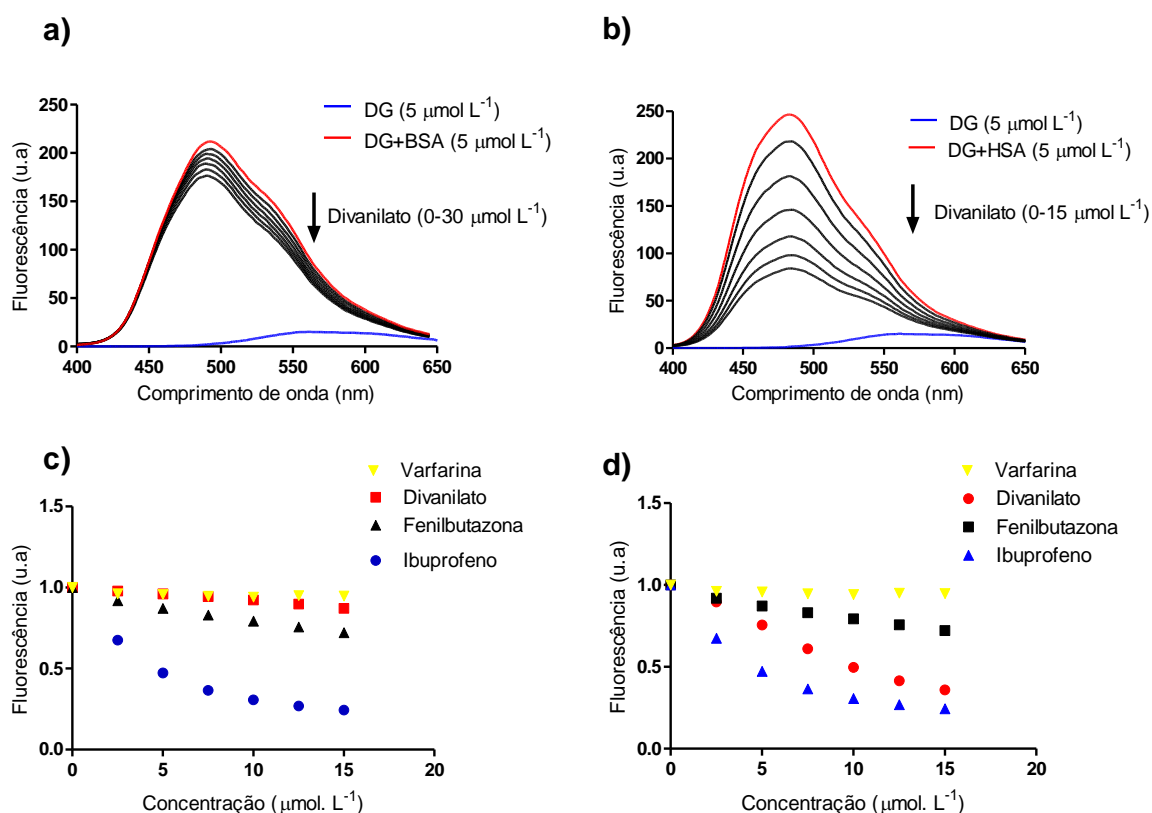




## 6.6 Identificação dos Sítios de Ligação por Deslocamento de Ligantes de sítio I e II

Através dos ensaios de supressão de fluorescência e ICD confirmou-se que o DV se liga de forma eficiente tanto à BSA como à HSA. Na sequência realizou-se estudos para elucidar o sítio de ligação do DV nas proteínas por meio de deslocamento de ligantes de sítio I e sítio II conhecidos das proteínas: dansilglicina (DG), ligante de sítio II e varfarina (V), ligante de sítio I. A Figura 58 apresenta os resultados para os ensaios de deslocamento da sonda fluorescência (DG) e mostram as características típicas deste tipo de ensaio, ou seja, há um aumento da intensidade de fluorescência e um deslocamento para o azul quando a sonda se liga à proteína (VENTURINI, et. al., 2017; DE; KAUR; DATTA, 2013). Como esperado, a adição de ibuprofeno (sítio II) provocou maior deslocamento da DG comparado a fenilbutazona (sítio I), Fig. 58c e 58d. Com a adição de DV ocorreu a diminuição da intensidade de fluorescência, indicando um deslocamento da sonda DG e mostrando a capacidade do DV de interagir com o sítio II das proteínas BSA e HSA. No entanto, ao se comparar a queda da intensidade de fluorescência da interação de DV:BSA e DV:HSA (Figura 58c e 58d) é notório uma maior diminuição da intensidade de fluorescência quando DV interage com HSA. DV deslocou mais facilmente DG do sítio II de ligação da HSA. Esses resultados mostram uma maior capacidade do DV em interagir com o sítio II da proteína HSA em comparação com a proteína BSA, ou seja, uma maior afinidade de DV em se ligar ao sítio II de HSA.

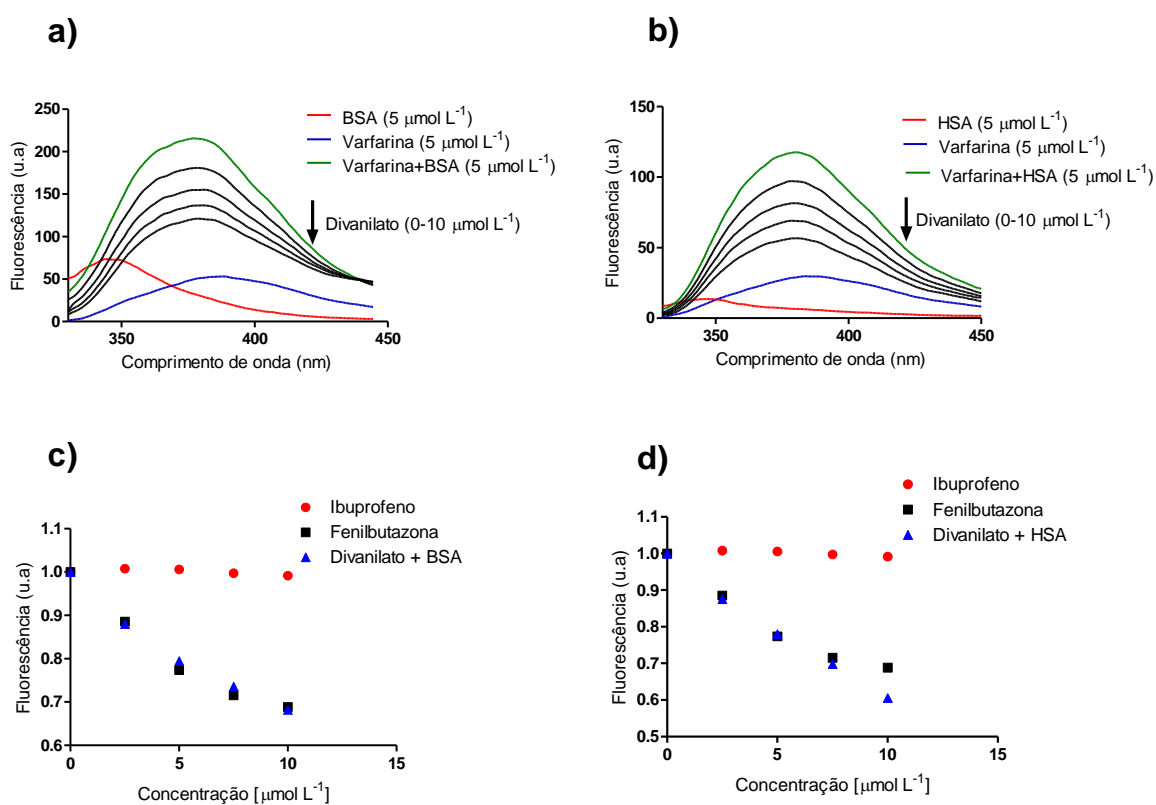
**Figura 58** - Ensaio de deslocamento de sondas fluorescêntes: a) Espectro de emissão da BSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DG ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e DV ( $0-30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$  com excitação em 340 nm. b) Espectro de emissão da HSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de DG ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e DV ( $0-15 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$  com excitação em 340 nm. c) Comparação da queda do máximo de fluorescência da BSA provocada pela adição de ligantes de sítio I, sítio II e DV. d) Comparação da queda do máximo de fluorescência da HSA provocada pela adição de ligantes de sítio I, sítio II e DV.



O uso dos farmacos varfarina e fenilbutazona (sítio I) e ibuprofeno (sítio II) como marcadores de sítio evidenciam com eficiência o local de ligação do composto em estudo. Ao deslocar esses marcadores de seu sítio de ligação há um decrescimo da intensidade de fluorescência, confirmando a preferência da droga pelo local de ligação do marcador utilizado (ZHANG, et. al., 2009; DE; KAUR; DATTA, 2013). A Figura 59 apresenta os resultados obtidos para um ligante de sítio I. A varfarina emite um pequeno sinal de fluorescência na região estudada (330 a 450 nm), no entanto, quando em contato com a proteína, há um aumento significativo da intensidade do sinal de fluorescência e um ligeiro deslocamento do

sinal para um menor comprimento de onda (ZHANG, et. al., 2009). Como esperado, a adição de fenilbutazona (sítio I) provocou maior deslocamento da varfarina comparado ao ibuprofeno (sítio II), Fig. 59 c e 59d. Com a adição de DV ocorreu uma supressão progressiva do sinal de fluorescência em função da concentração do DV, indicando assim que o DV também poderia ocupar o sítio I das proteínas. As Figuras 59c e 59d confirmam que a queda da intensidade de fluorescência provocada pelo DV foi similar à causada por um ligante de sítio I, a fenilbutazona, reforçando a proposta de que o DV pode ocupar o sítio I da proteína.

**Figura 59** - Ensaio de deslocamento de ligantes de sítio I: a) Espectro de emissão da BSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de varfarina ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e DV (0-10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$  com excitação em 310 nm. b) Espectro de emissão da HSA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de varfarina ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e DV (0-10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $25^\circ\text{C}$  com excitação em 310 nm. c) Comparação da queda do máximo de fluorescência da BSA provocada pela adição de ligantes de sítio I, sítio II e DV. d) Comparação da queda do máximo de fluorescência da HSA provocada pela adição de ligantes de sítio I, Sítio II e DV.



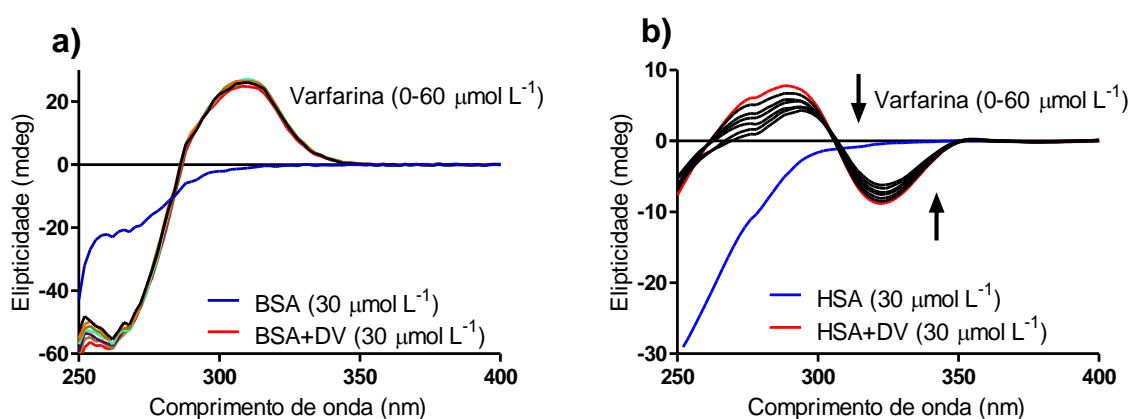
O DV, como um forte ligante de BSA e HSA, foi capaz de deslocar sondas de sítio I e II. A partir desses resultados pode-se concluir que o DV pode ligar-se em ambos os sítios de ligação das proteínas. Diferente do ensaio anterior, deslocamento da sonda fluorescente DG, aqui não houve diferença entre as proteínas BSA e HSA.

### **6.7 Efeito dos Ligantes de Sítio I, II e III na Elipticidade Induzida em Divanilato**

Como demonstrado nos ensaios de deslocamento de marcadores de sítio I e II, o DV foi capaz de se ligar em ambos os sítios. Assim, levando em conta que o mesmo é também suscetível a quiralidade induzida, o nosso próximo passo foi inverter o experimento e estudar se ligantes amplamente aceitos de sítio I, II e III da albumina poderiam provocar o deslocamento do DV, isto é, provocar a perda do sinal de ICD. Nestes estudos, o espectro de ICD do DV foi utilizado para monitorar a sua remoção a partir dos locais de ligação da proteína. Vale a pena ressaltar que os ligantes utilizados nesse estudo, varfarina (sítio I), ibuprofeno (sítio II) e digitoxina (sítio III), não possuem banda de ICD na região estudada e, portanto, não interferem no sinal do DV. Assim, qualquer alteração observada será resultado de alteração na conformação do DV na proteína ou remoção do mesmo dos sítios de ligações. A Figura 60 apresenta os efeitos no espectro de ICD do DV ligado a BSA e HSA, respectivamente. A adição de concentrações crescentes de varfarina, um ligante de sítio I da albumina, não provocou uma alteração significativa no espectro de ICD do DV quando complexado com BSA, mesmo sendo a concentração de varfarina sendo duas vezes superior que a de DV. Esses resultados podem ser interpretados de duas maneiras. A primeira delas seria que o sítio preferencial de ligação é o II e, portanto, a adição de varfarina não afetaria o mesmo. A outra interpretação seria que, mesmo se ligando em sítio I, sua maior afinidade comparado a varfarina não permite que esta última o desloque do sítio. É necessário admitir esta segunda opção, pois o experimento anterior (deslocamento de warfarina) indicou que o DV podia se ligar no sítio I.

Já o espectro de ICD do DV quando complexado com HSA resultou em uma diminuição do sinal de ICD após a adição de varfarina, no entanto, o sinal de ICD não foi totalmente perdido, embora a concentração do competidor tenha sido duas vezes mais elevada em comparação com a do DV. Neste caso, fica mais claro a ligação do DV no sítio I da HSA e estão de acordo com o resultado de deslocamento da varfarina.

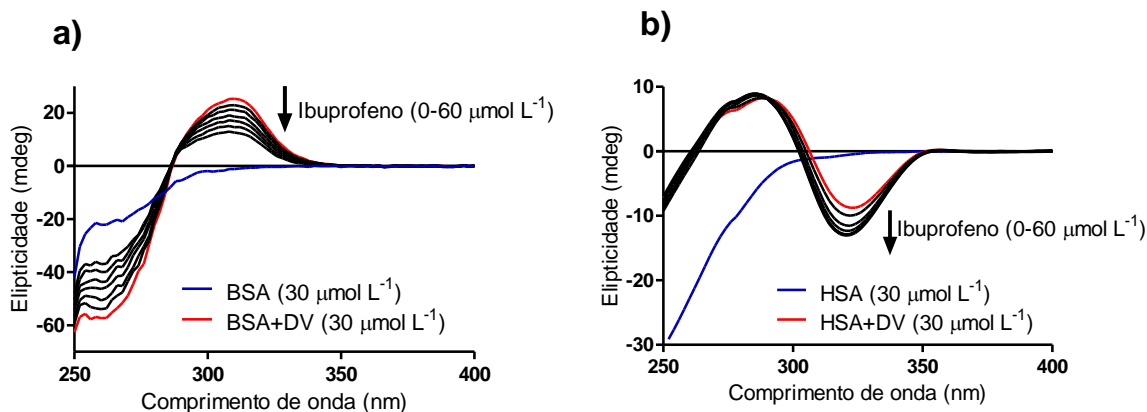
**Figura 60** - Efeito da adição de varfarina (0-60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no espectro de ICD do complexo: a) DV:BSA (30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). b) DV:HSA (30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).



A Figura 61 apresenta os efeitos no espectro de ICD do DV ligado a BSA e HSA, respectivamente, após a adição de concentrações crescentes de ibuprofeno, um ligante de sítio II. Como pode ser observado, após a adição de ibuprofeno houve uma diminuição no sinal de ICD do DV quando complexado com BSA. Este resultado está de acordo com o achado no experimento de deslocamento da dansilglicina e reforça a capacidade do DV se ligar também ao sítio II da BSA. Já para a HSA, a adição de ibuprofeno causou um efeito de certa forma inesperado, pois causou um acréscimo no sinal de ICD. Este tipo de alteração em sinais de ICD tem sido explicado como um efeito alostérico causado na proteína pela adição do ligante (VASCONCELOS; XIMENES, 2015; VENTURINI, et. al., 2017). Neste caso específico, ao entrar no sítio II, o ibuprofeno altera levemente a conformação da proteína.

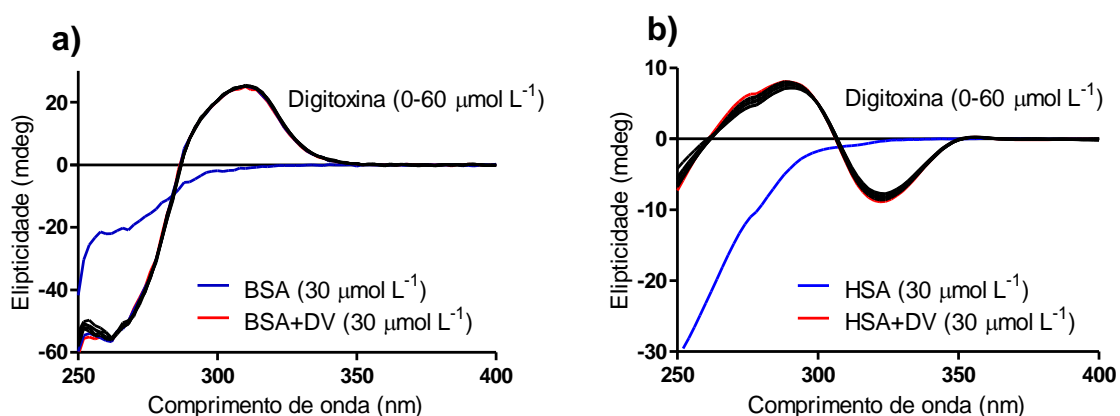
Como consequência, o DV presente no sítio I também sofre pequena alteração em sua conformação causando a alteração (intensificação e leve deslocamento) observada.

**Figura 61** – Efeito da adição de ibuprofeno ( $0-60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) no espectro de ICD do complexo: a) DV:BSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). b) DV:HSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).



A Figura 62 apresenta os efeitos no espectro de ICD do DV ligado a BSA e HSA, respectivamente, após a adição de concentrações crescentes de digitoxina, um ligante de sítio III da albumina (CHENG, 2012). Os resultados mostram que o ligante digitoxina não foi capaz de deslocar o DV do sítio de ligação tanto da BSA como da HSA. Como pode ser observado, novamente o espectro de ICD do DV na HSA não sofreu qualquer alteração, o que sugere que o sítio III não é ocupado por este ligante. Para a BSA, é possível verificar novamente uma leve intensificação e deslocamento do sinal, o que sugere o efeito alostérico.

**Figura 62** – Efeito da adição de digitoxina ( $0-60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) no espectro de ICD do complexo: a) DV:BSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). b) DV:HSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).



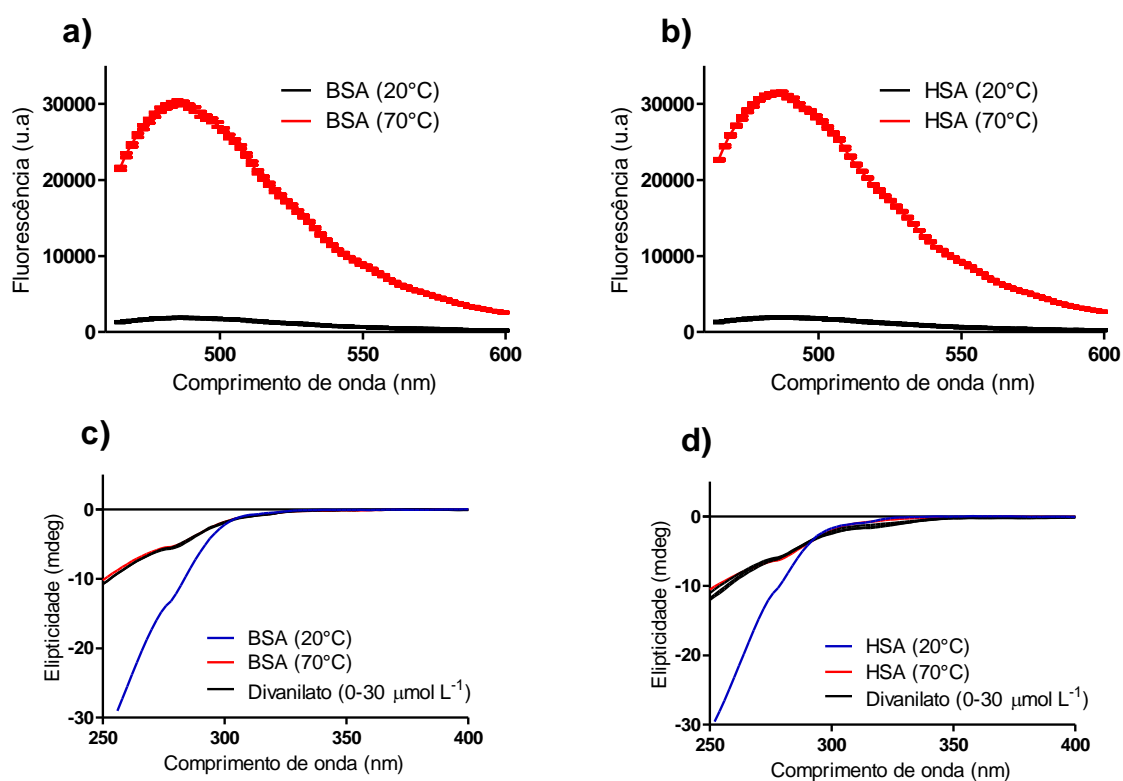
Diante dos resultados de deslocamento de marcadores de sítios por fluorescência e ICD pode-se concluir que DV liga-se tanto ao sítio I como ao sítio II das proteínas BSA e HSA, e no sítio III não ocorre a ligação desse fármaco. No entanto, esses resultados não são suficientes para confirmar a preferência do DV por um sítio de ligação específico, os resultados indicam uma leve preferência pelo sítio I tanto para HSA como BSA.

## 6.8 Efeito da Temperatura na Elipiticidade Induzida em Divanilato

O próximo passo foi estudar o efeito da temperatura na elipiticidade induzida no DV e verificar se este sinal poderia ser útil na detecção de fibras amiloidais. Portanto, utilizamos a técnica de ICD para monitorar a dissociação do complexo quando aquecido. Para isso, as proteínas, BSA e HSA, foram aquecidas por duas horas a  $70^{\circ}\text{C}$  sobre agitação constante. As Figuras 63a e 63b apresentam os espectros de Th-T na presença das proteínas no seu estado nativo e aquecida a  $70^{\circ}\text{C}$ . Como pode ser observado, houve um aumento significativo na intensidade de fluorescência para a proteína tratada, indicado a formação de agregados proteicos com características amiloidais (FREIRE, et. al. 2015; AMDURSKY, et. al., 2012). Assim, avaliou-se o comportamento do sinal de ICD do DV na presença da proteína tratada. As Figuras 63c e 63d apresentam os espectros de ICD do DV em contato com BSA e HSA.

Como pode ser observado, não houve o aparecimento do sinal de ICD do DV, indicando uma alteração estrutural no microambiente da proteína. Se por um lado este resultado reforça a proposta de que o sinal de ICD se dá pela interação das proteínas e o DV, por outro lado inviabiliza o uso do mesmo como um indicativo analítico de formação de agregados amiloidas, como apresentado no capítulo precedente para o VC.

**Figura 63** - Efeito da temperatura no espectro de emissão: a) BSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e b) HSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de Th-T ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com excitação em 435 nm, em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $20^\circ\text{C}$  e  $70^\circ\text{C}$ . Efeito da temperatura no espectro de ICD do DV nas concentrações de ( $0-30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), na presença de: c) BSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e d) HSA ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $20^\circ\text{C}$  e  $70^\circ\text{C}$ .



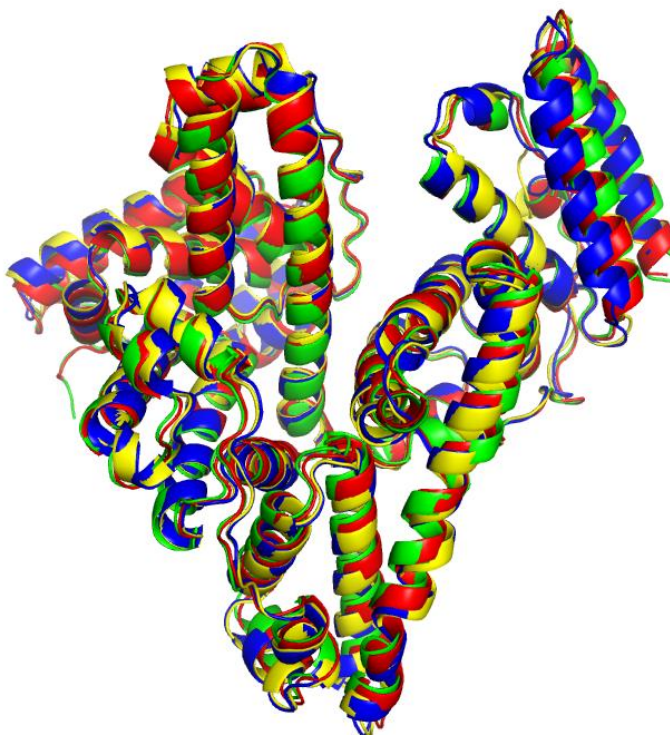
## 6.9 Estudos de *Docking* Molecular

O *docking* molecular é uma técnica computacional que pode simular a orientação preferencial que uma droga se liga à proteína, bem como a sua estabilização. O



conhecimento da orientação permite a caracterização quantitativa da força de ligação e apontar para a natureza química dos sítios de ligação e as forças intermoleculares que estão envolvidas na complexação entre os ligantes (DU, et. al., 2016). Uma vez que os resultados dos ensaios experimentais competitivos indicaram que o DV pode ligar-se tanto ao sítio I quanto ao sítio II, as simulações de *docking* foram realizadas para cada uma dessas regiões independentemente, para elucidar as características da interação. Para cada sítio foi estabelecido uma caixa que o engloba. A estrutura da proteína é mantida fixa e o ligante flexível, podendo se acomodar na estrutura da proteína. Foram realizadas 100 execuções independentes do *docking* - 100 experimentos. Ao final das execuções, as posições DV-proteína foram avaliadas de acordo com a similaridade geométrica (RMSD < 2 Å) e de energia, e foram agrupadas em cluster, sendo o cluster 1 aquele que apresenta conformação mais favorável, ou seja, aquele de menor energia. Foram analisadas as interações do cluster de menor energia e do cluster mais populoso para o Sítio I e Sítio II considerando duas estruturas da BSA (PDB ID: 3V03 e 4OR0) e duas estruturas da HSA (PDB ID: 1AO6 e 1E7A). A cadeia A de cada estrutura foi selecionada como a estrutura do receptor para os *dockings*, Figura 64.

**Figura 64** - Estruturas terciárias sobrepostas da BSA e HSA. As estruturas da BSA foram retiradas do *Protein Data Bank* sob os códigos 3V03 (em vermelho) e 4OR0 (em verde), enquanto que as estruturas da HSA estão sob os códigos 1AO6 (em azul) e 1E7A (em amarelo).



Os resultados mostraram que os *clusters* mais populosos não foram necessariamente aqueles de conformações de menor energia, portanto, para os estudos, foram considerados os clusters mais populosos e os de mais baixa energia. Considerando a hipótese de que o composto estaria ligado internamente aos sítios, as poses consideradas foram analisadas quanto a esse parâmetro, sendo que as que satisfizeram esse critério estão marcadas de cinza na Tabela 5, que mostra as respectivas energias de ligação, a quantidade de clusters e os números de poses obtidas para cada sítio analisado de cada proteína.

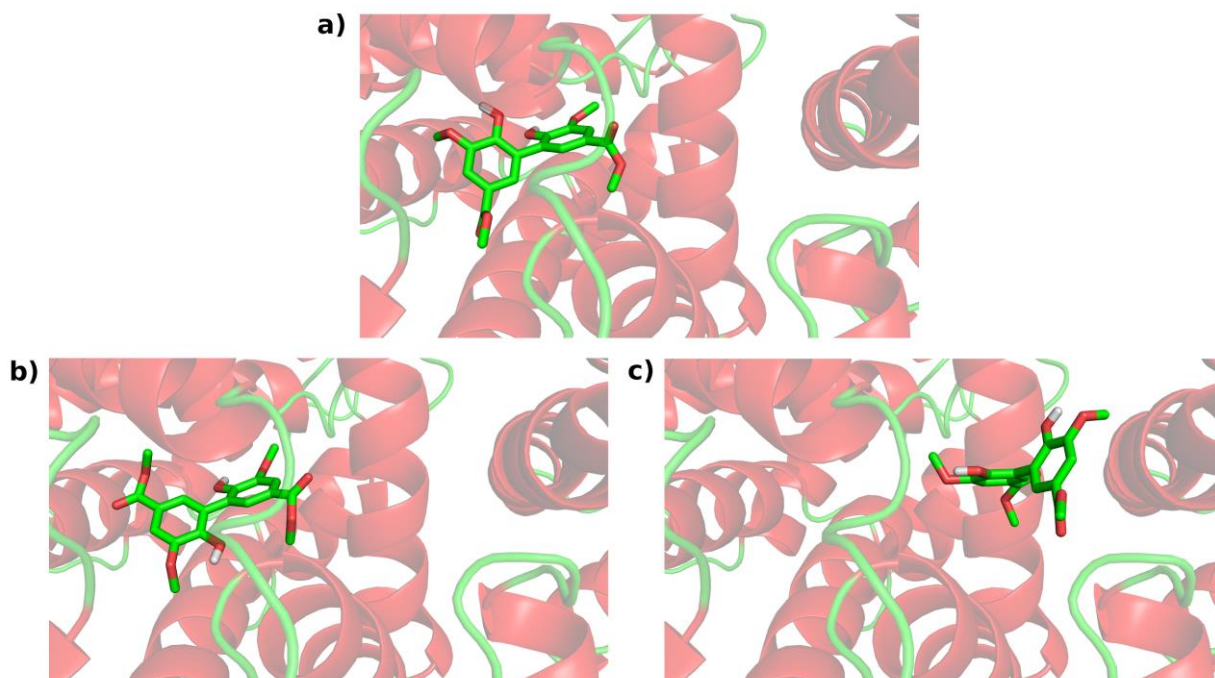
**Tabela 5** - Resultados do *Docking* para o cluster de menor e maior energia: número de clusters, energias de Ligação em kcal/mol, população (%) e localização.

			Número de clusters		Energia de ligação (kcal/mol)	População (%)	Localização
Sítio I	BSA	3V03	14	CI1	-7,24	2	Interno
				CI3	-5,84	29	Superfície
		4OR0	7	CI1	-7,48	1	Superfície
				CI2	-6,96	40	Interno
	HSA	1A06	8	CI1	-8,33	60	Interno
		1E7A	18	CI1	-7,01	10	Interno
CI8	-6,05			29	Superfície		
Sítio II	BSA	3V03	14	CI1	-6,45	6	Interno
				CI3	-5,59	62	Superfície
		4OR0	8	CI1	-6,90	72	Interno
	HSA	1A06	9	CI1	-6,18	7	Superfície
				CI2	-6,03	34	Superfície
		1E7A	9	CI1	-6,82	42	Interno

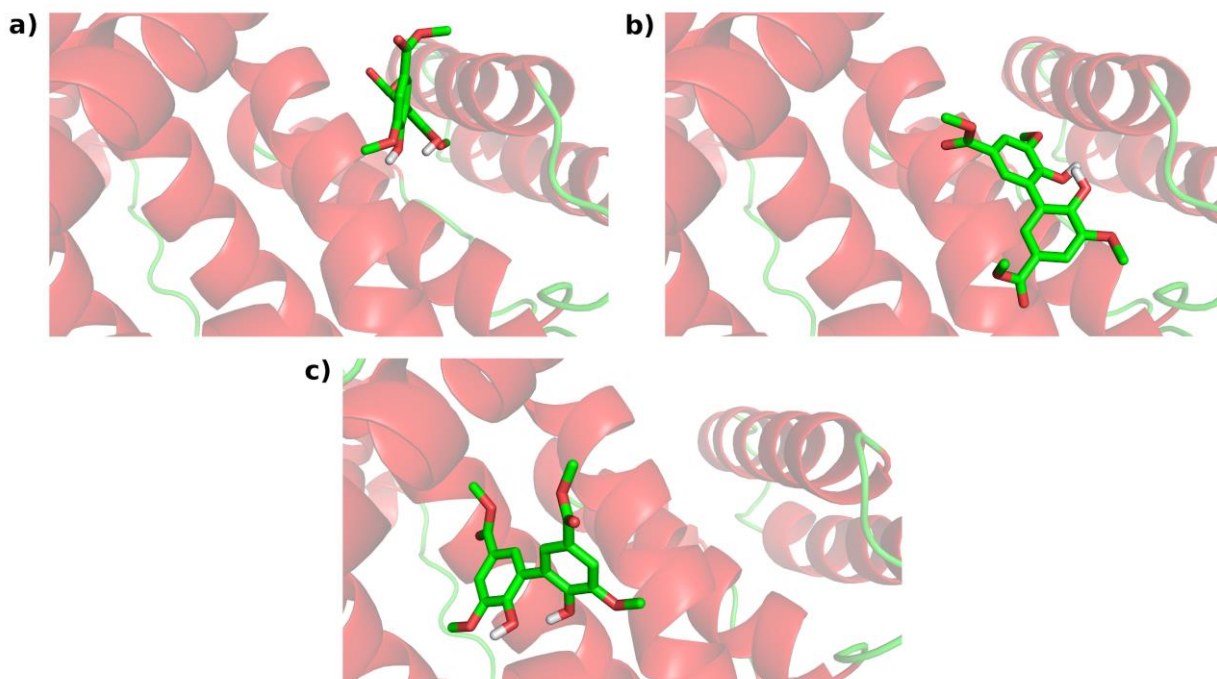
As poses encontradas para sítio I: BSA (3V03) cluster de menor energia, BSA (4OR0) cluster mais populoso, HSA (1A06) cluster de menor energia e mais populoso, HSA (1E7A) cluster de menor energia, e para o sítio II: BSA (3V03) cluster de menor energia, BSA (4OR0) cluster de menor energia e mais populoso, HSA (1A06) nenhum, HSA (1E7A)

cluster mais populoso, mostram que o DV esta localizado na parte interna do sítio de ligação. As Figuras 65 e 66 apresentam as poses obtidas para cada cluster (mais populoso e de menor energia) para HSA, sítio I e sítio II, respectivamente.

**Figura 65** - Poses encontradas do divanilato na HSA no sítio I. a) PDB 1A06 - cluster de menor energia e também o mais populoso (C11); b) PDB 1E7A - cluster de menor energia (C11); e c) PDB 1E7A - cluster mais populoso (C18).



**Figura 66** - Poses encontradas do divanilato na HSA no sítio II. a) PDB 1AO6 - cluster de menor energia (C11); b) PDB 1AO6 - cluster mais populoso (C12); e c) PDB 1E7A - cluster de menor energia e também o mais populoso (C11).



Esses resultados mostram pouca diferença entre as energias de ligação para ambos os sítios de ligação, no entanto, comparando os *clusters* em que o DV está ligado internamente ao sítio de ligação I, nota-se uma menor energia de ligação tanto para BSA quanto para HSA, comparado ao sítio II, indicando uma preferência por esse local de ligação (Tabela 5). Esses resultados estão de acordo com o obtido experimentalmente pelo experimento de deslocamento da varfarina, ligante de sítio I, onde indicou uma melhor preferência do DV pelo sítio I de ambas as proteínas. Contudo, os resultados obtidos experimentalmente e por estudo de *docking* não são suficientes para confirmar a preferência do DV por um sítio específico de ligação tanto para BSA como para HSA. Apenas que ele pode se ligar a ambos os sítios de ligação.

Os estudos de *docking* molecular permitem identificar as forças responsáveis pela estabilização do ligante no microambiente dos sítios de ligação da proteína, assim como os

respectivos resíduos de aminoácidos encarregados por tais interações (BERTOZO, et. al., 2019). As interações foram calculadas pelo programa Binana. As Tabelas 6, 7, 8 e 9 apresentam os resultados obtidos sobre os tipos de interações e os resíduos que participam desta interação entre DV e proteína para o sítio I e II.

**Tabela 6 - Número de interações no Sítio I.**

	Sítio I						
	BSA				HSA		
	3V03 CI1	3V03 CI3	4OR0 CI1	4OR0 CI2	1A06 CI1	1E7A CI1	1E7A CI8
<b>HB</b>	3	4	2	3	4	5	4
<b>HC</b>	40	35	31	32	44	33	33
<b>PIT</b>	---	---	---	---	---	---	2
<b>CPI</b>	1	1	---	---	---	---	1

HB: Ligação de hidrogênio | HC: Contatos Hidrofóbicos | PIT:  $\pi$ - $\pi$  *T-shaped* | CPI: Cation- $\pi$

**Tabela 7 - Número de interações no Sítio II.**

	Sítio II					
	BSA			HSA		
	3V03 CI1	3V03 CI3	4OR0 CI1	1A06 CI1	1A06 CI2	1E7A CI1
<b>HB</b>	3	5	7	3	3	2
<b>HC</b>	29	33	19	47	38	25
<b>PIT</b>	---	---	---	---	---	1
<b>CPI</b>	1	1	1	---	---	1

HB: Ligação de hidrogênio | HC: Contatos Hidrofóbicos | PIT:  $\pi$ - $\pi$  *T-shaped* | CPI: Cation- $\pi$

**Tabela 8** - Interações específicas entre o Divanilato e os resíduos do sítio I da albumina.

Resíduo	Sítio I							
	BSA				Resíduo	HSA		
	3V03 CI1	3V03 CI3	4OR0 CI1	4OR0 CI2		1A06 CI1	1E7A CI1	1E7A CI8
TYR(149)	HC	---	---	HC	TYR(150)	HC	HC	---
ARG(194)	---	HC/CPI	HC	---	LYS(195)	---	---	HB/HC/ CPI
LEU(197)	---	---	HC	---	LEU(198)	---	---	HC
ARG(198)	HC	---	---	---	LYS(199)	HB/HC	HB/HC	HB/HC
SER(201)	---	---	HB	---	TRP(214)	HC	HC	HC/PIT
ALA(209)	---	---	HC	---	ARG(218)	HC	---	HB/HC
TRP(213)	---	HB/HC	HC	---	LEU(219)	HC	---	---
ARG(217)	HC	HC	HC	HB/HC	GLN(221)	---	---	HC
LEU(218)	HC	---	---	HC	ARG(222)	HB	HB/HC	HB
PHE(222)	---	---	---	HC	PHE(223)	HC	---	---
LEU(237)	HC	---	---	HC	LEU(234)	HC	HC	---
HIS(241)	HC/CPI	---	---	---	LEU(238)	HC	HC	---
ARG(256)	HB/HC	---	---	HB	HIS(242)	---	HC	---
LEU(259)	HC	---	---	HC	ARG(257)	HB/HC	HB/HC	---
ALA(260)	HC	---	---	HC	LEU(260)	HC	HC	---
ILE(263)	HC	---	---	HC	ALA(261)	HC	---	---
SER(286)	HC	---	---	HC	ILE(264)	HC	HC	---
ILE(289)	HC	---	---	HC	SER(287)	HC	HC	---
ALA(290)	HC	---	---	HC	ILE(290)	HC	---	---
GLU(291)	---	HC	---	---	ALA(291)	HC	HC	---
ALA(341)	---	HC	---	---	VAL(343)	---	---	HC
VAL(342)	---	HB/HC	HC	---	PRO(447)	---	---	HC
LEU(346)	---	---	HC	---	CYS(448)	---	---	HC
CYS(447)	---	HC	---	---	ASP(451)	---	---	HC
ASP(450)	---	HB/HC	HB/HC	---	TYR(452)	---	---	HC
TYR(451)	---	HC	---	---				
SER(453)	---	---	HC	---				
LEU(480)	---	---	HC	---				

HB: Ligação de hidrogênio | HC: Contatos Hidrofóbicos | PIT:  $\pi$ - $\pi$  *T-shaped* | CPI: Cátion- $\pi$

**Tabela 9** - Interações específicas entre o Divanilato e os resíduos do sítio II da albumina.

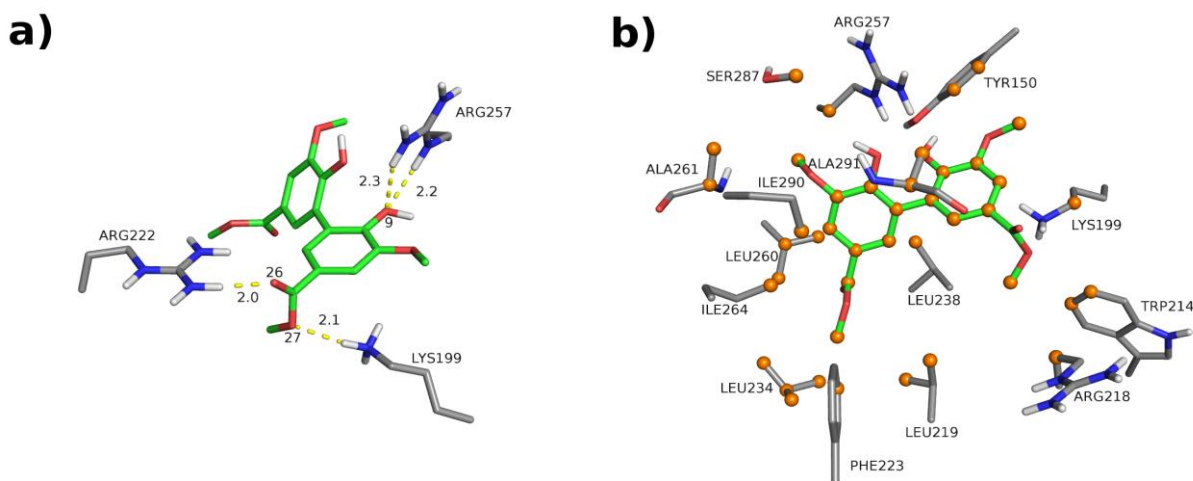
Resíduo	Sítio II						
	BSA			Resíduo	HSA		
	3V03 CI1	3V03 CI3	4OR0 CI1		1A06 CI1	1A06 CI2	1E7A CI1
LEU(386)	HC	---	HC	LEU(259)	HC	---	---
ILE(387)	HC	---	HC	LEU(387)	---	---	HC
GLN(389)	HC	HC	---	GLN(390)	---	---	HC
ASN(390)	HB/HC	HC	HB	ASN(391)	---	---	HB/HC
GLN(393)	---	HB	---	LEU(394)	---	HC	---
ALA(405)	---	HC	---	PHE(403)	---	---	HC
VAL(408)	---	HC	---	ASN(405)	HB/HC	---	---
ARG(409)	HC/CPI	HB/HC/C PI	HB/HC/CPI	ALA(406)	HC	HC	---
TYR(410)	HB	---	HB	VAL(409)	HC	HC	---
ARG(412)	---	HB/HC	---	ARG(410)	HC	HB/HC	HB/HC/CPI
LYS(413)	HB/HC	HB	HB	TYR(411)	---	---	HC/PIT
LEU(429)	---	---	HC	LYS(413)	---	HB/HC	---
LEU(452)	HC	---	HC	LYS(414)	---	HC	---
LEU(456)	HC	---	---	LEU(430)	---	---	HC
ARG(484)	HC	---	HC	LEU(453)	---	---	HC
SER(488)	HC	HC	HC	LEU(457)	---	---	HC
THR(491)	---	---	HC	ARG(485)	---	---	HC
				GLU(492)	---	HC	---
				VAL(493)	---	HC	---
				LEU(529)	HC	---	---
				LEU(544)	HC	---	---
				LYS(545)	HB/HC	---	---
				MET(548)	HC	---	---

HB: Ligação de hidrogênio | HC: Contatos Hidrofóbicos | PIT:  $\pi$ - $\pi$  *T-shaped* | CPI: Cation- $\pi$



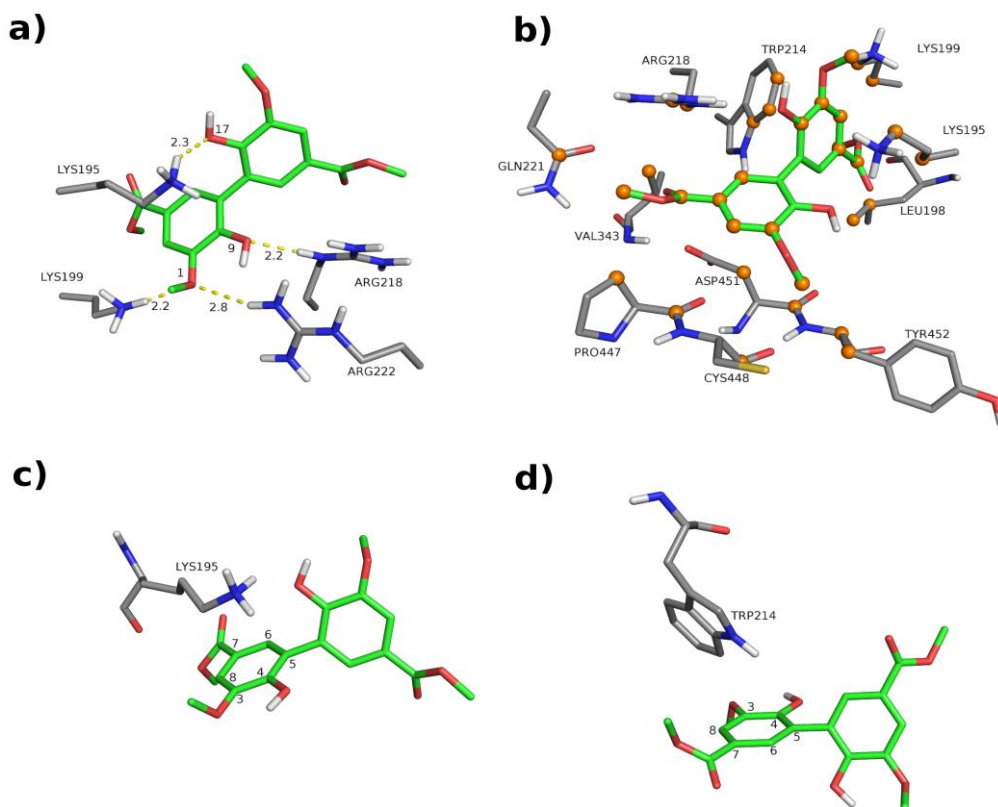
As Figuras 67 e 68 apresentam as interações para o sítio I e II da HSA (cluster mais populoso).

**Figura 67** - Interações encontradas no *docking* da HSA (PDB 1AO6) com o divanilato no sítio I, cluster de menor energia e também o mais populoso (C1). a) Ligação de Hidrogênio; b) Contatos Hidrofóbicos.



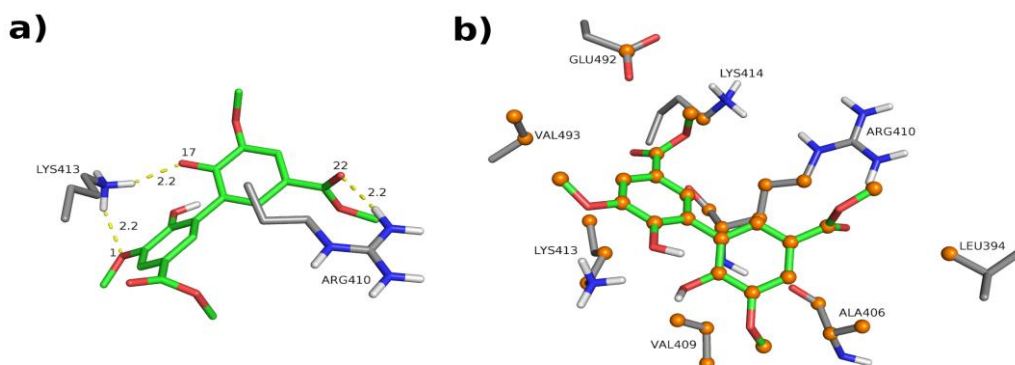
O cluster 1 da HSA (PDB 1AO6, sítio I) apresentou quatro ligações de hidrogênio, formadas com os resíduos Lys 199, Arg 222 e Arg 257 (Fig. 67a). Uma entre o oxigênio (O 26) do ligante e o hidrogênio (1HH2) do Arg 222 com distância de 2.0 Å, duas entre o oxigênio (O 9) do ligante e os hidrogênios (HE e 2HH2) da Arg 257 com distâncias de 2.2 e 2.3 Å, respectivamente. Por fim, uma entre o oxigênio (O 27) do ligante e o hidrogênio (HZ1) da Lys 199 com distância de 2.1 Å e 44 contatos hidrofóbicos com diversos resíduos (Fig. 67b).

**Figura 68** - Interações encontradas no docking da HSA (PDB 1E7A) com o divanilato no sítio I, cluster mais populoso (Cl8). a) Ligações de Hidrogênio; b) Contatos Hidrofóbicos; c) Cátion-Pi; d)  $\pi$ - $\pi$  T-shaped.



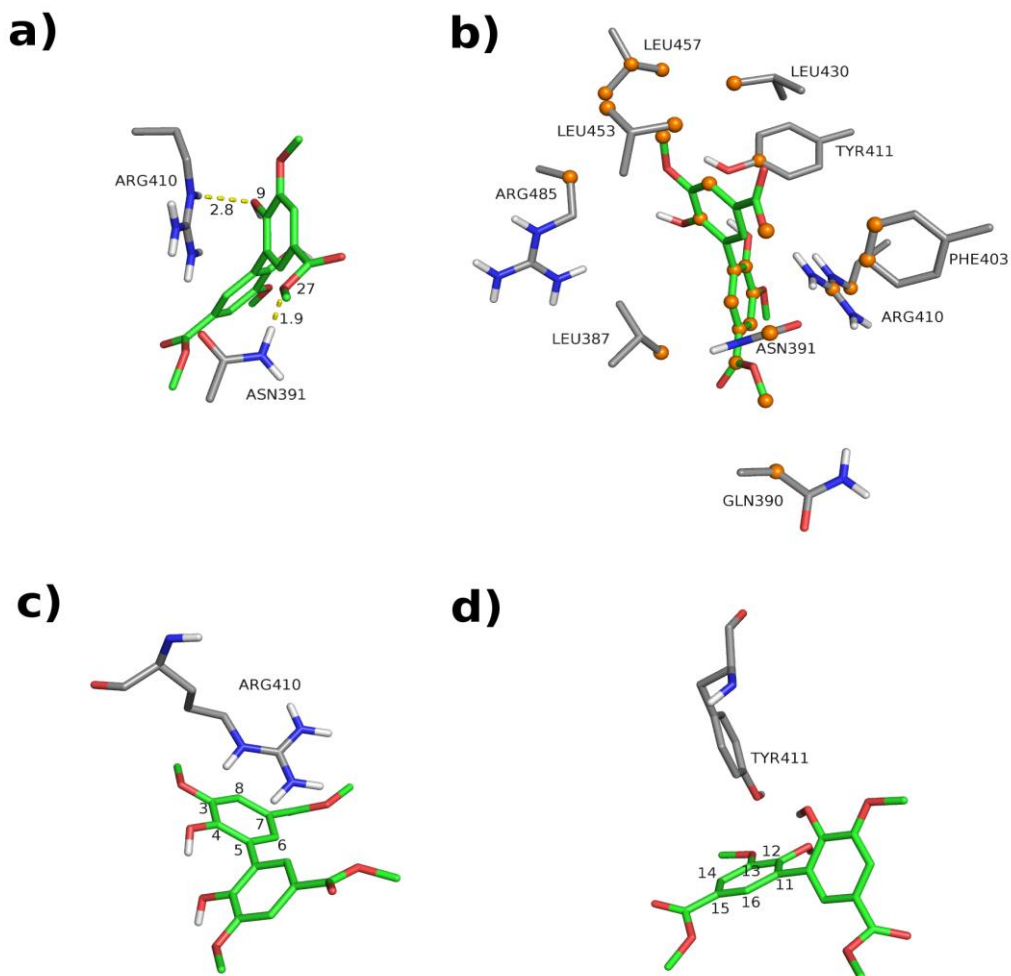
O Cluster 18 da HSA (PDB 1E7A, sítio I), apresentou quatro ligações de hidrogênio, formadas com os resíduos Lys 195, Lys 199, Arg 218 e Arg 222 (Fig. 68a). Duas entre o oxigênio (O 1) do ligante e os hidrogênios (HZ1 e 1HH2) da Lys 199 e Arg 222, com distâncias de 2.2 e 2.8 Å, respectivamente. Uma entre o oxigênio (O 9) do ligante e o hidrogênio (HE) da Arg 218 com distância de 2.2 Å. Por fim, uma entre o oxigênio (O 17) do ligante e o hidrogênio (HZ3) da Lys 195 com distância de 2.3 Å. Apresentou também, 35 contatos hidrofóbicos com diversos resíduos (Fig. 68b). Uma interação do tipo Cátion-Pi com a Lys 199 (com o anel numerado de 3 a 8 na Figura 68c) e duas interações do tipo Pi stacking (forma T) entre os anéis do Trp 214 e um anel (com o anel numerado de 3 a 8 na Figura 68d) do ligante.

**Figura 69** - Interações encontradas no *docking* da HSA (PDB 1AO6) com o divanilato no sítio II, cluster mais populoso (C12). a) Ligação de Hidrogênio; b) Contatos Hidrofóbicos.



O Cluster 2 da HSA (PDB 1AO6, sítio II), apresentou três ligações de hidrogênio, formadas com os resíduos Arg 410 e Lys 413 (Fig. 69a). Uma entre o oxigênio (O 1) do ligante e o hidrogênio (HZ2) da Lys 413 com distância de 2.2 Å, uma entre o oxigênio (O 17) do ligante e o hidrogênio (HZ3) da Lys 413 com distâncias de 2.2 Å. Por fim, uma entre o oxigênio (O 22) do ligante e o hidrogênio (1HH1) da Arg 410 com distância de 2.2 Å e 38 contatos hidrofóbicos com diversos resíduos (Fig. 69b)

**Figura 70** - Interações encontradas no *docking* da HSA (PDB 1E7A) com o divanilato no sítio II, cluster de menor energia e também o mais populoso (Cl1). a) Ligações de Hidrogênio; b) Contatos Hidrofóbicos; c) Cátion-Pi; d)  $\pi$ - $\pi$  T-shaped.



O cluster 1 da HSA (PDB 1E7A, sítio II) apresentou duas ligações de hidrogênio, formadas com os resíduos Asn 391 e Arg 410 (Fig. 70a). Uma entre o oxigênio (O 9) do ligante e o hidrogênio (HE) da Arg 410 com distância de 2.8 Å, e uma entre o oxigênio (O 27) do ligante e o hidrogênio (2HD2) da Asn 391 com distância de 1.9 Å. 55 contatos hidrofóbicos com diversos resíduos (Fig. 70b). Uma interação do tipo Cátion-Pi com a Arg 410 (com o anel numerado de 3 a 8 na Figura 70c) e uma interação do tipo Pi *stacking* (forma T) com a Tyr 411 (com o anel numerado de 11 a 16 na Figura 70d).

Os resultados de *docking* apontam uma predominância de interações hidrofóbicas (HC) seguida de pontes de hidrogênio (HB) como sendo as forças principais de estabilização tanto no sítio I como no sítio II da HSA e BSA. Esses resultados estão de acordo com os obtidos experimentalmente pelos cálculos dos parâmetros termodinâmicos de ligação, onde indicou que as ligações predominantes são interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênios.

## 7 CONCLUSÃO

- O VC liga-se fortemente à BSA;
- A constante de ligação calculada para o VC é da mesma ordem de magnitude quando comparado a fármacos conhecidos como ligantes de sítio I, II e III da BSA;
- VC é capaz de se ligar em mais de um local de ligação, sítios I, II e III, comprovados nos ensaios de deslocamento de sondas fluorescentes e sinal de ICD;
- Os ensaios de espalhamento de luz, fluorescência sincronizada e CD confirmaram que não ocorreu alteração estrutural da BSA após sua complexação com VC;
- Foi possível propor a utilização do sinal de ICD do VC para monitoração da formação de agregados amilóides da BSA;
- A monitoração do sinal de ICD do VC em função do aumento de temperatura revelou uma típica curva de alteração de fase da proteína, a qual poderá ser utilizada para sondar alterações na proteína provocada pelo meio.
- O DV se liga de forma eficiente à BSA e HSA, sendo ainda mais eficiente com esta última;
- O DV é capaz de se ligar nos sítios I e II das proteínas, como comprovados nos ensaios de deslocamento de sondas fluorescentes e sinal de ICD;
- Os resultados experimentais e de *docking* não indicaram uma diferença significativa pela preferência do DV por um sítio específico de ligação. No entanto, mostraram uma preferência do DV pelo sítio I de HSA e BSA.
- A monitoração do sinal de ICD do DV em função da temperatura revelou a alteração na estrutura da proteína quando submetida a um aumento de temperatura que levou a perda da capacidade de ligação ao DV, como demonstrado pela perda total do sinal de ICD do DV;
- Os estudos dos parâmetros termodinâmicos e *docking* molecular revelaram que as forças de interações predominantes entre DV e as proteínas são interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio.

## 8 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, M. H.; SMITH, R. E.; LUCHTEFELD, R.; BOOREM, A. J.; LUO, R.; ACREE JR, W. E. Prediction of solubility of drugs and other compounds in organic solvents. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99 (3), p. 1500-1515, 2010

ACEVEDO, J. A. M.; ALVAREZ, C. S.; ALSAAD, A. A.; PAGAN, R. J. Recurrent Syncope, a Clue in Amyloid Cardiomyopathy. **Case Reports in Medicine**, ID 1864962, P. 1-6, 2018.

AHMED, M.; BYRNE, J. A.; KEYES, T. E. Investigation of the inhibitory effects of TiO<sub>2</sub> on the  $\beta$ -amyloid peptide aggregation. **Materials Science and Engineering: C**, v.39, p. 227-234, 2014.

ALLENMARK, S. Induced circular dichroism by chiral molecular interaction. **Chirality**, v. 15, p. 409-422, 2003.

AMDURSKY, N.; EREZ, Y.; HUPPERT, D.; Molecular rotors: What lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker. **ACCOUNTS of Chemical Research**, v. 45 (9), p. 1548-1557, jun/ 2012.

AMIN, F. U.; SHAH, S.A.; KIM, M. O. Vanillic acid attenuates A $\beta$ 1-42-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice. **Scientific Reports**, p. 1-15, 2017.

ANAND, U.; JASH, C.; BODDEPALLI, R. K.; SHRIVASTAVA, A.; MUKHERJEE, S. Exploring the mechanism of fluorescence quenching in proteins induced by tetracycline. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 115, p. 6312- 6320, 2011.

ANEJA, B.; KUMARI, M.; AZAM, A.; KUMAR, A.; ABID, M.; PATEL, R.; Effect of triazole-tryptophan hybrid on the conformation stability of bovine serum albumin. **Luminescence**, p. 1-11, 2018.

ARAKAWA, T.; KITA, Y. Protection of bovine serum albumin from aggregation by Tween 80. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 89 (5), p. 646–651, 2000.

ARROYO, V.; GARCÍA, R. M.; SALVATELLA, X. Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v.61 (2) p. 396-407, 2014.

BAIER, S.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of preferential interactions on thermal stability and gelation of bovine serum albumin in aqueous sucrose solutions. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p. 2600-2608, 2001.

BAL, W.; SOKOLOWSKA, M.; KUROWSKA, E.; FALLER, P. Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830 (12) p. 5444-5455, 2013.

BARTUZI, D.; KACZOR, A. A.; DUDA, K. M. T.; MATOSIUK, D. Recent advances and applications of molecular docking to G protein-coupled receptors. **Molecules**, v 22, p. 1-23, 2017.

BATZLI, K.; LOVE, B. J. Agitation of amyloid proteins to speed aggregation measured by ThT fluorescence: A call for standardization. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48 (1), p. 359-364, 2015.

BERTOZO, L. C.; PHILOT, E. A.; LIMA, A. N.; LARA, P. T. R.; SCOTT, A. L.; XIMENES, V. F. Interaction between 1-pyrenesulfonic acid and albumin: Moving inside the protein. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.208 (5), p. 243-254, 2019.

BERTUCCI, C.; DOMENICI, E. Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance. **Current Medicinal Chemistry**, v.9, p. 1463-1481, 2002.

BHANK, G.; CHOE, Y. J.; PAIK, S.R. Mechanism of amyloidogenesis: nucleation-dependent fibrillation versus double-concerted fibrillation. **BMB reports**, v. 42 (9), p. 541-551, 2009.

BHATTACHARYA, S.; ARIJIT, D.; MAGAI, G.; SANGEETHA, J. Mycoremediation of Congo red dye by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.42, n.4, p. 1526-1536. 2011.



BHATTACHARYA, S.; DAS, A.; MANGAI, G.; VIGNESH, K.; SANGEETHA, J. Mycoremediation of congo red dye by filamentous fung. **Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1526-1536, 2011.

BRINGMANN, G.; MORTIMER, A. J. P.; KELLER, P. A.; GRESSER, M. J.; GARNER, J.; BREUNING, M. Atroposelective synthesis of axially chiral biaryl compounds. **Angewandte Chemie**, v. 44, p. 5384-5427, 2005.

CANGELOSI, G. A.; PALERMO, C. O.; LAURENT, J. P.; HAMLIN, A. M.; BRABANT, W. H. Colony morphotypes on Congo red agar segregate along species and drug susceptibility lines in the mycobacterium a vium-in tracellulare complex. **Microbiology**, v. 145, p. 1317-1324, 1999.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of sérum albumin, **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 153-203, 1994.

CARTER, D.B.; CHOU, K.C. A model for structure-dependent binding of congo red to alzeheimer  $\beta$ -Amyloid Fibrils. **Neurobiology of Aging**. v. 19, p.37-40, 1998.

CHA, P-H.; SHIN. W.; ZAHOOR, M.; KIM, H-Y.; MIN, D. S.; CHOI, K-Y. Hovenia dulcis thunb extract and its ingredient methyl vanillate activate Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway and increase bone mass in growing or ovariectomized mice. **PLoS One**, v. 9:e85546, 2014.

CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, B. P.; GUHA, A. K. Adsorptive removal of congo red, a carcinogenic textile dye by chitosan hydrobeads: Binding mechanism, equilibrium and kinetics. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. v. 299, p. 146-152, 2007.

CHATURVEDI, S. K.; ALAM, P.; KHAN, J. M.; SIDDIQUI, M.K.; KALAIARASAN, P.; SUBBARAO, N.; AHMAD, Z.; KHAN, R. H. Biophysical insight into the anti-amyloidogenic behavior of taurine. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 375-384, 2015.

CHEN, J.; LEBOEUF, E. J.; DAI, S.; GU, B. Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. **Chemosphere**, v. 50, p. 639-647, 2003.

CHENG, Z. Interaction of ergosterol with bovine serum albumin and human serum albumin by spectroscopic analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 9493-9508, 2012.

CONSTANTINO, H. R.; ANDYA, J. D.; NGUYEN, P. A.; DASOVICH, N.; SWEENEY, T. D.; SHIRE, S. J.; HSU, C. C.; MAA, Y. F. Effect of mannitol crystallization on the stability and aerosol performance of a spray-dried pharmaceutical protein, recombinant Humanized anti-IgE monoclonal antibody. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87 (11), p.1406-1411, 1998.

CRICHTON, R. R.; DEXTER, D. T.; WARD, R. J. Metal based neurodegenerative diseases—From molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, p. 1189-1199, 2008.

CURRY, S.; MANDELKOW, H.; BRICK, P.; FRANKS, N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. **Nature Structural Biology**, v. 5, p. 827-835, 1998.

DAVIDSON, M. W. Alexander Jablonski, PhD: Fluorescence Spectroscopy. **Luminaries**, v. 40, p. 694-695, 2009.

DE, D.; KAUR, H.; DATTA, A. An Unusual binding of a potential biomarker with human serum albumin. **Chemistry Asian Journal**, v. 8, p.728–735, 2013.

DEMCHENKO, A. P. **Introduction to Fluorescence Sensing**. 2<sup>nd</sup> Edition, Springer International Publishing Switzerland, New York, cap. 3 e 4, 2015.

DESPOIT, E.; BRIDOUX, F.; SIRAC, C.; DELBES, S.; BENDER, S.; FERNANDEZ, B.; QUELLARD, N.; LACOMBE, C.; GOUJON, J. M.; LAVERGNE, D.; ABRAHAM, J.; TOUCHARD, G.; FERNAND, J. P.; JACCARD, A. Al amyloidosis. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 7 (54), p. 1-13, 2012.

DOBSON, C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 15 (1), p. 3-16, 2004.

DOBSON, C. M. Protein misfolding, evolution and disease. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24 (9), p. 329-332, 1999.

DOCKAL, M.; CARTER, D. C.; RUKER, F. The three recombinant domains of human serum albumin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n°. 41, p. 29303-29310, 1999.

DOMIKE, K. R.; DONALD, A. M. Kinetics of spherulite formation and growth: Salt and protein concentration dependence on proteins  $\beta$ -lactoglobulin and insulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44 (4), p. 301-310, 2009.

DONG, A.; PRESTRELSKI, S. J.; ALLISON, S. D.; CARPENTER, J. F. Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84 (4), p. 415–424, 1995.

DRUMMEN, G. P. C. Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques — Illuminating Biological and Biomedical Research. **Molecules**, v. 17, p. 14067-14090, 2012.

DU, X.; LI, Y.; AI, S.; LIANG, J.; SANG, P.; JI, X.; LIU, S. Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17(2), p. 1-34, 2016.

DUBEY, K.; ANAND, B. G.; TEMGIRE, M. K.; KAR, K.; Evidence of rapid coaggregation of globular proteins during amyloid formation. **Biochemistry**, v. 53 (51), p. 8001-8004, 2014.

DUTTA, A.; BHATTACHARYYA, S.; KUNDU, A.; DUTTA, D.; DAS, A. K. Macroscopic amyloid fiber formation by staphylococcal biofilm associated SuhB protein. **Biophysical Chemistry**, v. 217, p. 32-41, 2016.

ERCELEN, S.; KLYMCHENKO, A. S.; MÉLY, Y.; DEMCHENKO, A. P. The binding of novel two-color fluorescence probe FA to serum albumins of different species. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, n. 5, p. 231-242, 2005.

FANALI G.; MAIS, A. di; TREZZA, V.; MARINO, M.; FASANO, M.; ASCENZI, P. Human serum albumin: from bench to bedside. **Molecular Aspects of Medicine**, Roma, v. 33 (3), p. 209–290, 2012.

FASMAN, G. D. **Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules**. New York: Plenum Press, cap. 2 e 3, p. 25-107, 2010.

FEREJA, T. H.; HYMETE, A.; GUNASEKARAN, T. A Recent Review on Chemiluminescence Reaction, Principle and Application on Pharmaceutical Analysis. **ISRN Spectroscopy**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

**FERREIRA, E. S.** Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos. **2009. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.**

FIELDS, G. B.; ALONSO, D. O. V.; STIGTER, D.; DILL, K.A. Theory for the aggregation of proteins and copolymers. **Journal Physical Chemistry**, v. 96, p. 3974-3981, 1992.

FONIN, A. V.; SULATSKAYA, A. I.; KUZNETSOVA, I. M.; TUROVEROV, K. K. Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. Inner Filter Effect Correction. **Plos One**, v. 9 (7), e103878, 2014.

FREIRE, S.; PRIETO, F. R.; RODRIGUEZ, M. C. R.; PENEDO, J. C.; AL-SOUFI, W.; NOVO, M. Towards ratiometric sensing of amyloid fibrils in vitro. **Photophysics**, v. 21 (8), p. 3425-3434, 2015.

FRIDA, P.; ANISIMOV, S.V.; POPOVIC N. Congo red and protein in neurodegenerative diases. **Brain Research Reviews**, v. 53, Issue 1, p.135-160, 2007.

GAWRONSKI, J.; GRAIEWSKI, J. The significance of induced circular dichroism. **Organic Letters**, v. 5 (18), p. 3301-3303, 2003.

GHUMAN, J.; ZUNZAIN, P. A.; PETITPAS, I.; BHATTACHAERYA, A. A.; OTAGIRI, M.; CURRY, S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **Journal of Molecular Biology**, v. 353 (1), p. 38-52, 2005.

GITZINGER, M.; KEMMER, C.; FLURI, D. A.; EL-BABA, M. D.; WEBER, W.; FUSSENEGGER, M. The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 5, p.1-15, 2011.

GRACIANI, F. S.; XIMENES, V. F. Investigation of human albumin-induced circular dichroism in dansylglycine. **Plos One**, v. 8, p. e76849, 2013.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nat Protoc. Author manuscript**, v. 1 (6), p. 2876-2890, 2006.

GUO, R.; LI, K. N.; LIU, B.; ZHU, H. J.; FAN, Y. M.; GONG, L. Z. Asymmetric synthesis of heteroaryl atropisomers via a gold-catalyzed cycloisomerization–amination cascade reaction. **Chemical Communications**, v. 50, p.5451-5454, 2014.

HABERHAUER, G.; TEPPER, C.; WÖLPER, C.; BLÄSER, D. Tropos, nevertheless conformationally stable biphenyl derivatives. **Eur. J. Org. Chem**, p. 2325–2333, 2013.

HASHEMI, P.; ABOLGHASEMI, M. M. Preparation of a novel optical sensor for low pH values using agarose membranes as support. **Sensors and actuators B: Chemical**. v. 115, p. 49-53, 2006.

HE, L. L.; WANG, Z. X.; WANG, Y. X.; LIU, X. P.; YANG, Y. J.; GAO, Y. P.; WANG, X.; LIU, B.; WANG, X. Studies on the interaction between promethazine and human serum albumin in the presence of flavonoids by spectroscopic and molecular modeling techniques. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.145, 820-829, 2016.

HILL, J. M.; LUKIW, W. J. Microbial-generated amyloids and Alzheimer's disease (AD). **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, p. 1-5, 2015.

HOLM, N. K.; JESPERSEN, S. K; THOMASSEN, L. V.; WOLFF, T. Y.; SHEGAL, P.; THOMSEN, L. A.; CHRISTIANSEN, G.; ANDERSEN, C. B.; KNUDSEN, A. D.; OTZEN, D. E. Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics**, v.1774, p. 1128-1138, 2007.

HOU, H.; QU, X.; LI, Y.; KONG, Y.; JIA, B.; YAO, X.; JIANG, B. Binding of citreoviridin to human serum Albumin: Multispectroscopic and molecular docking. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

HUANG, B. X.; KIM, H.Y.; DASS, C. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15(8), p. 1237-1247, 2004.

HUANG, S.; QIU, H.; LIU, Y.; HUANG, C.; SHENG, J.; CUI, J.; SU, W.; XIAO, Q. Systematical investigation of in vitro interaction of InP/ZnS quantum dots with human serum albumin by multispectroscopic approach. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.148, p.165-172, 2016.

HUANG, T.; ANSELME, K.; SARRAILH, S.; PONCHE, A. High-performance liquid chromatography as a technique to determine protein adsorption onto hydrophilic/hydrophobic surfaces. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 497, p. 54-61, 2015.

HUEREAU, C.; DORLET, P. Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- $\beta$  peptides involved in Alzheimer disease. Part 2: Dependence of Cu(II) binding sites with A $\beta$  sequences. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, p. 2175-2187, 2012.

INOUE, Y.; KUWAHARA, A.; OHMORI, K.; SUNAYAMA, H.; OOYA, T.; TAKEUCHI, T. Fluorescent molecularly imprinted polymer thin films for specific protein detection prepared with dansyl ethylenediamine-conjugated O-acryloyl L-hydroxyproline. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 48, p. 113-119, 2013.

IRYCH, M.; GORBENKO, G.; MALIYOV, I.; TRUSOVA, V.; MIZUGUCHI, C.; SAITO, H.; KINNUNEN, P. Combined thioflavin T–Congo red fluorescence assay for amyloid fibril detection. **Methods and Applications in Fluorescence**, v. 4, p. 1-10, 2016.

ISHIMATA, N.; ITO, H.; TAI, A. Structure–activity relationships of vanillic acid ester analogs in inhibitory effect of antigen-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 26, p. 3533–3536, 2016.

ISMAIL, H. M.; SCAPOZZA, L.; RUEGG, U. T.; DORCHIES, O. M. Diapocynin, a dimer of the NADPH oxidase inhibitor apocynin, reduces ROS production and prevents force loss in eccentrically contracting dystrophic muscle. **Plos One**, v.9 (10), e110708, 2014.

JANSEN, R.; DZWOLAK, W.; WINTER, R. Amyloidogenic self-assembly of insulin aggregates probed by high resolution atomic force microscopy. **Biophysical journal**, v. 88 (2), p. 1344-1353, 2005.

JI, N.; QIU, C.; LI, X.; XIONG, L.; SUN, Q. Study on the interaction between bovine serum albumin and starch nanoparticles prepared by isoamylolysis and recrystallization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 594-599, 2015.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, V. 283, p. 65-87, 2011.

KABIR, M. Z.; MUKARRAM, A. K.; MOHAMAD, S. B.; ALIAS, Z.; TAYYA, S. Characterization of the binding of an anticancer drug, lapatinib to human serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 229-239, 2016.

KAHL, A.; BLANCO, I.; JACKMAN, K.; BASKAR, J.; MOHAN, H. M.; RODNEY-SANDY, R.; ZHANG, S.; LADECOLA, C.; HOCHRAINER, K. Cerebral ischemia induces the aggregation of proteins linked to neurodegenerative diseases. **Scientific Reports**, p.1-8, 2017.

KALZAR, H.K.; SIRAJUDDIN; SHERAZI, S.T.H.; KHASKHELI, A.R.; HALLAM, K.R.; SCOTT, T.B.; TAGAR, Z.A.; HASSAN, S.S.; SOOMRO, R.A. Fabrication of small l-threonine capped nickel nanoparticles and their catalytic application. **Applied Catalysis A: General**. V. 453, p. 54-59, 2013.

KAN, M. V.; ISHTIKHAR, M.; RABBANI, G.; ZAMAN, M.; ABDELHAMEED, A. S.; KHAN, R. H. Polyols (Glycerol and Ethylene glycol) mediated amorphous aggregate inhibition and secondary structure restoration of metalloproteinase-conalbumin (ovotransferrin). **International Journal of Biological Macromolecules**, v.94, p. 290-300, 2017.

KANG, C.; WU, H.L.; XIANG, S. X.; XIE, L. X.; LIU, Y. J.; YU, Y. J.; SUN, J. J.; YU, R. Q. Simultaneous determination of aromatic amino acids in different systems using three-way calibration based on the PARAFAC-ALS algorithm coupled with EEM fluorescence: exploration of second-order advantages. **Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 6358-6368, 2014.

KAROUI, R.; BLECKER, C. Fluorescence spectroscopy measurement for quality assessment of food systems - a Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 364-386, 2010.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, p. 119-139, 2005.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the Investigation of protein structure and function. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1 (4), p. 349-384, 2000.

KERWIN, B. A.; HELLER, M. C.; LEVIN, S. H.; RANDOLPH, T. W. Effects of tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long-term storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  of a recombinant hemoglobin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87 (9), p.1062-1068, 1998.

KHAN, J. M.; ABDULREHMAN, S. A.; ZAIDI, F. K.; GOURINATH, S.; KHAN, R. H. Hydrophobicity alone can not trigger aggregation in protonated mammalian serum albumins. **Royal Society of Chemistry**, v. 16, p. 5150-5161, 2014.

KHURANA, R.; COLEMAN, C.; IONESCU-ZANETTI, C.; CARTER, S. A.; KRISHNA, V.; GROVER, R. K.; ROY, R.; SINGH, S. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. **Journal of Structural Biology**, v. 151 (3), p. 229-238, 2005.

KHURANA, R.; UVERSKY, V. N.; NIELSEN, L.; FINK, A. L. Is Congo red an amyloid-specific dye?. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276 (22), p. 22715-22721, 2001.

KIM, C.; SAVIZKY, R. M. A fluorescence quenching study of the human serum albumin-querceetin complex by addition of Cu (II), Ni (II) and Mn (II). **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 4 (2), p. 755-795, 2013.

KING, T. P. Limited pepsin digestion of bovine plasma albumin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 156, Issue 2, p. 509-520, 1973.

KLUNK, W. E.; PETTEGREW, J. W.; ABRAHAM, D. J. Quantitative evaluation of Congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 37 (8), p. 1273-1281, 1989.



KOZLOWSKI, H.; KLOS, A. J.; BRASUN, J.; GAGGELLI, E.; VALENSIN, D.; VALENSIN, G. Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 2665-2685, 2009.

KREBS, M. R. H; BROMLEY, E. H. C.; DONALD, A. M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. **Journal of Structural Biology**, v. 149 (1) p. 30-37, 2005.

LAI, Z.; COLÓN, W.; KELLY, J. W. The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid. **Biochemistry**, v. 35 (20), p. 6470-6482, 1996.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence Spectroscopy**. 3<sup>rd</sup> Edition, Springer Science Business Media, New York, cap. 1, 3, 8 e 16, 2010.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence Spectroscopy**. 2<sup>nd</sup> Edition, Springer Science Business Media, Baltimore, Maryland, cap. 1, 2, 8, 9, 13 e 16, 1999.

LAMMERS, I.; LHIAUBET-VALLET, V.; ARIESE, F.; MIRANDA, M. A.; GOOIJER, C. Binding of naproxen enantiomers to human serum albumin studied by fluorescence and room-temperature phosphorescence. **Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc**, v.105, p. 67–73, 2013.

LARSSON, T.; WEDBORG, M.; TURNER, D. Correction of inner-filter effect in fluorescence excitation-emission matrix spectrometry using Raman scatter. **Analytica Chimica Acta**, v. 583 (2), p. 357-363, 2007.

LI, D.; ZHU, M.; XU, C.; JI, B. Characterization of the baicalein–bovine serum albumin complex without or with Cu<sup>2+</sup> or Fe<sup>3+</sup> by spectroscopic approaches. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 588-599, 2011.

LI, Y.; WANG, Y.; WANG, A.; LU, S.; ZHOU, L.; ZHOU, J.; LIN, Y.; WEI, S. Spectroscopic study on the interaction of bovine serum albumin with zinc(II) phthalocyanine. **The Journal**

of **Biological and Chemical Luminescence**, p. 1-8, 2015.

LI, Z. M.; WEI, C. W.; ZHANG, Y.; WANG, D. S.; LIU, Y. N. Investigation of competitive binding of ibuprofen and salicylic acid with serum albumin by affinity capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci**, v. 879, p.1934–1938, 2011.

LING, I.; TAHA, M.; AL-SHARJI, N. A.; ABOU-ZIED, O. K. Selective binding of pyrene in subdomain IB of human serum albumin: Combining energy transfer spectroscopy and molecular modelling to understand protein binding flexibility. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.194, p. 36-44, 2018.

LIU, Y.; CHEN, M.; JIANG, L.; SONG, L. Stereoselective interaction of cinchona alkaloid isomers with bovine serum albumin. **Food Chemistry**, v. 181, p. 170-178, 2015.

LOVEDAY, S. M.; WANG, X. L.; RAO, M. A.; ANEMA, S. G.; SINGH, H.  $\beta$ -Lactoglobulin nanofibrils: Effect of temperature on fibril formation kinetics, fibril morphology and the rheological properties of fibril dispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 27 (1), p. 242-249, 2012.

LU, N.; YANG, Q.; LI, J.; TIAN, R.; PENG, Y. Y. Inhibitory effect of human serum albumin on Cu-induced A $\beta$ 40 aggregation and toxicity. **European Journal of Pharmacology**, v. 767, p. 160-164, 2015.

MACIAZEK-JURCZYK, M.; SUŁKOWSKA, A.; BOJKO, B.; RÓWNICKA-ZUBIK, J.; SUŁKOWSKI, W. W. A spectroscopic study of phenylbutazone and aspirin bound to serum albumin in rheumatoid diseases, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*, v. 82, p. 181–190, 2011.

MAES, V.; ENGELBORGHES, Y.; HOEBEKE, J.; MARAS, Y.; VERCRUYSSSE, A. Fluorimetric analysis of the binding of warfarin to human serum albumin. **Molecular Pharmacology**, v. 21, p. 100-107, 1981.

MALEKI, S.; MADRAKIAN, T.; AFKHAMI, A. Application of polyacrylonitrile nanofibers decorated with magnetic carbon dots as a resonance light scattering sensor to determine famotidine. **Talanta**, v. 181, p. 286-295, 2018.

MALTSEV, A. S.; GRISHAEV, A.; BAX, A. Monomeric  $\alpha$ -synuclein binds Congo red micelles in a disordered manner. **Biochemistry**, v. 51 (2), p. 631-642, 2012.

MARCON, G.; PLAKOUTSI, G.; CHITI, F. Protein aggregation starting from the native globular state. **Methods in Enzymology**, v. 413, p. 75-91, 2006.

MARIN, M.; GIMENO, C.; GINER, R. M.; RIOS, J. L.; MANEZ, S.; RECIO, M. C. Influence of dimerization of apocynin on its effects in experimental colitis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 1-29, 2017.

MARTINEZ, R. G.; CARACENI, P.; BERNARDI, M.; GINES, P.; ARROYO, V.; JALAN, R. Albumin: Pathophysiologic basis of its role in the treatment of cirrhosis and its complications. **Hepatology: Official Journal of the American Association for the Study of Liver Diseases**, v. 58, n. 05, p. 1836-1846, 2013.

MATEI, I. ; IONESCU, S.; HILLEBRAND, M. Induced chirality in fisetin upon binding to serum albumin: experimental circular dichroism and TDDFT calculations. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18(9), p. 4381-4387 , 2012.

MEJIA, L. M. B.; ALVARADO, M. R. Systemic Amiloidoses. **Annu Ver Biochen**, v. 82, p. 745-774, 2013.

MENG, X.; ZHANG, H.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr Comput Aided Drug Des**, v. 7 (2), p. 146-157, 2011.

MICHNIK, A.; MICHALIK, K.; KLUCZEWSKA, A.; DRZAZGA, S. Comparative dsc study of human and bovine serum albumin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.84, p. 113-117, 2006.

MICSONAI, A.; WIEN, F.; KERNYA, L.; LEE, Y. H.; GOTO, Y.; REFREGIERS, M.; KARDOS, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **PNAS Early Edition**, P. 1-9, 2015.

MIKAMI, K.; KATAOKA, S.; AIKAWA, K. Tropos or atropos nature of rhodium complexes bearing a tetrakis(phosphanyl)terphenyl ligand: Highly enantioselective catalysis of ene-type cyclization. **Organic Letters**, v. 7 (26), p. 5777-5780, 2005.

MIKAMI, K.; YUSA, Y.; AIKAWA, K.; HATANO, M. Molecular design of DABNTf as a highly efficient resolving reagent for racemic Pd complex with tropos biphenylphosphine (BIPHEP) ligand: Circular dichroism (CD) spectra of enantiopure BIPHEP-Pd complex. **Chirality**, v. 15, p. 105-107, 2003.

MORENO, F.; JIMÉNEZ, J. G. Binding of the Promen fluorescent probe to human serum albumin: A fluorescence spectroscopic study. **Chemico Biological Interactions**, v. 121, p. 237-252, 1999.

MOVAGHATI, S.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; KHODAGHOLI, F.; DIGALEH, H.; KACHOOEI, E.; SHEIBANI, N. Sodium dodecyl sulphate modulates the fibrillation of human serum albumin in a dose-dependent manner and impacts the PC12 cells retraction. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 341-349, out/ 2014.

MUKHERJEE, A.; MORALES-SCHEIHING, D.; BUTLER, P. C; SOTO, C. Type 2 Diabetes as a Protein Misfolding Disease. **Trends Mol Med**, v. 21(7), p. 439-449, 2016.

MUKHERJEE, A.; SOTO, C.; Prion-Like Protein Aggregates and Type 2 Diabetes. **Cold Spring Harbor Perspective in Medicine**, a024315, p.1-13, 2017.

NAGARAJAN, D.; DEKA, G.; RAO, M. Design of symmetric TIM barrel proteins from first principles. **BMC Biochemistry**, V.16:18, p.1-22, 2015.

NAKAMURA, M.; SHISHIDO, N.; NUNOMURA, A.; SMITH, M. A.; PERRY, G.; HAYASHI, Y.; NAKAYAMA, K.; HAYASHI, T. Three histidine residues of amyloid- $\beta$  peptide control the redox activity of copper and iron. **Biochemistry**, v. 46(44), p. 12737-12743, 2007.

NAKASHIMA, F.; SHIBATA, T.; KAMIYA, K.; YOSHITAKE, J.; KIKUCHI, R.; MATSUSHITA, T.; ISHII, I.; GIMÉNEZ-BASTIDA, J. A.; SCHNEIDER, C.; UCHIDA, K. Structural and functional insights into S-thiolation of human serum albumins. **Scientific Reports**, v.932, p. 1-12, 2018.

NOZAKI, A.; KIMURA, T.; ITO, H.; HATANO, T. Interaction of polyphenolic metabolites with human serum albumin: A circular dichroism study. **Chem Pharm Bull**, v. 57 (9), p. 1019-1023, 2009.

NUSRAT, S.; SIDDIQI, M. K.; ZAMAN, M.; ZAIDI, N.; AJMAL, M. R.; ALAM, P.; QADEER, A.; ABDELHAMEED, A. S. A.; KHAN, R. H. A Comprehensive spectroscopic and computational investigation to probe the interaction of antineoplastic drug nordihydroguaiaretic acid with serum albumins. **Plos One**, v.11 (10), e0158833, 2016.

OETTL, K.; BIRNER-GRUENBERGER, R.; SPINDELBOECK, W.; STUEGER, H. P.; DORN, L.; STADLBAUER, V.; PUTZ-BANKUTI, C.; KRISPER, P.; GRAZIADEI, I.; VOGEL, W.; LACKNER, C.; STAUBER, R. E. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: Relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. **Journal of Hepatology**, v. 59 (5), p. 978-983, 2013.

OHNO, T. Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification Index of dissolved organic matter. **Environmental Science & Technology**, v. 36 (4), p. 742-746, 2002.

OLSSON, T. S. G.; WILLIAMS, M. A.; PITT, W. R.; LADBURY, J. E. The thermodynamics of protein–ligand interaction and solvation: Insights for ligand design. **Journal of Molecular Biology**, v. 384, p. 1002-1017, 2008.

OLESZKO, A.; HARTWICH, J.; GLOGOWSKA, M.G.; J ANUS, S. O. Changes of albumin secondary structure after palmitic acid binding. FT-IR spectroscopic study. **Acta of Bioengineering and Biomechanics**, v. 20, p. 1-6 , 2018.

OMARY, M. A.; PATTERSON, H. H. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**. 3<sup>rd</sup> Edition, Elsevier Ltd, Orono, USA, Pages 636–653, 2017.

PAGADALA, N. J.; SYED, K. TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Bio-physical Reviews**, v. 9 (2), p. 91-102, 2017.

PAN, Z.; PENG, J.; CHEN, Y.; ZANG, X.; PENG, H.; BU, L.; XIAO, H.; HE, Y.; CHEN, F.; CHEN, Y. . Simultaneous determination of five fluoroquinolones by the selective high

performance liquid chromatography associating with sensitive resonance light scattering and mechanism study. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 71-79, 2018.

PATRA, D.; MISHRA, A. K. Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21 (12), p. 787-798, 2002.

PAUL, B. K.; RAY, D.; GUCHHAIT, N. Unraveling the binding interaction and kinetics of a prospective anti-HIV drug with a model transport protein: results and challenges. **RSCPublishing**, v. 15, p. 1275-1287, 2013.

PAULA, H. M. C.; COELHO, Y. L.; AGUDELO, A. J. P.; REZENDE, J. P.; FERREIRA, G. M. D.; FERREIRA, G. M. D.; PIRES, A. C. S.; SILVA, L. H. M. Kinetics and thermodynamics of bovine serum albumin interactions with Congo red dye. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 737-742, 2017.

PETERS JR,T. All About Albumin. **Biochemistry Genetics and Medical Applications**, p. 1-432, 1995.

PETRÔNIO, M.S.; XIMENES, V.F. Inhibition of lysozyme by taurine dibromamine **Protein & Peptide Letters**, v.20, p. 1232–1237, 2013.

PIS, L.; MAJEK, P.; SADECKÁ, J. Synchronous fluorescence spectroscopy for differentiating between brandies and wine distillates. **Acta Chimica Slovaca**, v. 4 (1), p. 47-58, 2011.

PISTOLOZZI, M.; BERTUCCI, C. Species-dependent stereoselective drug binding to albumin: A circular dichroism Study. **Inter Science**, v. 20 (3-4), p. 552-558, 2008.

POOR, M.; LI, Y.; MATISZ, G.; KISS, L.; MATE, S. K.; KOSZEGI, T. Quantitation of species differences in albumin–ligand interactions for bovine, human and rat serum albumins using fluorescence spectroscopy: A test case with some Sudlow's site I ligands. **Journal of Luminescence**, v. 145, p. 767-773, 2014.

PUYALTO, X. Z.; VIDAL, X.; TERRIZA, G. M. Angular momentum-induced circular dichroism in non-chiral nanostructures. **Nature Communications**, v. 5, p. 1-7, 2014.

Qian, Q.; You, Z.; Ye, L.; Che, J.; Wang, Y.; Wang, S.; Zhong, B. High-efficiency production of human serum albumin in the posterior silk glands of transgenic silkworms, *Bombyx mori* L. **PLOS ONE**, v.13, e0191507, 2018.

RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. interaction of melittin with membrane cholesterol: A fluorescence approach. **Biophysical Journal**, v. 87 (4), p. 2419-2432, 2004.

RAHMAN, M. M.; RAHMAN, M. H. RAHMAN, N. N. Competitive binding of ibuprofen and naproxen to bovine serum albumin: Modified form of drug–drug displacement interaction at the binding site. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 43-47, 2005.

RAO, C. M. Synchronous scan fluorescence spectroscopy of proteins and human eye lenses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 176 (3), p. 1351-1357, 1991.

RAZA, M.; JIANG, Y.; WEI, Y.; AHMAD, A.; KHAN, A.; QIPENG, Y. Insights from spectroscopic and in-silico techniques for the exploitation of biomolecular interactions between human serum albumin and paromomycin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, V.157, p. 242-253, 2017.

REICHHARDT, C.; JACOBSON, A. N.; MAHER, M. C.; UANG, J.; MCCRATE, O. A.; ECKART, M.; CEGELSKI, L. Congo Red Interactions with Curli-Producing *E. coli* and Native Curli Amyloid Fibers. **Plos One**, V. 10(10): e0140388, 2015.

ROMHANYI, G. Selective differentiation between amyloid and connective tissue structures based on the collagen specific topooptical staining reaction with Congo red. **Virchows Arch Abt. A Path. Anat.** v. 354, p. 209–222, 1971.

ROSS, P.D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v.11, n.20, p.3096-3102, 1981.

SAGUER, E.; ALVAREZ, P. A.; SEDMAN, J.; ISMAIL, A. A. Study of the denaturation/aggregation behaviour of whole porcine plasma and its protein fractions during heating under acidic pH by variable-temperature FTIR spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 402-414, 2013.

SANCATALDO, G.; VETRI, V.; FODERA, V.; DI CARA, G.; MILITELLO, V.; LEONE, M. Oxidation enhances human serum albumin thermal stability and changes the routes of amyloid fibril formation. **PLoS One**, v. 9, e84552, 2014.

SARCIAUX, J. M.; MANSOUR, S.; HAGEMAN, M. J.; NAIL, S. L. Effects of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88 (12), p. 1354-1361, 1999.

SCHENFELD, E. M.; RIBONE, S. R.; QUEVEDO, M. A. Stability and plasmatic protein binding of novel zidovudine prodrugs: Targeting site ii of human serum albumin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 1-26, 2018.

SHAFAEI, Z.; ABAZARI, O.; DIVSALAR, A.; GHALANDARI, B.; POURSOLEIMAN, A.; SABOURY, A. A.; AHMAD, F. Effect of a synthesized amy1-glycine1, 10-phenanthroline platinum nitrate on structure and stability of human blood carrier protein, albumin: Spectroscopic and modeling approaches. **Journal of Fluorescence**, p. 1-10, 2017.

SHAHABADI, N.; HADIDI, S.; FEIZI, F. Study on the interaction of antiviral drug 'Tenofovir' with human serum albumin by spectral and molecular modeling methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 138, p. 169-175, 2015.

SHAHZAD, A.; EDETSBERGER, M.; KOEHLER, G. Fluorescence spectroscopy: An emerging excellent diagnostic tool in medical sciences. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, p. 1–11, 2010.

SIDDIQI, M. K.; ALAM, P.; CHATURVEDI, S. K.; NUSRAT, S.; AJMAL, M. R.; ABDELHAMEED, A. S.; KHAN, R. H. Probing the interaction of cephalosporin antibiotic–ceftazidime with human serum albumin: A biophysical investigation. **International Journal of Biological Macromolecules**, p.1-8, 2017.

SILVA, J. L.; VIEIRA, T. C. R. G.; GOMES, M. P. B.; BOM, A. P. A.; LIMA, L. M. T. R.; FREITAS. M. S.; ISHIMARU, D.; CORDEIRO, Y.; FOGUEL, D. Ligand binding and hydration in protein misfolding: Insights from studies of prion and p53 tumor suppressor proteins. **ACCOUNTS of Chemical Research**, v. 43 (2), p. 271-279, 2010.



SILVERMAN, R. B.; HOLLADAY, M. W. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**. 3<sup>rd</sup> Edition, Academic Press, chapter 3, Pages 123–163, 2014.

SJÖHOLM, I.; EKMAN, B.; KOBER, A.; PAHLMAN, I. L.; SEIVING, B.; SJÖDIN, T. Binding of drugs to human serum albumin: XI. **Molecular Pharmacology**, v. 16, p. 767-777, 1979.

SOARES, D. **Estudo da interação entre porfirinas e eumelanina sintética**. 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SONO, D.; CAMERON, J.; EVANS, L. R. Albumin as a versatile platform for drug half-life extension. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830 (12), p. 5.526-5.534, 2013.

SPEED, M. A.; KING, J.; WANG, D. I. C. Polymerization Mechanism of Polypeptide Chain Aggregation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54 (4), p. 333–343, 1997.

STEENSMA, D. P. "Congo" red: Out of Africa?. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Rochester, MN, v. 125, p. 250-252, 2001.

STIRPE, A.; PANTUSA, M.; RIZZUTI, B.; SPORTELLI, L.; BARTUCCI, R.; GUZZI, R. Early stage aggregation of human serum albumin in the presence of metal ions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49 (3), p. 337-342, 2011.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D.J.; WADE, D.N. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. **Mol Pharmacol**, v. 12 (06), p. 1052-1061, 1976.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D.J.; WADE, D.N. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. **Mol Pharmacol**, v. 11 (06), p. 824-832, 1975.

SUGA, N.; MIURA, N.; KITAGAWA, W.; MORITA, H.; BANNO, S.; IMAI, H. Differential diagnosis of localized and systemic amyloidosis based on coagulation and fibrinolysis parameters. **Amyloid**, v. 19(20), P. 61-65, 2012.

SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIZUKI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Engineering**, v. 12 (6), p. 439-446, 1999.

SUN, C.; YANG, J.; WU, X.; HUANG, X.; WANG, F.; LIU, S.; Unfolding and refolding of bovine serum albumin induced by cetylpyridinium bromide. **Biophysical Journal**, v. 88, p. 3518-3524, 2005.

SUNDE, M.; SERPELL, L. C.; BARTLAM, M.; FRASER, P. E.; PEPYS, M. B.; BLAKE, C. C. F. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. **Journal of Molecular Biology**, v. 273 (3), p. 729-739, 1997.

SURYAWANSHI, V.D.; WALEKAR, L. S.; GORE, A.H.; ANBHULE, P.V.; KOLEKAR, G.B. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 56-63, 2016.

TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 43, p. 777-780, 1982.

TIAN, J.; LIU, J.; HU, Z.; CHEN, X. Interaction of wogonin with bovine serum albumin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4124-4129, 2005.

TIMERBAEV, A. R.; HARTINGER, C. G.; ALEKSENKO, S. S.; KEPPLER, B. K. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: Advances in characterization using modern analytical methodology. **Chemical Reviews**, v. 106, p. 2224-2248, 2006.

UVERSKY, V.; FINK, A. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics**, v. 1698 (2), p. 131-153, 2004.

VACHON, J.; RENTSCH, S.; MARTINEZ, A.; MARSOL, C.; LACOUR, J. On the enantioselective olefin epoxidation by doubly bridged biphenyl azepine derivatives – mixed tropo/atropo chiral biaryls. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 501-506, 2007.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence Principles and Applications**. Wiley – VCH Verlag

GmbH, USA, Cap. 3 e 4, 2001.

VASCONCELOS, D. N.; XIMENES, V. F. Albumin-induced circular dichroism in Congo red: Applications for studies of amyloid-like fibril aggregates and binding sites, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p.321–330, 2015.

VAYÁ, I.; VALLET, V. L.; JIMÉNEZ, M. C.; MIRANDA, M. A. Photoactive assemblies of organic compounds and biomolecules: drug–protein supramolecular systems. **Royal Society of Chemistry**, v. 43, p. 4102-4122, 2014.

VENTURINI, D.; SOUZA, A. R.; CARACELLI, I.; MORGON, N. R.; FILHO, L. C. S.; XIMENES, V. F. Induction of axial chirality in divanillin by interaction with bovine serum albumin. **Plos One**, v. 12(6), 2017.

WALLACE, B. A.; LEES, J. G.; ORRY, A. J. W.; LOBLEY, A.; JANES, R. W. Analyses of circular dichroism spectra of membrane proteins. **Protein Science**, v. 12(4), p. 875-884, 2003.

WANG, C.; YANG, G.; ZHUANG, J.; ZHANG, W. From tropos to atropis: 5,5'-bridged 2,2'-bis(diphenylphosphino)biphenyls as chiral ligands for highly enantioselective palladium-catalyzed hydrogenation of  $\alpha$ -phthalimide ketones. **Tetrahedron Letters**, v. 51 (15), p. 2044-2047, 2010.

WANG, Q.; HUANG, X.; FU, X.; DENG, H.; MA, M.; CAI, Z. A sensitive and selective resonance Rayleigh scattering method for quick detection of avidin using affinity labeling Au nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.162, p. 75-80, 2016.

WANG, W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 1-30, 2005.

WANG, Y.; LUO, Z.; SHI, X.; WANG, H.; NIE, L.; HUANG, M. A fluorescent fatty acid probe, DAUDA, selectively displaces two myristates bound in human serum albumin. **Protein Science**, v. 20 (12), p. 2095-2101, 2011.

WOOD, S. J.; WYPYCH, J.; STEAVENSON, S.; LOUIS, J. C.; CITRON, M.; BIERE, A. L.  $\alpha$ -Synuclein Fibrillogenesis Is Nucleation-dependent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274 (28), p. 19509-19512, 1999.

WOODY, A. Y. M.; REISBIG, R. R.; WOODY, R. W. spectroscopic studies of congo red binding to RNA polymerase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 655, p. 82-88, 1981.

WU, C.; SCOTT, J.; SHEA, J. E. Binding of Congo Red to Amyloid Protofibrils Of the Alzheimer A $\beta$ 9–40 Peptide Probed by Molecular Dynamics Simulations. **Biophysical Journal**, v. 103 (3), p. 550-557, 2012.

XIE, B.; LI, X.; DONG, X.; SUN, Y. Insight into the Inhibition effect of acidulated serum albumin on amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis and cytotoxicity. **Langmuir**, v. 30 (32), p. 9789-9796, 2014.

XIMENES, V. F.; PADOVAN, C. Z.; CARVALHO, D. A.; FERNANDES, J. R. Oxidation of melatonin by taurine chloramine. **J. Pineal Res**, v. 49, p. 115-122, 2010.

XU, Y.; LIU, Q.; LI, X.; WESEMIOTIS, C.; PANG, Y. A zwitterionic squaraine dye with a large Stokes shift for in vivo and site-selective protein sensing. **Chemistry Communication**, v. 48, p. 11313-11315, 2012.

YADAVA, U. Search algorithms and scoring methods in proteinligand docking. **Endocrinology & Metabolism International Journal**, v. 6, p.359-367, 2018.

YAMASAKI, K.; HYODO, S.; TAGUCHI, K.; NISHI, K.; YAMAOTSU, N.; HIRONO, S.; CHUANG, V. T. G.; SEO, H.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. Long chain fatty acids alter the interactive binding of ligands to the two principal drug binding sites of human serum albumin. **Plos One**, 0180404, 2017.

YAMASAKI, K.;CHUANG, V. T. G.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. Albumin–drug interaction and its clinical implication. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830 (12) p. 5.435-5.443, 2013.

YANG, F.; ZHANG, Y.; LIANG. H. Interactive association of drugs binding to human serum

albumin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 3580-3595, 2014.

YARI, A.; SAEIDIKHAH, M. Ultra-trace electrochemical impedance determination of bovine serum albumin by a two dimensional silica network citrate-capped gold nanoparticles modified gold electrode. **Talanta**, p. 1-19, 2015.

YEGGONI, D. P.; GOKARA, M.; MANIDHAR, D. M.; RACHAMALLU, A.; NAKKA, S.; REDDY, C. S.; SUBRAMANYAM, R. Binding and Molecular Dynamics Studies of 7-Hydroxycoumarin Derivatives with Human Serum Albumin and its Pharmacological Importance. **Molecular Pharmaceutics**, p.1-53, 2014.

YEMIS, G. P.; PAGOTTO, F.; BACH, S.; DELAQUIS, P. Effect of Vanillin, Ethyl Vanillin, and Vanillic Acid on the Growth. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 12, p.2062-2069, 2011.

YOON, J. H.; PARK, J. E.; HONG, S. B.; SUH, D. Y.; HONG, S. B.; KO, S. J.; KIM, S. H. Comparison of Dyes for Easy Detection of Extracellular Cellulases in Fungi. **Mycrobiology**, v. 35 (1), p. 21-24, 2007.

ZHANG, H.; ROCHET, J. C.; STANCIU, L. A. Cu(II) promotes amyloid pore formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 464, p. 342-347, 2015.

ZHANG, M. Z.; WEN, J.; ARAKAWA, T.; PRESTRELSKI, S. J. A new strategy for enhancing the stability of lyophilized protein: The effect of the reconstitution medium on keratinocyte growth factor. **Pharmaceutical Research**, v. 12 (10), p. 1447-1452, 1995.

ZHANG, Y. Z.; XIANG, X.; MEI, P.; DAI, J.; ZHANG, L. L.; LIU, Y. Spectroscopic studies on the interaction of Congo Red with bovine serum albumin. **Journal Homepage**, p. 907-914, Part A, 72 (2009), 2008.

ZHU, M.; WANG, L.; WANG, Y.; ZHOU, J.; DING, J.; LI, W.; XIN, Y.; FAN, S.; WANG, Z.; WANG, Y. Biinteractions of herbicide atrazine with human serum albumin: UV-Vis, fluorescence and circular dichroism approaches. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15(1), p. 1-16, 2018.

ZSILA, F.; BIKADI, Z.; SIMONYI, M. Circular dichroism spectroscopic studies reveal Ph

dependent binding of curcumin in the minor groove of natural and synthetic nucleic acids. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 2, p. 2902-2910, 2004.

ZSILA, F.; HAZAI, E.; SAWYER, L. Binding of the pepper alkaloid piperine to bovine  $\alpha$ -lactoglobulin: circular dichroism spectroscopy and molecular modeling study. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.26, n.53, p.10179-10185, 2005.