

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Materiais

Leonardo Almeida Barison

Elucidação do mecanismo de reação da sonda luminescente
AMPPD com a proteína albumina sérica humana.

Bauru-SP

2025

Leonardo Almeida Barison

Elucidação do mecanismo de reação da sonda luminescente
AMPPD com a proteína albumina sérica humana.

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

Bauru-SP

2025

B253e

Barison, Leonardo Almeida

Elucidação do mecanismo de reação da sonda luminescente
AMPPD com a proteína albumina sérica humana / Leonardo Almeida

Barison. -- Bauru, 2025

106 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências, Bauru

Orientador: Valdecir Farias Ximenes

1. AMPPD. 2. Albumina. 3. Fosfatase alcalina. 4.
Quimioluminescência. 5. Docagem molecular. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Bauru



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE LEONARDO ALMEIDA BARISON, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 25 dias do mês de abril do ano de 2025, às 14h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de LEONARDO ALMEIDA BARISON, intitulada **Elucidação do mecanismo de reação da sonda luminescente AMPPD com a proteína albumina sérica humana**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - Unesp/Câmpus de Bauru, Prof. Dr. RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, Profa. Dra. ANA PAULA RIBEIRO POVINELLI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Unesp/Câmpus de São José do Rio Preto, Prof. Dr. GABRIEL ZAZERI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Universidade Federal de Roraima (UFRR), Prof. Dr. FLAVIO JUNIOR CAIRES (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - Unesp/Câmpus de Bauru. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES

Documento assinado digitalmente
 VALDECIR FARIAS XIMENES
 Data: 25/04/2025 17:08:41-0300
 Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese à minha família, meu filho Joaquim de um ano e meio de idade, à minha esposa Lívia, minha mãe Cassia, meu pai José Alcides (em memória), à minha irmã Bárbara e ao meu sobrinho Gael.

AGRADECIMENTOS

Como e quem agradecer por uma jornada tão enriquecedora, desafiadora e prazerosa que me levou até a conclusão de meu doutorado? Difícil considerar apenas o período de desenvolvimento deste título, esta jornada começa para mim quando entrei na graduação de licenciatura em química na Unesp no ano de 2004, e já se foram até então 21 anos, mais da metade de meus 41 anos de vida. A princípio considerava apenas um meio para alcançar uma profissão, ao longo do tempo descobri que era para mim uma forma de enxergar e compreender a vida, a busca de conhecimento, e estar presente no desenvolvimento da ciência se tornou um prazer para mim, tanto que este último ciclo foi todo feito sem receber nenhum tipo de recurso financeiro do meio acadêmico.

No momento me encontro em um período de grandes mudanças com o nascimento de meu filho Joaquim em 2023, estou mudando de área de atuação profissional, deixando a educação para me aventurar em novos horizontes, provavelmente na engenharia química, porém, não sei como, mas não pretendo deixar a pesquisa.

Portanto, gostaria de agradecer inicialmente as agências de fomento à pesquisa, CNPq, FAPESP e CAPES, que sem elas seria improvável a pesquisa no Brasil, gostaria de agradecer em ordem cronológica aos meus orientadores, Paulo Noronha Lisboa Filho e Dayse Iara dos Santos, meus orientadores de iniciação científica da Unesp Bauru, Luiz Henrique Catalani, orientador de meu mestrado da USP São Paulo, Marcelo Telascrêa, meu orientador de TCC da Universidade do Sagrado Coração, onde fiz meu bacharelado em engenharia química, Adalgiza Fornaro, minha orientadora de doutorado do IAG da USP São Paulo, que infelizmente não dei continuidade, e que fez parte de um momento da minha vida que entrei novamente na graduação na Unesp no curso de meteorologia, fiz alguns anos do curso mas acabei trancando, tal empreitada foi realizada devido a um gosto que tenho pela meteorologia desde 2004, que ainda venho acompanhando, porém fora da área acadêmica.

Gostaria de agradecer ao meu atual orientador Valdecir Farias Ximenes, que foi meu professor na graduação, e na pós-graduação, neste meu retorno a universidade descobri assistindo a suas aulas que meu modo de dar aula se assemelha muito ao dele, me mostrando que de forma inconsciente ele foi muito importante para minha formação e sou muito grato a ele por isso, mas as coincidências não param por aí, quando entrei na engenharia acabei estudando na mesma sala de seu filho Thomas Ximenes, e que

recentemente teve sua filha, muito próximo ao nascimento de meu filho. Muito obrigado Professor, o senhor foi o orientador mais dedicado que eu já tive.

Gostaria de agradecer também a outras pessoas que tornaram a jornada mais fácil para mim, dedicando seu tempo a me ajudar durante as pesquisas, Luiza de Carvalho Bertozo, orientanda do professor Valdecir, que me ajudou muito no meu retorno ao laboratório após um grande hiato de tempo das pesquisas, Maurício Ikeda Yoguim, também orientando do professor Valdecir, que me ajudou com os estudos de docking computacional; no meu mestrado, Vânia Aparecida Blasques Bueno, na época orientanda do professor Catalini, que me ajudou muito na operação dos equipamentos que até então não conhecia.

Gostaria de agradecer aos nossos colaboradores desta pesquisa, os professores, Aguinaldo Robinson de Souza, que foi meu Professor na graduação na Unesp, e ao Professor Nelson Henrique Morgon, da Unicamp, ambos colaboraram com os estudos quânticos computacionais para validação dos resultados dos estudos práticos.

RESUMO

Compostos quimioluminescentes pertencem a um grupo restrito de moléculas que possuem a capacidade de emitir luz após uma reação química. Neste campo, destacam-se aquelas cujo mecanismo para geração de estados excitados envolvem a clivagem de peróxidos cíclicos conhecidos como dioxetanos. Uma destas moléculas é o 3-(2'-espiroadamantil)-4-metoxi-4-(3''-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxetano (AMPPD), que devido a sua estabilidade e disparo controlado de emissão pela enzima fosfatase alcalina (ALP), é utilizado em larga escala em sistemas automatizados em laboratórios clínicos para detecção de hormônio, análise imunológicas entre outras. Em análises deste tipo, o AMPPD poderia entrar em contato com a albumina de soro humano (HSA), que é proteína mais abundante do plasma sanguíneo. Considerando a alta capacidade de ligação da HSA, pode-se esperar sua interação com o AMPPD, o que poderia interferir nas determinações quimioluminescentes que utilizam o AMPPD. Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar e elucidar a interação entre o AMPPD e a proteína HSA e determinar possíveis efeitos na performance de emissão de luz na presença da enzima ALP. Descobriu-se que a emissão de luz do sistema AMPPD/ALP é significativamente afetado pela presença de HSA, tendo sua emissão de luz aumentada em cerca de 100 vezes. Este efeito foi elucidado estudando a eficiência de ligação entre o AMPPD e a HSA que resultou em uma constante de ligação de $1.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Por meio de marcadores de sítio de ligação, verificou-se que a interação se dá preferencialmente no sítio I da HSA. Estudos de docagem molecular corroboraram este achado. Os estudos indicaram ainda que após hidrólise pela ALP, o AMPPD desfosforilado se difunde para a HSA, onde encontra um microambiente que favorece o aumento do rendimento quântico de emissão de fluorescência da espécie gerada pela clivagem do AMPPD (metil-meta-oxibenzoato), o que explica o efeito da HSA na emissão de luz. Verificou-se também que a albumina de soro bovino (BSA) não tem a mesma eficiência na amplificação da emissão de luz, o que reforça uma interação específica com a HSA. Estudos realizados na presença da sonda fluorescente coumarina-153 evidenciou a transferência de energia de ressonância (RET) do éster excitado metil-meta-oxibenzoato para a coumarina-153. Este achado reforçou as evidências de que ambos estavam complexados a HSA. Em conclusão, estes resultados inéditos sobre o efeito de albumina no sistema AMPPD/ALP poderão ser úteis para a aplicação desse sistema quimioluminescente em análises clínicas e para pesquisadores que trabalham no desenvolvimento de novos sistemas quimioluminescentes.

Palavras-chave: AMPPD, Albumina, Fosfatase Alcalina, Quimioluminescência, Docking Molecular, Fluorescência, RET.

ABSTRACT

Chemiluminescent compounds belong to a restricted group of molecules that can emit light after a chemical reaction. In this field, those whose mechanism for generating excited states involves the cleavage of cyclic peroxides known as dioxetanes stand out. One of these molecules is 3-(2'-spiroadamantyl)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetane (AMPPD), which, due to its stability and controlled emission triggering by the enzyme alkaline phosphatase (ALP), is widely used in automated systems in clinical laboratories for hormone detection, immunological analysis, among others. In analyses of this type, AMPPD could come into contact with human serum albumin (HSA), which is the most abundant protein in blood plasma. Considering the high binding capacity of HSA, its interaction with AMPPD can be expected, which could interfere in chemiluminescent determinations that use AMPPD. Therefore, this work aimed to evaluate and elucidate the interaction between AMPPD and the HSA protein and to determine possible effects on the light emission performance in the presence of the ALP enzyme. It was found that the light emission of the AMPPD/ALP system is significantly affected by the presence of HSA, with its light emission being increased by approximately 100 times. This effect was elucidated by studying the binding efficiency between AMPPD and HSA, which resulted in a binding constant of $1.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Through binding site markers, it was verified that the interaction occurs preferentially at site I of HSA. Molecular docking studies corroborated this finding. The studies also indicated that after hydrolysis by ALP, dephosphorylated AMPPD diffuses to HSA, where it encounters a microenvironment that favors an increase in the quantum yield of fluorescence emission of the species generated by AMPPD cleavage (methyl-meta-oxybenzoate), which explains the effect of HSA on light emission. It was also found that bovine serum albumin (BSA) does not have the same efficiency in amplifying light emission, reinforcing a specific interaction with HSA. Studies performed in the presence of the fluorescent probe coumarin-153 demonstrated resonance energy transfer (RET) from the excited ester methyl-meta-oxybenzoate to coumarin-153. This finding reinforced the evidence that both were complexed to HSA. In conclusion, these unprecedented results on the effect of albumin on the AMPPD/ALP system may be useful for the application of this chemiluminescent system in clinical analyses and for researchers working on the development of new chemiluminescent systems.

Keywords: AMPPD, Albumin, Alkaline Phosphatase, Chemiluminescence, Molecular Docking, Fluorescence, RET.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Decomposição térmica do 1,2-dioxetano resultando na formação do estado fundamental e excitado dos fragmentos de formaldeído, adaptado de (GUDEM e KOWALEWSKI, 2023).....	17
Figura 2. Mecanismo de quimiluminescência do AMPPD na presença do catalizador fosfatase alcalina (ALP), responsável pela desfosforilação do fluoróforo e subsequente clivagem do 1,2-dioxietano e decaimento radioativo, adaptado de (YUE e LIU, 2013).	20
Figura 3. Mecanismo de dois possíveis caminhos para clivagem do AMPPD dentro de uma cavidade, sítio ativo, de uma macromolécula, após a sua desfosforilação, adaptado de (YUE e LIU, 2013).	20
Figura 4. Estrutura tridimensional do ALP humana a partir das coordenadas cristalográficas. A estrutura é subdividida em dois domínios, cada qual evidenciado com uma cor, representados no formato de fitas, cada domínio possui três átomos metálicos, representados no formato de esferas, dois átomos de zinco e um de magnésio.....	21
Figura 5. Resumo dos sítios ativos da proteína HSA definida por cristalografia, três moléculas do fármaco Diflunisal cristalizadas junto à proteína, PDB: 2BXE, e os locais de interação de alguns fármacos em cada domínio da proteína HSA, adaptado de (GHUMAN, ZUNSZAIN, et al., 2005).	24
Figura 6. - Exemplos de medicamentos com propriedades fluorescentes	25
Figura 7. Fluorescência observada dentro de uma cubeta em um dos experimentos realizados em um fluorímetro utilizando moléculas dansiladas.....	26
Figura 8. Representação de um espectro de absorção e emissão de fluorescência, adaptado de (LAKOWICZ, 2006).....	26
Figura 9. Diagrama de Jablonski representando processos fotofísicos que podem ocorrer em uma molécula, as transições radioativas são representadas por linhas retas, e as	

transições não radioativas são representadas pelas linhas onduladas, adaptado de (ERNEST, 2011).	27
Figura 10. Regra da imagem espelhada e fatores de Franck-Condon, de um espectro de absorção e emissão de fluorescência, adaptado de (LAKOWICZ, 2006).	28
Figura 11. Diagrama de Jablonski mostrando o quenching colisional, e a transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET), adaptado de (LAKOWICZ, 2006). .	28
Figura 12. Sobreposição dos espectros de emissão de um fluoróforo doador com o espectro de absorção do aceptor (FRET), adaptado de (LAKOWICZ, 2006).	30
Figura 13. Representação das moléculas dansiladas, Dansil-L-Prolina e Dansil-Glutamina	33
Figura 14. Resumo gráfico da reação de clivagem do AMPPD e interação com HSA emitindo luz.	40
Figura 15. Emissão de luz da decomposição de AMPPD desencadeada por ALP. 3-metil benzoato (3-MB) é a espécie gerada no estado excitado [10].	43
Figura 16. Emissão dependente do tempo da hidrólise de AMPPD catalisada por ALP e o efeito de HSA. Condições experimentais: ALP 50 U/ml, AMPPD 6,25 μ M, HSA 5,0 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C.	49
Figura 17. Efeito do pH e da natureza do tampão na emissão de luz devido à hidrólise de AMPPD catalisada por ALP na presença de HSA. A) Constituição do tampão (50 mM) em pH fixo 9,0. B) Emissão de luz integrada usando tampão Tris (50 mM) e pH de 7,0 a 10,0. Condição experimental: HSA 5,0 μ M, ALP 50 U/mL, AMPPD 6,25 μ M, 37 °C. Os resultados são exibidos como a média e o desvio padrão de três experimentos replicados.	51
Figura 18. Efeito da concentração de AMPPD na emissão de luz. (A) Presença e (B) ausência de HSA. Condição experimental: HSA 5,0 μ M, ALP 50 U/mL, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C.	51
Figura 19. Efeito de HSA na emissão de luz devido à hidrólise de AMPPD catalisada por ALP. A) Emissão dependente do tempo e B) Emissão de luz integrada. Condições	

experimentais: ALP 50,0 U/ml, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C e HSA conforme indicado..... 52

Figura 20. Efeito das diferentes albuminas na emissão de luz devido à hidrólise de AMPPD catalisada por ALP. A) Emissão dependente do tempo e B) Integral da emissão de luz. Condições experimentais: ALP 50,0 U/mL, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C, e albuminas 5,0 μ M..... 53

Figura 21. Emissão de luz versus atividade ALP na presença e ausência de albumina. Condições experimentais: AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, HSA 5,0 μ M, BSA 5,0 μ M, 37°C. 54

Figura 22. O efeito de quenching da BSA na emissão de luz devido à hidrólise de AMPPD catalisada por ALP na presença de HSA. O esquema descreve a proposta para uma competição entre HSA e BSA para o AMPPD desfosforilado. Controle: HSA 5,0 μ M, ALP 100,0 U/ml, AMPPD desfosforilado. Controle: HSA 5,0 μ M, ALP 100,0 U/ml, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C. 55

Figura 23. Extinção da fluorescência da albumina devido à complexação com AMPPD e cálculo das constantes de Stern-Volmer e de associação. (A,B) Espectros de fluorescência da albumina e o efeito de extinção devido à adição de AMPPD. C) Gráfico de Stern-Volmer e D) curva isotérmica para cálculo das constantes de ligação. Veja as Equações 1-3 para detalhes. Condição experimental: HSA e BSA 5,0 μ M, AMPPD conforme indicado, Tris 50 mM, pH 7,0, 37°C..... 57

Figura 24. Determinação do sítio de ligação de AMPPD em HSA. (A, C) Deslocamento competitivo de dansil-glutamina (DGlu, sítio I) e (B, C) dansil-prolina (DPro, sítio II) de HSA. Condição experimental: HSA 20 μ M, DGlu 20 μ M, DPro 20 μ M e AMPPD conforme indicado, Tris 50 mM, pH 7,0, 37 °C. A excitação foi ajustada em 340 nm.. 58

Figura 25. Efeito da varfarina (WAR) e do ibuprofeno (IBP) na quimioluminescência aumentada por HSA de ALP/AMPPD. Controle: HSA 5,0 μ M, ALP 100 U/ml, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C. Quando presentes, WAR e IBP eram 250 μ M.... 59

Figura 26. Espectros de quimioluminescência do sistema AMPPD/ALP/HSA e controles. Sistema completo: ALP 100 U/ml, HSA 6,25 μ M, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C. 59

- Figura 27. Evidência de RET do éster excitado eletronicamente gerado pela decomposição de AMPPD em corantes fluorescentes. (A) O efeito da adição de C153 (5,0 μ M) ou DCM (5,0 μ M) ao sistema de reação completo consistiu em ALP 100 U/ml, HSA 6,25 μ M, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C. (B,C) Revogação da emissão de luz devido à falta dos componentes. 61
- Figura 28. Proposta de caminho para transferência de energia de 3 MB para C153 e DCM dentro do sítio I da HSA. 62
- Figura 29. Efeito do 1,4-dioxano (DIO) na eficiência de emissão de luz. Controle: ALP 100 U/ml, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C e DIO conforme indicado. ... 63
- Figura 30. Espectros de fluorescência de 3-MB complexado ou não com albuminas. 3-MB (25 μ M) dissolvido em Tris 50 mM, pH 9,0, na ausência ou presença de HSA ou BSA (25 μ M). 64
- Figura 31. (A) Efeito dependente da concentração de HSA na fluorescência de 3-MB e (B) comparação com o isômero 4-MB. 3-MB e 4-MB (25 μ M), HSA conforme indicado, Tris 50 mM, pH 9,0. 65
- Figura 32. Espectros de absorção de HSA, 3-MB e o complexo HSA:3-MB. O inset mostra o a diferença do espectro: complexo HSA:3-MB menos HSA isolado + 3-MB. Condição experimental: 3-MB (50 μ M), HSA (25 μ M), Tris 50 mM, pH 9,0. 65
- Figura 33. Docking molecular e espectro simulado por DFT de 3-MB no sítio I de HSA. A) Pose de energia mais baixa de 3-MB e sua interação com resíduos de aminoácidos no sítio I. B) Espectros simulados de 3-MB na presença e ausência de aminoácidos. A figura inserida mostra o espectro de diferença (3-MB+ARG257+TRY150+ILE290) menos 3-MB. 66
- Figura 34. A) representação da molécula: ácido 5-(2,4-difluorofenil)-2-hidroxi-benzóico; B) representação da molécula do AMPPD. 72
- Figura 35. A) representação no formato de fitas da estrutura da HSA destacado o sítio 1 da proteína em azul. B) Ampliação do sítio 1 com o AMPPD em seu interior, o resíduo de triptofano está representado no formato sticks. 73

- Figura 36. Detalhe das interações entre o AMPPD e os resíduos de aminoácidos do sítio 1 da HSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares. 74
- Figura 37. A) representação no formato de fitas da estrutura da HSA destacado o sítio 2 da proteína em verde. B) Ampliação do sítio 2 com o AMPPD em seu interior. 75
- Figura 38. Detalhe das interações entre o AMPPD e os resíduos do sítio 1 da HSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares. A) resíduos que fazem ligações de hidrogênio. B) resíduos que fazem interações apolares. 76
- Figura 39. A) representação no formato de fitas da estrutura da HSA destacado o sítio 1 da proteína em azul. B) Ampliação do sítio 1 com o AMPPD desfosforilado em seu interior, o resíduo de triptofano está representado no formato sticks. 78
- Figura 40. Detalhe das interações entre o AMPPD desfosforilado e os resíduos de aminoácidos do sítio 1 da HSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares. 78
- Figura 41. Detalhe das interações múltiplas do resíduo LYS199 com o grupo dioxetano, destacado no interior do círculo verde. 79
- Figura 42. A) representação no formato de fitas da estrutura da HSA destacado o sítio 2 da proteína em verde. B) Ampliação do sítio 2 com o AMPPD desfosforilado em seu interior. 80
- Figura 43. Detalhe das interações entre o AMPPD desfosforilado e os resíduos de aminoácidos do sítio 2 da HSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares. 81
- Figura 44. A) representação no formato de fitas da estrutura da HSA destacado o sítio 1 da proteína em azul. B) Ampliação do sítio 1 com o 3-MB em seu interior. 82
- Figura 45. Detalhe das interações entre o 3-MB e os resíduos de aminoácidos do sítio 1 da HSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares. 83

- Figura 46. A) representação no formato de fitas da estrutura da HSA destacado o sítio 2 da proteína em verde. B) Ampliação do sítio 2 com o 3-MB em seu interior. 84
- Figura 47. Detalhe das interações entre o 3-MB e os resíduos de aminoácidos do sítio 2 da HSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares. 85
- Figura 48. A) representação no formato de fitas da estrutura da BSA destacado o sítio 1 da proteína em azul. B) Ampliação do sítio 1 com o AMPPD em sua borda. 86
- Figura 49. Detalhe das interações entre o AMPPD e os resíduos do sítio 1 da BSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares. A) resíduos que fazem ligações de hidrogênio. B) resíduos que fazem interações apolares. 87
- Figura 50. A) representação no formato de fitas da estrutura da BSA destacado o sítio 2 da proteína em verde. B) Ampliação do sítio 2 com o AMPPD em seu interior. 88
- Figura 51. Detalhe das interações entre o AMPPD e os resíduos do sítio 2 da BSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares. A) resíduos que fazem ligações de hidrogênio. B) resíduos que fazem interações apolares. 89
- Figura 52. A) representação no formato de fitas da estrutura da BSA destacado o sítio 1 da proteína em azul. B) Ampliação do sítio 1 com o AMPPD desfosforilado em sua borda. 90
- Figura 53. Detalhe das interações entre o AMPPD desfosforilado e os resíduos de aminoácidos do sítio 1 da BSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares. 91
- Figura 54. A) representação no formato de fitas da estrutura da BSA destacado o sítio 2 da proteína em verde. B) Ampliação do sítio 2 com o AMPPD desfosforilado fora de seu domínio. 92

Figura 55. Detalhe das interações entre o AMPPD desfosforilado e os resíduos de aminoácidos do sítio 2 da BSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares..... 93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D – três dimensões

3-MB - 3-metil benzoato

4-MB – 4-metil benzoato

ADP - Adenosina Difosfato

ALA - Alanina

ALP – enzima fosfatase alcalina

AMP - Adenosina Monofosfato

AMPPD - 3-(2'-espiroadamantil)-4-metoxi-4-(3"-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxetano

ARG - arginina

ARG114 – o número que aparece na frente da abreviação do aminoácido refere-se à posição do resíduo desse aminoácido na proteína, esse padrão se aplica aos demais resíduos apresentados neste trabalho.

ASN - asparagina

ASP - ácido Aspártico

ATP - adenosina Trifosfato

BSA – albumina sérica bovina

C153 – cumarina 153

CADD - *Computer-Assisted Drug Design*

CYS - Cisteína

DCM - 4-(dicianometileno)-2-metil-6-(4-dimetilaminoestiril)-4H-pirano

DFT - teoria funcional da densidade

DGlu – dansil-glutamina

DIO – 1,4-dioxano

DP – dansil-L-prolina

DPro – dansil prolina

DRX – difração de raios X

DS - Discovery Studio

DS1 – sítio de ligação 1

DS2 – sítio de ligação 2

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

F - fluorescência na presença do ligante.

F₀ - Fluorescência na ausência do ligante.

Fig. – figura.

FRET - transferência de energia por ressonância de fluorescência

GLN - glutamina

GLU - ácido Glutâmico

GLY - glicina

GOLD - Genetic Optimization for Ligand Docking

HIS - histidina

HSA – albumina séria humana

hv450nm – emissão de onda em 450 nanômetros

hv530nm – emissão de onda em 530 nanômetros

hv625nm – emissão de onda em 625 nanômetros

IBP - ibuprofeno

ICT - *intramolecular charge transfer*

ILE - isoleucina

K₁ - Constante de associação da menor temperatura.

K₂ - Constante de associação da maior temperatura.

K_d - constante de dissociação.

LEU - leucina

LYS - lisina

MET - metionina

MVD - *Molegro Virtual Docker*

P - concentração da proteína.

PDB – *protein data bank*

PHE - fenilalanina

PP - fosfato Inorgânico

PRO - prolina

PSA – albumina sérica suína

Q - concentração do ligante.

R - constante universal dos gases.

RET - transferência de energia de ressonância

RMN – ressonância magnética nuclear

RSA – albumina sérica cunicular (de coelho)

SER - serina

T₁ - menor temperatura.

T₂ - maior temperatura.

THR - treonina

TRP - triptofano

TYR - tirosina

UV – ultravioleta

UV-Vis – refere-se ao espectrofotômetro com intervalo de medição de comprimentos de onda que vão do visível ao ultravioleta.

VAL - valina

WAR – varfarina

ΔG - variação da energia livre de Gibbs.

ΔH - variação da entalpia.

ΔS - variação da entropia.

Φ - Razão da amplitude da fluorescência.

SUMÁRIO

1-Introdução.....	15
2- Fundamentação Teórica	17
2.1-Quimioluminescência	17
2.1.1- AMPPD.....	19
2.2- Fosfatase alcalina – ALP (Alkaline Phenyl Phosphatase).....	21
2.3- Albumina.....	22
2.4- Fotoluminescência.....	25
2.4.1- Fluorescência	25
2.4.2- <i>Quenching</i> da fluorescência.....	28
2.4.3- Transferência de energia por ressonância, <i>föster ressonance energy trasnsfer</i> (FRET).....	29
2.4.5- Fosforescência.....	30
2.4.6- Efeito Solvatocrômico.....	31
2.4.7- Anisotropia da fluorescência	31
2.5- Aminoácidos dansilados.....	33
2.6- <i>Docking</i> molecular.....	33
3- Objetivo Geral	38
3.1- Objetivos específicos	38
4. Capítulo 1 - Artigo	39
4.1 Resumo gráfico	40
4.2 - Resumo	41
4.3 - Introdução.....	42
4.4 - Materiais e métodos	45
4.4.1 - Produtos químicos e proteínas	45
4.4.2 - Reações quimioluminescentes	45
4.4.3 - Espectros de quimioluminescência e transferência de energia.....	46
4.4.4 - Determinação das constantes de associação.....	46
4.4.5 - Determinação do Sítio de Ligação.....	47
4.4.6 - Simulações de Docking Molecular	47
4.4.7 - Simulações DFT.....	48
4.5 - Resultados e Discussão	49
4.5.1 - Efeito da HSA na eficiência da quimioluminescência.....	49
4.5.2 - Otimização da reação	50
4.5.3 - Comparação entre albuminas de diferentes organismos.....	52

4.5.4 - Competição: HSA versus BSA	54
4.5.5 - Constantes de associação de AMPPD com albuminas.....	56
4.5.6 - Determinação de sítios de ligação preferenciais	57
4.5.7 - Espectro de quimioluminescência e transferência de energia	59
4.5.8 - Efeito da polaridade do meio.....	62
4.5.9 - Efeito da ligação de HSA nas propriedades fotofísicas das espécies emissivas	63
4.5.10 - Estudo das Espécies Emissivas: 3-MB versus 4-MB.....	64
4.5.11 - Simulações computacionais	66
4.6 - Conclusão	67
4.7 – Referências.....	67
5. Capítulo 2 – Estudo de <i>docking</i> molecular	72
5.1 – Estudo de interações com a proteína HSA.....	72
5.1.1 – Interações da HSA (sítio 1) com AMPPD.....	72
5.1.2 - Interações da HSA (sítio 2) com AMPPD	75
5.1.3 - Interações da HSA (sítio 1) com AMPPD desfosforilado	77
5.1.4 - Interações da HSA (sítio 2) com AMPPD desfosforilado	80
5.1.5 - Interações da HSA (sítio 1) com 3-MB.....	82
5.1.6 - Interações da HSA (sítio 2) com 3-MB.....	84
5.2 – Estudo de interações com a proteína BSA	86
5.2.1 - Interações da BSA (sítio 1) com AMPPD.....	86
5.2.2 - Interações da BSA (sítio 2) com AMPPD.....	88
5.2.3 - Interações da BSA (sítio 1) com AMPPD desfosforilado.....	89
5.2.4 - Interações da BSA (sítio 2) com AMPPD desfosforilado.....	92
5.3 – Conclusão.....	95
6 - Referências Bibliográficas	96

1-Introdução

Ao longo dos anos, muito se vem ampliando a capacidade de detecção de moléculas em concentrações muito pequenas através de diversos procedimentos de separação e análise cada dia mais sensíveis e com técnicas mais aprimoradas. No entanto, quando o objetivo é analisar moléculas específicas em ambientes biológicos, o desafio toma proporções muito maiores, devido aos diversos metabólitos que atuam em conjunto em concentrações muito pequenas em ambientes complexos, sendo tipicamente mais difícil identificar um sinal de uma molécula específica em meio a vários “ruídos”.

Uma técnica que se destaca em ambientes desafiadores como estes, justamente por se basear em uma característica pouco comum se comparado a outras propriedades espectroscópicas, como a fluorescência, é a quimioluminescência. Exatamente pelo motivo de não haver muitas moléculas e/ou reações químicas que sejam capazes de emitir luz, esta técnica se destaca devido à alta razão sinal/ruído, principalmente em um meio com milhares de interferentes como é o ambiente biológico. Baseado nesta premissa, atualmente vêm sendo utilizadas moléculas luminescentes para detecção e quantificação de metabolitos em ambientes biológicos, como é o caso do sangue. Aliado a isso, aparelhos robotizados baseados em quimioluminescência são desenvolvidos para realização desses ensaios com alto desempenho e velocidade, se adequando dessa forma as demandas dos laboratórios clínicos.

Em 1988 foi sintetizada uma das moléculas luminescentes mais utilizadas na atualidade para tais aplicações automatizadas, o composto dioxetânico estabilizado conhecido como 3-(2'-espiroadamantil)-4-metoxi-4-(3"-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxetano (AMPPD), por possuir alto rendimento quântico e grande estabilidade, sendo necessário apenas uma enzima para iniciar a reação quimioluminescente. Tal molécula luminescente é utilizada em exames clínicos automatizados quando há a necessidade de uma alta precisão e baixa interferência no meio para evitar falsos positivos, como é caso da detecção da enzima poli ADP-ribose polimerase utilizada para mediação de transcrição e reparo de DNA de tecido humano mamário. (LIU, LI, *et al.*, 2023).

Outra aplicação é uma alternativa para detecção de organopesticidas em substituição ao método tradicional de preço elevado e com baixa especificidade que se baseia na inibição destes pesticidas na presença da acetilcolinesterase, a utilização do

AMPPD permite a detecção através de quimiluminescência e com alta exatidão e seletividade (CHANG, YU, *et al.*, 2023).

O AMPPD também é utilizado como biomarcador de células cancerosas, devido a presença nestas células da enzima ALP, que inicia o processo de emissão luminescente, marcando as células atingidas pela doença (FAN, LI, *et al.*, 2021).

A enzima ALP mencionada pertence ao grupo das hidrolases, denominada de fosfatase alcalina, ela atua clivando grupos fosfato de diversos tipos de moléculas, é encontrada em diversos tecidos humanos fazendo diversas funções de transporte ativo de grupos fosfato até a defesa contra moléculas tóxicas ao organismo. Hoje vem sendo bastante utilizada em análises imunoenzimáticas.

Quando falamos de análises do sangue, devemos levar em consideração a proteína mais abundante do plasma humano, a albumina sérica humana, HSA, ela representa 60% das proteínas do plasma humano, atua regulando o pH e pressão osmótica do sangue, possuindo como principal função o transporte de substâncias endógenas e exógenas, como fármacos, mas também impedindo que substâncias potencialmente tóxicas ao organismo tenha sua ação mitigada, sendo assim o principal agente antioxidante do sangue.

Considerando as funções fisiológicas da HSA, não seria absurdo imaginar que o AMPPD poderia se ligar a mesma e de alguma forma afetar a sua capacidade de emissão de luz. Isto pode ser relevante, pois sendo utilizado para detecção de bioanalitos em meios complexos, particularmente na presença de plasma sanguíneo, tal interação poderia alterar sua sensibilidade e seletividade.

Considerando o exposto, este trabalho foi desenvolvido buscando avaliar a possível interação entre a proteína HSA e a sonda quimiluminescente AMPPD e as consequências que tal interação poderia causar na performance de emissão de luz. Descobrimos que de fato ocorre interação e ainda mais relevante foi constatar que a presença de HSA provoca um aumento significativo no rendimento quântico de emissão do AMPPD devido a interação e estabilização do produto excitado pela proteína HSA. Baseado nestes achados, todo o trabalho foi conduzido no sentido de esclarecer este fenômeno, o qual nunca foi descrito na literatura científica.

2- Fundamentação Teórica

2.1-Quimioluminescência

Na natureza existem diversos fenômenos quimioluminescentes, sendo que a maior parte deles ocorre principalmente em espécies marinhas, como em águas-vivas, crustáceos, estrelas-do-mar e algas; em ambientes terrestres a espécie mais conhecida a utilizar o fenômeno é o vagalume, e larvas de alguns insetos. Os fenômenos bioluminescentes envolvem enzimas, como é o caso da luciferase nos vagalumes, e substratos conhecidos como luciferinas. Estas reações levam a intermediários que possuem o peróxido cíclico conhecido como anel 1,2-dioxetânico como fonte de geração de energia para a geração de estados eletronicamente excitados. A decomposição dos 1,2-dioxetanos leva a formação de fragmentos carbonílicos em estado excitado, dentro do sítio ativo da enzima, emitindo luz ao decair ao estado fundamental (GUDEM e KOWALEWSKI, 2023), conforme fig. 1.

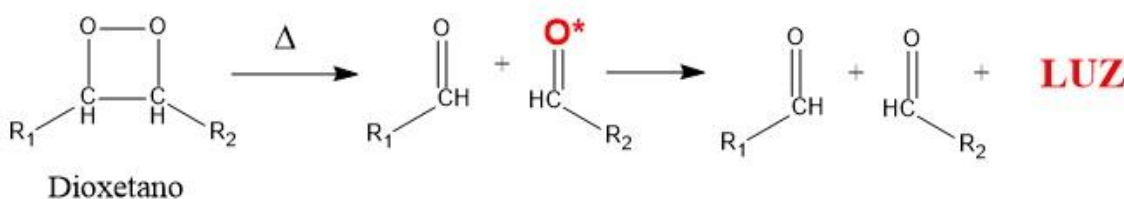


Figura 1. Decomposição térmica do 1,2-dioxetano resultando na formação do estado fundamental e excitado dos fragmentos de formaldeído, adaptado de (GUDEM e KOWALEWSKI, 2023).

Inúmeras sondas bioluminescentes e quimioluminescentes possuem esta formação 1,2-dioxetano e consequentemente o mecanismo de emissão de luz é praticamente o mesmo, porém na maior parte das reações quimioluminescentes é utilizado um oxidante forte para geração dos intermediários 1,2-dioxetanos como H_2O_2 (HUANG e PU, 2020), já em reações bioluminescentes é mais comum a presença de O_2 , sendo o ATP a fonte de energia (QUAN, MAO, *et al.*, 2022).

Comparando fenômenos luminescentes, frequentemente é observado maior rendimento quântico em ambientes biológicos, como é o caso dos vagalumes, e por ser o fenômeno natural, também é extensivamente estudado na literatura. Desse modo, a interação das moléculas luminescentes em cavidades de sítios ativos de proteínas e enzimas é uma alternativa para controlar as reações luminescentes, tal fenômeno de

“*polaritonic chemistry*” vem sendo estudado de diversas vertentes para compreender seu mecanismo de funcionamento (GUDEM e KOWALEWSKI, 2023).

Um processo luminescente que muitas vezes se confunde com quimioluminescência e a fluorescência, que por sua abrangência é até mais utilizada se comparada a quimioluminescência. No entanto, há uma diferença fundamental, pois a fluorescência é um processo físico onde não há intermediação de reações químicas para geração de estados excitados. A excitação é realizada por uma fonte de radiação (lâmpada, laser).

Embora com maior abrangência de uso, as técnicas baseadas em fluorescência não alcançam a mesma sensibilidade de uma técnica quimioluminescente. Em meios biológicos, a fluorescência pode ser insuficiente para distinguir o sinal do ruído, pois moléculas fluorescentes podem interagir com outras moléculas do meio, suprimindo o sinal, dificultando ou mascarando os resultados em análises *in situ*. Devido à natureza da técnica, amostras quimioluminescentes são mais sensíveis de serem detectadas, pois não dependem de uma fonte de excitação externa, e não existe uma supressão da luminescência como é o caso da fluorescência que pode possuir efeito de filtro interno, desta forma possibilitam a quantificação de amostras de concentração muito menores que as demais técnicas luminescentes. A quimioluminescência tem vantagem no campo de imagem de penetração profunda da pele porque não requer luz de excitação externa e pode ser realizada *in situ* no animal (BAOQU, TIAN, *et al.*, 2023).

A quimioluminescência vem sendo bastante utilizada em ensaios imunológicos, incluindo diagnóstico de doenças, monitoramento do ambiente e segurança de fármacos. Devido a sensibilidade da técnica, uma variedade de estudos cinéticos e a utilização de apenas um aparelho de medida (OUYANG, XIAN, *et al.*, 2021), a técnica de luminescência é capaz de detectar quantidades baixíssimas de proteína. Por exemplo, 1000 moléculas da enzima de clivagem como fosfatase alcalina (catalizador do processo) pode ser detectada. Desta forma, esta técnica vem sendo desenvolvida para detectar concentrações muito pequenas de DNA (GILLESPIE e HUDSPETH, 1991).

2.1.1- AMPPD

Como já dito, moléculas que possuem 1,2-dioxetanos em sua estrutura são importantes moléculas luminescentes, sua termólise gera produtos de carbonila no estado excitado, e seu decaimento emite luz, porém na maior parte das vezes seu tempo de vida é muito limitado, dificultando sua aplicabilidade. Neste sentido, foi sintetizado o composto 3-(2'-espiroadamantil)-4-metoxi-4-(3''-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxetane ou AMPPD, uma molécula quimioluminescente, bastante estável e que dificilmente se decompõe em baixas temperaturas no estado sólido. Na ausência de enzimas, o AMPPD se decompõe muito lentamente, porém na presença da enzima fosfatase alcalina sua decomposição ocorre rapidamente emitindo luz visível com alta eficiência em apenas quimioexcitação singlete (YUE e LIU, 2013).

O interessante da utilização do AMPPD em ambientes biológicos é a eliminação da necessidade de irradiar amostras biológicas, o que pode causar alteração em biomoléculas sensíveis a luz, além de possuir elevado nível de sinal em comparação ao ruído, alta taxa de transferência, e nenhuma interferência por luz espalhada, atuando como um substrato quimioluminescente ideal, juntamente com a alta eficiência da enzima fosfatase alcalina, que atua desfosforilando o AMPPD, sendo chamada essa união de ALP-AMPPD. Comparando com o sistema quimioluminescente tradicional, hemina/luminol/H₂O₂, o ALP-AMPPD possui maior sinal de saída, longo tempo de luminescência, fácil operação, facilita a preparação da amostra, mais sensível e estável em relação à sonda tradicional (LIU, LI, *et al.*, 2023).

O processo de emissão de luz do AMPPD ocorre em três etapas: a primeira é a hidrólise do AMPPD catalisada pela enzima fosfatase alcalina (ALP), formando um intermediário muito instável; na segunda etapa, a molécula se decompõe rapidamente em uma molécula parte no estado fundamental e parte no estado excitado, o ânion metil-m-oxibenzoato, e outra no estado fundamental, adamantanona; na terceira etapa, a molécula excitada emite luz (Fig. 2).

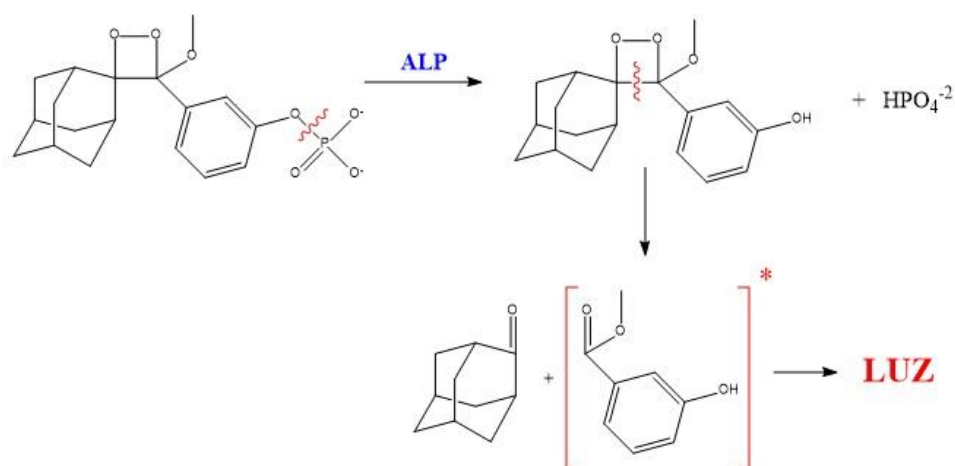


Figura 2. Mecanismo de quimiluminescência do AMPPD na presença do catalizador fosfatase alcalina (ALP), responsável pela desfosforilação do fluoróforo e subsequente clivagem do 1,2-dioxietano e decaimento radioativo, adaptado de (YUE e LIU, 2013).

O mecanismo de quimiexcitação envolve uma reação intramolecular mediada por uma transferência interna de elétrons à ligação peróxido, a qual leva a decomposição do anel dioxetânico e formação do éster (metil-m-oxibenzoato) em estado excitado singlete (Fig. 3). Estudos demonstraram maior eficiência luminescente ao meta-AMPPD comparado ao para-AMPPD (YUE e LIU, 2013).

Atualmente, o AMPPD é o principal substrato quimioluminescente comercial utilizado em kits de medida de equipamentos automatizados de análises imunoabsorventes enzimáticas como o Immulite® (ELISAs) (KANEGAE, XIMENES, *et al.*, 2007).

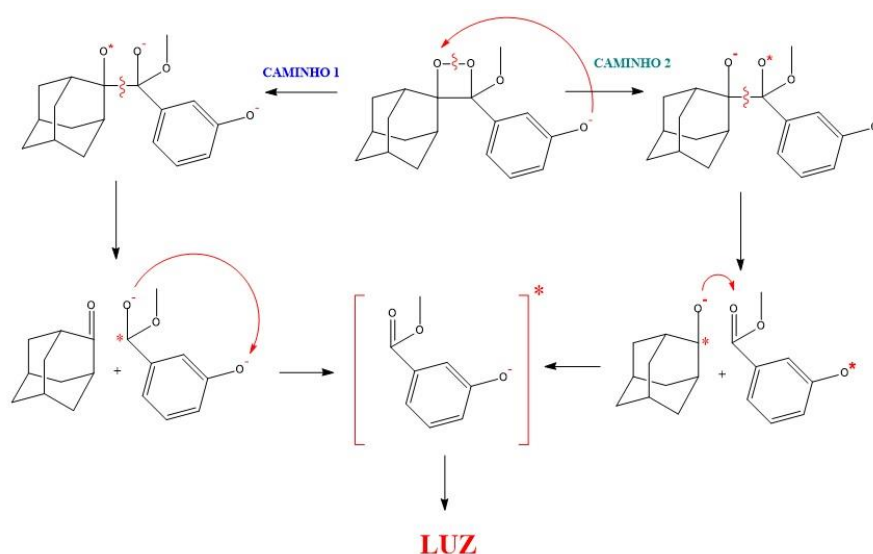


Figura 3. Mecanismo de dois possíveis caminhos para clivagem do AMPPD dentro de uma cavidade, sítio ativo, de uma macromolécula, após a sua desfosforilação, adaptado de (YUE e LIU, 2013).

2.2- Fosfatase alcalina – ALP (Alkaline Phenyl Phosphatase)

A fosfatase alcalina é amplamente encontrada na natureza, da bactéria ao homem, é uma enzima do grupo das hidrolases que catalisam a hidrólise de monoésteres de ácido fosfórico e transfosforilação na presença de grandes concentrações de aceptores de fosfato. A ALP aparentemente está envolvida no metabolismo dos nucleotídeos, ATP, ADP, AMP e PP, exemplos importantes de substratos onde ela atua.

A estrutura geral desta enzima é um dímero, e cada monômero contém 484 resíduos de aminoácidos, quatro átomos de metal e um íon fosfato. Cada sítio ativo possui três íons metálicos, dois íons zinco e um de magnésio, necessários para a atividade enzimática, fig. 4 (MILLÁN, 2006).

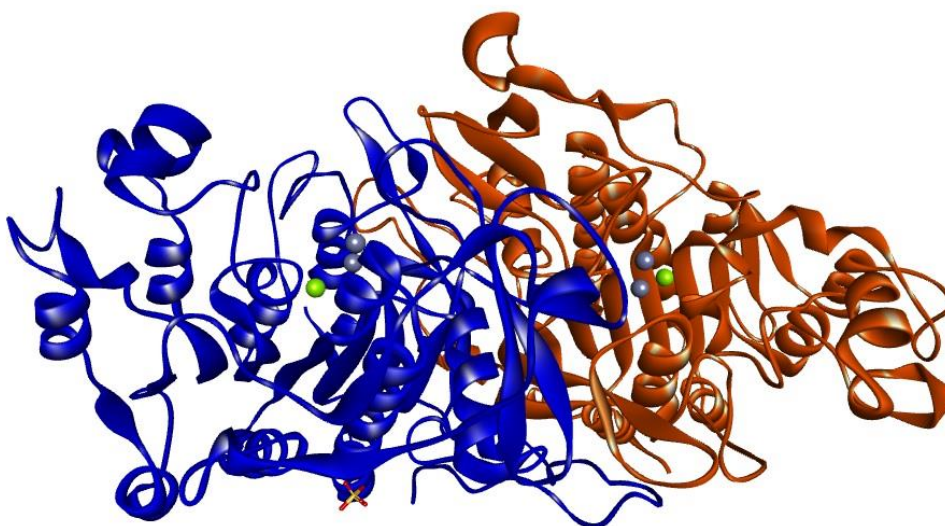


Figura 4. Estrutura tridimensional do ALP humana a partir das coordenadas cristalográficas. A estrutura é subdividida em dois domínios, cada qual evidenciado com uma cor, representados no formato de fitas, cada domínio possui três átomos metálicos, representados no formato de esferas, dois átomos de zinco e um de magnésio.

A fosfatase alcalina também atua no transporte ativo de fosfato, absorção de nutrientes através da membrana plasmática e transporte de glucose e ácidos graxos através da membrana celular. Tal enzima vem sendo utilizada como um biomarcador para doenças metabólicas dos ossos, alguns cânceres e inflamação do miocárdio. No desenvolvimento gestacional a fosfatase alcalina atua para manter a saúde do feto agindo contra substâncias tóxicas na defesa e nutrição do organismo, altas concentrações em recém-nascidos é indicativo de icterícia, doenças metabólicas dos ossos e úlcera (DIMA, AVRAMESCU, *et al.*, 2021). A fosfatase alcalina é utilizada em análises

imunoenzimáticas sensíveis, hidrolisando substratos luminescentes como o AMPPD, sendo possível detectar moléculas no nível de attomols/L ($1 \cdot 10^{-18}$ mols/L) (KANEGAE, XIMENES, *et al.*, 2007).

Pesquisas mostram que a fosfatase alcalina está ligada ao desenvolvimento da obesidade, apresenta atividade anti-inflamatória, regulação da secreção de bicarbonato, regulação do pH da parede do duodeno e regulação das bactérias intestinais e suas translocações (LALLÈS, 2014).

Mais de 80% da ALP no soro tem origem no fígado e nos ossos, com pequenas contribuições no intestino. Embora as ALPs estejam presentes em vários tecidos do corpo, sua função fisiológica exata permanece indefinida (VIMALRAJ, 2020).

2.3- Albumina

A albumina do soro humano (HSA) é a proteína mais abundante do plasma humano, com concentrações que variam de 45g/L em indivíduos jovens a 42g/L em idades mais avançadas (PETERS, 1995), estando em uma concentração de aproximadamente 600 μ M, formada de um único polipeptídio com 585 resíduos de aminoácidos, com uma massa de 66500 D (CARTER, HE, *et al.*, 1989), contendo três domínios helicoidais homólogos, 67% de alfa-hélices, 10% de folhas beta e 23% de cadeia estendida (PETERS, 1995), denominadas domínio I: IA e IB; domínio II: IIA e IIB; domínio III: IIIA e IIIB.

Vale ressaltar que a formação de folhas beta está diretamente relacionado a condições do meio como, temperatura elevada, acima de 65°C em pH 7,4; a presença de etanol em concentrações intermediárias, entre 10-90% (v/v) (JUÁREZ, MEDA, *et al.*, 2012); concentrações elevadas da HSA entre 10-150 μ M (BHATTACHARYA, PRAJAPATI, *et al.*, 2014); e em pHs ácidos, abaixo de 3 (JUÁREZ, TABOADA e MOSQUERA, 2009).

A proteína é codificada por apenas um único gene, no cromossomo 4 e posição q13.3. A albumina é primariamente sintetizada no fígado em uma quantidade de aproximadamente 13,9 g por dia, sendo esta quantidade regulada por dois hormônios, a insulina e o cortisol (ZENDJABIL, 2020), possui alta solubilidade em água e está presente no sangue na concentração que varia de 0,53 a 0,75 mM (AL-HARTHI, LACHOWICZ,

et al., 2019), com meia vida de aproximadamente 27 dias (PETERS, 1995), e está presente em maior concentração no meio extravascular (~242 g), que no meio intravascular (~118 g), como no intestino, na pele, músculos e outros fluídos e secreções, e em menor concentração no meio intracelular (MERLOT, KALINOWSKI e RICHARDSON, 2014). A HSA perpassa para o meio extracelular via mecanismo ativo e utilizando mecanismos mediados por receptores através dos poros sinusoidais ou fenestrada do endotélio de certos órgãos como o fígado, pâncreas, intestino delgado e medula óssea (MERLOT, KALINOWSKI e RICHARDSON, 2014).

A proteína também é responsável por manter o pH e a pressão osmótica coloidal do sangue (HAO, XU, *et al.*, 2017). Esta é especialmente importante, pois se liga a uma grande variedade de moléculas endógenas e exógenas, além de ligar e armazenar diversos metais de transição, e a 250 fármacos registrados no mercado (AL-HARTHI, LACHOWICZ, *et al.*, 2019), além de ácidos graxos e bilirrubina, varfarina (ligantes do sítio I), piroxicam (ligante do sítio I), fenilbutazona (ligante do sítio I) e diazepam (ligante do sítio II), ibuprofeno (ligante do sítio II).

São relatados na literatura múltiplos sítios ativos fazendo com que a albumina possua uma excelente capacidade de ligação com diversas moléculas, mas possui uma capacidade maior de se ligar a compostos hidrofóbicos neutros e fármacos ácidos em seu interior (SIVERTSEN, ISAKSSON, *et al.*, 2014), a maior parte dos ligantes interagem com mais frequência nos sítios primários 1 e 2 (GHUMAN, ZUNSZAIN, *et al.*, 2005), que são sítios hidrofóbicos que estão situados nos subdomínios IIA e IIIA (GRACIANI e XIMENES, 2013), como demonstrado na fig. 5.

Vale ressaltar que a capacidade de ligação da albumina é afetada pela presença de outros grupos ligantes presentes no sangue, como é o caso da glicose; albumina glicada diminui a eficiência de transporte de fármacos como o ibuprofeno, porém não altera a eficiência de transporte de outros fármacos como o diazepam e o naproxeno (ZENDJABIL, 2020). A albumina possui também a capacidade de tornar inofensiva potenciais moléculas tóxicas atuando como o principal antioxidante do plasma humano, atuando com propriedades enzimáticas, e mesmo o produto de sua degradação é benéfica para os organismos, devido a liberação de aminoácidos (AL-HARTHI, LACHOWICZ, *et al.*, 2019). A albumina é intrinsicamente fluorescente devido a presença do aminoácido triptofano presente em sua estrutura.

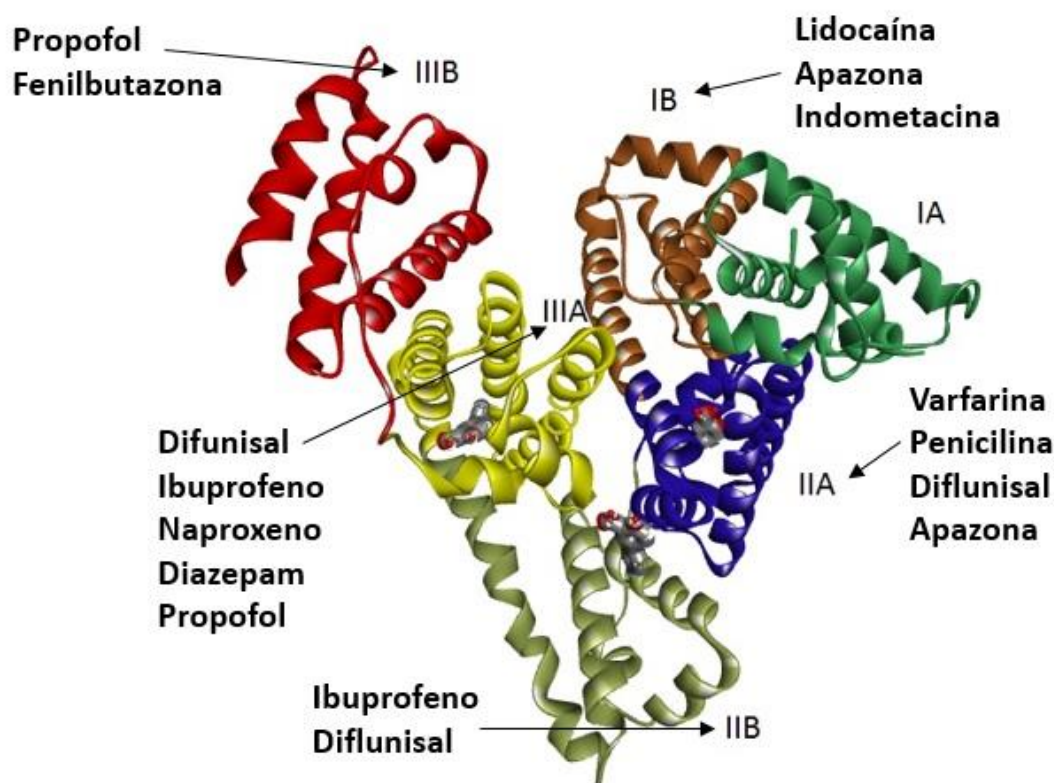


Figura 5. Resumo dos sítios ativos da proteína HSA definida por cristalografia, três moléculas do fármaco Diflunisal cristalizadas junto à proteína, PDB: 2BXE, e os locais de interação de alguns fármacos em cada domínio da proteína HSA, adaptado de (GHUMAN, ZUNSZAIN, et al., 2005).

Além disso, a albumina é também um marcador biológico para o diagnóstico de diversas doenças como câncer, artrite reumatóide, hipoxemia, obesidade pós menopausa e doenças relacionadas ao índice glicêmico. Ademais a HSA tem sido utilizada com sucesso para o tratamento clínico de diversos distúrbios, incluindo hipovolemia, choque, queimaduras, perda sanguínea cirúrgica, trauma, hemorragia, circulação extracorpórea, dificuldade respiratória aguda, hemodiálise, insuficiência hepática aguda, doença hepática crônica, suporte nutricional e hipoalbuminemia.

A proteína possui atividade farmacológica, atuando como carregadores de medicamento “*drug delivery*”, com capacidade de transportar uma grande quantidade de moléculas ligantes (DEEB, HERNÁNDEZ, et al., 2009), sendo um dos principais desafios no desenvolvimento da farmacocinética e da fármaco-atividade, devido ao equilíbrio existente entre o fármaco ligado a albumina e livre e ativo no plasma humano. Outro fator relevante é a alteração da concentração da HSA no plasma humano durante a instalação de uma doença, na fase aguda a concentração pode diminuir em um fator de dois, o que afeta o transporte de fármacos no sangue (SIVERTSEN, ISAKSSON, et al., 2014).

2.4- Fotoluminescência

Fotoluminescência é um fenômeno de emissão que ocorre após excitação por uma fonte de luz, sendo classificado em duas categorias, fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado.

2.4.1- Fluorescência

Na fluorescência, o estado excitado é singlete. O elétron excitado está emparelhado a um segundo elétron de spin oposto, que está em seu estado fundamental, o retorno do elétron excitado a seu estado fundamental emite um fóton de energia, sendo que a taxa de emissão desse fenômeno é em média de 10^8 emissões por segundo, porém seu tempo de vida gira em torno de 10 nanossegundos (LAKOWICZ, 2006).

Fluorescência ocorre tipicamente em moléculas aromáticas como os compostos da fig. 6, um exemplo prático do fenômeno foi possível ser observado durante os experimentos com as moléculas dansiladas, na fig. 7 é possível observar um feixe de emissão no espectro visível com intensidade suficiente para ser observado a olho nu, em uma das amostras dentro de uma cubeta no luminômetro utilizado para os experimentos desta trabalho, as moléculas dansiladas também possuem em suas estruturas grupos aromáticos, como mostrado na fig. 13.

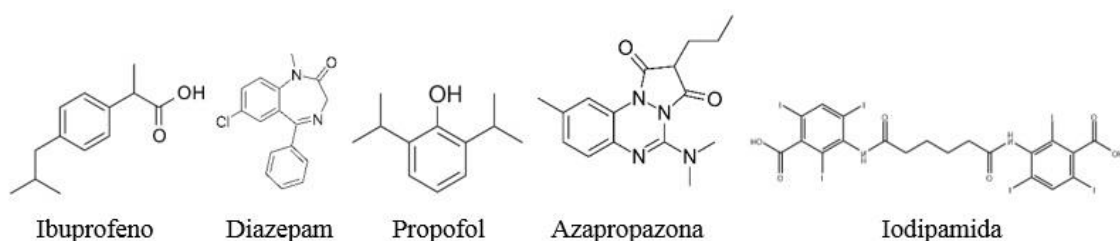


Figura 6. - Exemplos de medicamentos com propriedades fluorescentes

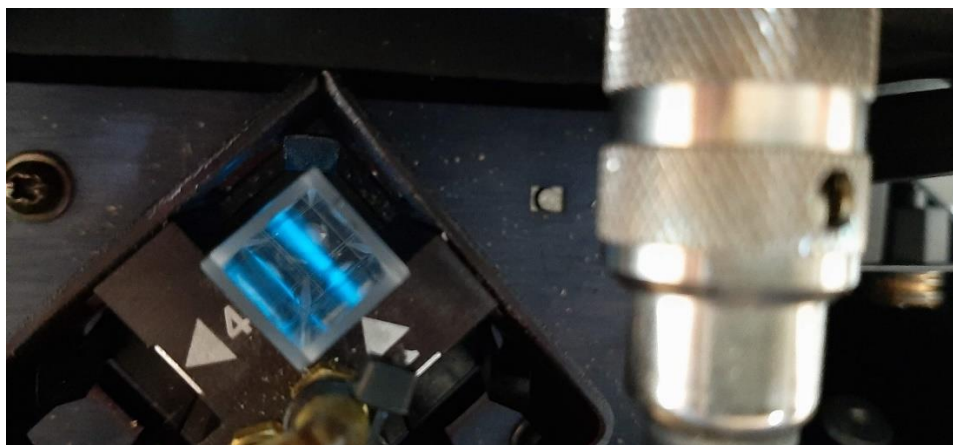


Figura 7. Fluorescência observada dentro de uma cubeta em um dos experimentos realizados em um fluorímetro utilizando moléculas dansiladas.

No processo de fluorescência, o fluoróforo, ou seja, a substância que possui a característica do decaimento radiativo fluorescente, absorve em um comprimento de onda menor (maior energia), passa por um processo de desativação não radiativa (decaimento vibracional) e na sequência emite em um comprimento de onda maior, ou seja, de menor energia. Como exemplo, a fig. 8 mostra uma representação de um espectro de absorção e emissão.

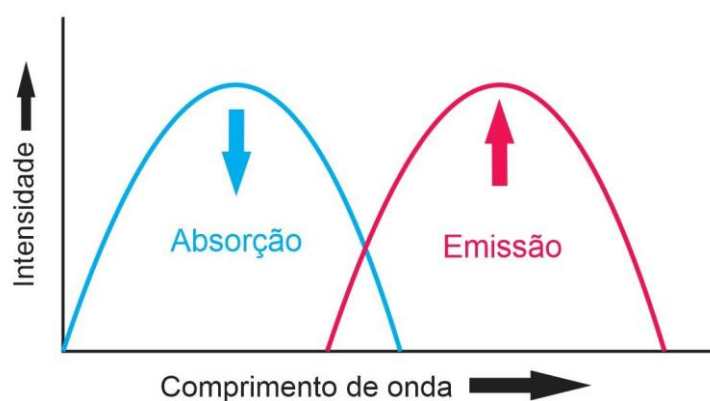


Figura 8. Representação de um espectro de absorção e emissão de fluorescência, adaptado de (LAKOWICZ, 2006).

A excitação que ocorre na fluorescência só é possível através da absorção da energia eletromagnética, pois a energia proveniente de aquecimento, vibracional, não consegue atingir os níveis energéticos suficientes para o efeito de fluorescência, como é demonstrado pelo diagrama de Jablonski a seguir (fig. 9).

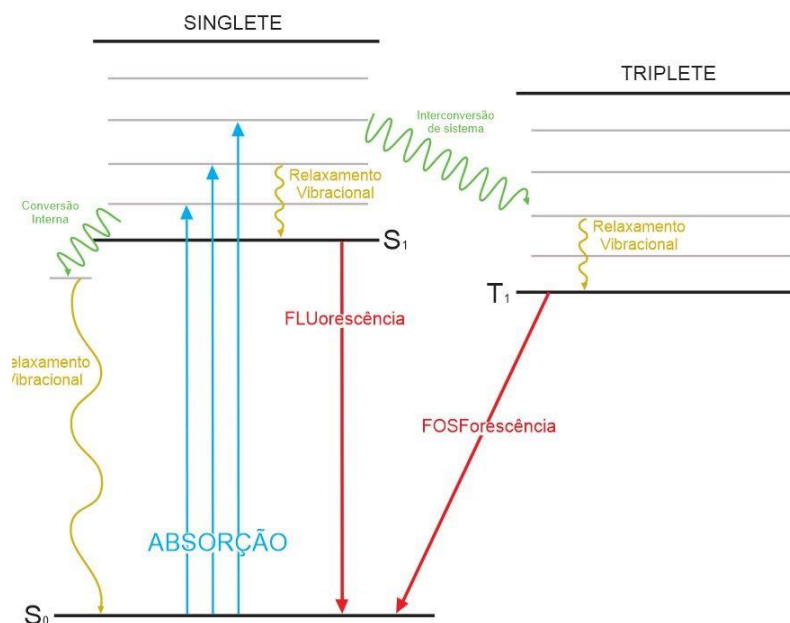


Figura 9. Diagrama de Jablonski representando processos fotofísicos que podem ocorrer em uma molécula, as transições radioativas são representadas por linhas retas, e as transições não radioativas são representadas pelas linhas onduladas, adaptado de (ERNEST, 2011).

Como é possível observar no diagrama, o fluoróforo pode estar em vários estados vibracionais tanto no estado singlete como no triplete, porém as interações entre outras moléculas ou solventes não são representadas neste diagrama. A transição entre sistema ilustrado no diagrama refere-se conversão do estado singlete a triplete, fenômeno tipicamente de baixa eficiência, mas favorecido em moléculas que possuem átomos pesados como bromo ou iodo devido ao fenômeno de acoplamento spin-órbita. É justamente a menor eficiência desse processo que leva à emissão de luz mais lenta típica da fosforescência.

Nos fenômenos de fluorescência e fosforescência, a energia da absorção é sempre maior que a energia da emissão, porém a emissão é independente da energia de absorção, pois o excedente de energia de absorção sofre decaimento de forma vibracional.

A absorção e emissão, em um fenômeno de fluorescência, ocorrem de forma espelhada, ou seja, se um elétron do estado fundamental e vibracional no nível de energia mais baixo é excitado ao nível de energia mais alto, em sua emissão ele liberará toda sua energia absorvida voltando ao nível mais baixo, porém se este elétron no estado fundamental estiver no segundo nível vibracional, sua excitação o levará ao orbital Lumo um nível vibracional abaixo do nível máximo do orbital, da forma que é demonstrada na fig. 10, ilustrando uma típica regra do espelho de Franck-Condon, porém essa regra tem várias exceções (LAKOWICZ, 2006).

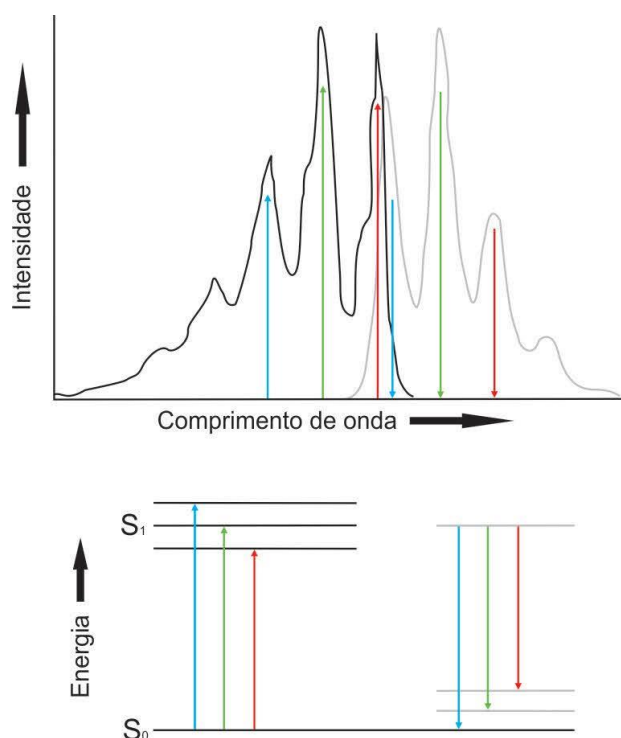


Figura 10. Regra da imagem espelhada e fatores de Franck-Condon, de um espectro de absorção e emissão de fluorescência, adaptado de (LAKOWICZ, 2006).

2.4.2- Quenching da fluorescência

A supressão da fluorescência pode ocorrer por diversos motivos, e esses fenômenos são chamados de “*quenching*” da fluorescência. *Quenching* pode ocorrer por mecanismo colisional ou dinâmico, quando o fluoróforo no estado excitado é desativado por contato com outras moléculas em solução, chamadas de “*quencher*”. Neste tipo de supressão não há mudança química das moléculas envolvidas. A fig. 11 ilustra tal fenômeno.

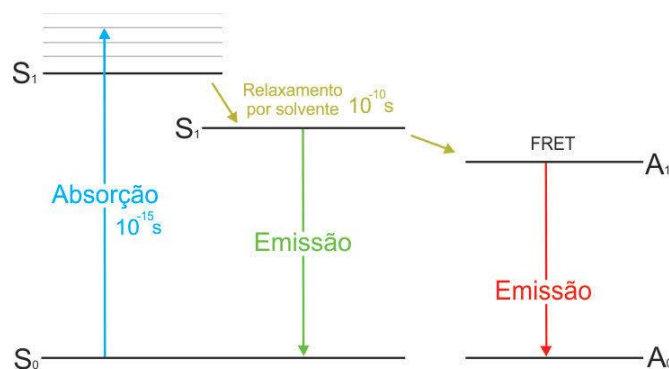


Figura 11. Diagrama de Jablonski mostrando o quenching colisional, e a transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET), adaptado de (LAKOWICZ, 2006).

Para calcular o *quenching* colisional é utilizada a equação de Stern-Volmer:

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

Nesta equação 1, K representa a constante de Stern-Volmer e está relacionado a sensibilidade do fluoróforo ao *quencher*. Quando o fluoróforo está dentro de uma macromolécula, este não tem contato com o solvente, portanto a constante K é pequena. Valores elevados desta constante ocorrem quando o fluoróforo está livre em solução ou na superfície de uma biomolécula, k_q é a constante bimolecular, τ_0 o tempo de vida, [Q] concentração do *quencher*. Várias moléculas podem atuar como *quencher*, as principais são oxigênio, halogênios, aminas e moléculas com déficit de elétrons como acrilamida.

Paralelo ao *quenching* dinâmico existe o *quenching* estático, neste tipo a interação ou reação com outra molécula, pode formar outro composto não fluorescente no estado fundamental, todavia existem diversos mecanismos de *quenching* estático, inclusive não moleculares, como a diminuição da incidência de luz no fluoróforo ou absorção por alguma outra molécula em solução, efeito este denominado de filtro interno.

A absorção de luz pelo fluoróforo ocorre de forma quase instantânea, menos de 10^{-15} segundos, não havendo tempo da molécula se movimentar. Em contraste com a absorção, a emissão ocorre de forma muito mais lenta, tendo a oportunidade de interação com outras moléculas, o que não ocorre com a absorção. No estado excitado, o fluoróforo adquire um caráter mais polar, e seu relativo longo tempo de emissão permite ao solvente interagir e assim atenuar a emissão, esse fenômeno é chamado de relaxamento por solvente, ocorre no tempo de 10^{-10} segundos e tem um efeito substancial na diferença entre absorção e emissão, como é o caso do triptofano em proteínas, que absorve na faixa de 280 nm e emite na faixa de 350 nm (LAKOWICZ, 2006).

2.4.3- Transferência de energia por ressonância, *föster resonance energy trasnsfer* (FRET).

Outro processo importante que ocorre no estado excitado de um fenômeno fluorescente é a transferência de energia por ressonância. Tal processo ocorre quando a

ocorre a sobreposição entre o espectro de emissão do fluoróforo e o espectro de absorção de outra molécula, não necessariamente fluorescente. Neste caso, o primeiro é denominado de doador, e o segundo aceitor, como ilustrado na Fig. 12. O mais interessante a ser observado é que não há a emissão de luz do doador para o aceitor, pois a interação ocorre através da interação dipolo-dipolo entre o doador e o aceitor (LAKOWICZ, 2006).

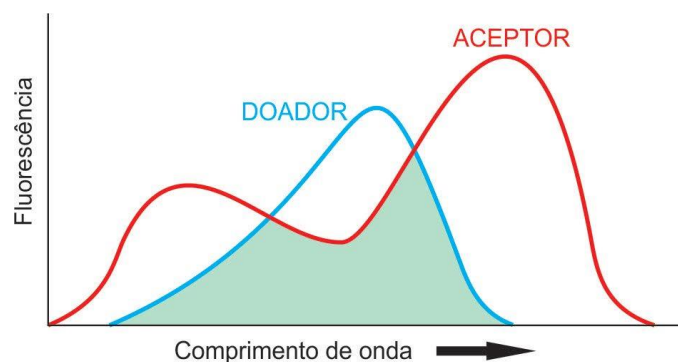


Figura 12. Sobreposição dos espectros de emissão de um fluoróforo doador com o espectro de absorção do aceitor (FRET), adaptado de (LAKOWICZ, 2006).

2.4.5- Fosforescência

A fosforescência ocorre da emissão de luz de um estado triplete excitado, e o elétron no orbital excitado possui a mesma orientação de spin do elétron no estado fundamental, sendo assim a transição para o estado fundamental é proibida e sua taxa de emissão gira em torno de 10^3 a 1 por segundo, e o tempo de vida de milissegundos a segundos, o que possibilita ser visualizado em objetos como interruptor de luz e ponteiros de relógio que brilham no escuro. A fosforescência não é vista normalmente em soluções na temperatura ambiente, devido a diversos processos de desativação, decaimentos não radiativos e processos de “*quenching*”, sendo que nem sempre a distinção entre fluorescência e fosforescente é clara (LAKOWICZ, 2006).

2.4.6- Efeito Solvatocrômico

Como já visto anteriormente, existem várias formas de ocorrer a diminuição da energia de emissão da fluorescência, uma delas é o efeito do meio reacional, assim que o fluoróforo passa do estado fundamental para o estado excitado, este adquire caráter mais polar, o que faz mudar a interação com o meio, orientando as moléculas do solvente, fazendo que diminua a energia do estado excitado mudando o espectro de emissão para comprimentos de onda maiores, este fenômeno é denominado efeito solvatocrômico. Existem moléculas que possuem em sua composição tanto emissores como receptores de energia, que são capazes de realizar a transferência de energia dentro da própria molécula, este fenômeno é denominado de ICT, *intramolecular charge transfer*, e nestes casos a estabilização a partir do efeito solvatocrômico é ainda maior, deslocando os comprimentos de onda para valores ainda maiores. Contudo não é todo o fluoróforo que possui em sua estrutura um grupo doador e um aceptor para que o efeito ICT ocorra, porém tais moléculas são mais sensíveis a polaridade do meio, e mudam os seus comprimentos de onda dependendo da polaridade do meio.

2.4.7- Anisotropia da fluorescência

A anisotropia da fluorescência é comumente utilizada em aplicações bioquímicas, por possibilitar a determinação do tamanho e formato de proteínas, bem como analisar a interação proteína/proteína, fluído de membranas e ensaios imunológicos de várias substâncias. A medida de anisotropia de fluorescência é baseada no princípio de fotoseleção de luz polarizada da excitação. Os fluoróforos absorvem preferencialmente fótons com vetor eletrônico paralelo aos da emissão, que são alinhados com o eixo molecular. Após irradiar um comprimento de onda polarizada em uma solução isotrópica, uma população de fluoróforos se alinhará ao feixe, que emitirá radiação no mesmo alinhamento. O momento entre esses dois ângulos de absorção e emissão determinará a anisotropia.

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2)$$

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (3)$$

Na equação 2, r representa a anisotropia da fluorescência, $I_{\parallel}$ a intensidade da fluorescência vertical e $I_{\perp}$ a intensidade da fluorescência horizontal polarizada em relação ao eixo z , e o grau de espalhamento, P , é determinado pela equação 3 (DAS, TIWARI, *et al.*, 2014). Vários fenômenos podem reduzir o valor da anisotropia vertical, mas a causa mais comum é a difusão rotacional. Essa difusão ocorre durante o estado excitado e desloca o dipolo de emissão do fluoróforo. Tal medida possibilita a medida dos ângulos relativos de excitação e emissão. Contudo o fluoróforo rotaciona diversas vezes em um intervalo de 1-10 nanossegundos, fazendo com que em uma solução com baixa viscosidade o resultado da medida seja randômico, e, portanto, o valor da anisotropia seja próximo a zero. A transferência de energia entre fluoróforos, e a ligação com uma macromolécula também diminui a anisotropia.

Por exemplo, é sabido que o tempo correlacional da anisotropia, que é o intervalo de tempo no qual uma molécula persiste numa dada orientação, para HSA é de 50 ns (SZMACINSKI, TERPETSCHNIG e LAKOWICZ, 1996), se essa se liga a um fluoróforo com anisotropia também de 50 ns, a anisotropia é diminuída, e assumindo que não houve nenhum outro fenômeno envolvido, é possível calcular a anisotropia esperada utilizando a equação de Perrin abaixo.

$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau/\theta)} \quad (4)$$

Portanto, nesta fórmula 4, r_0 representa a anisotropia medida na ausência de outros processos de despolarização, tais como a difusão rotacional ou transferência de energia, θ é o tempo de correlação rotacional do processo de difusão. No caso acima assumindo que $r_0 = 0,4$, a anisotropia esperada da ligação do fluoróforo na proteína é de 0,2 (adimensional). Proteínas pequenas possuem um pequeno tempo de correlação rotacional, e, portanto, baixa anisotropia, porém proteínas grandes na ligação com fluoróforos com longo tempo de emissão também possuem anisotropia pequena.

2.5- Aminoácidos dansilados

Um grupo de moléculas de interesse para investigação de reações proteicas/enzimáticas são os aminoácidos dansilados, este grupo possui a característica de deslocamento de comprimentos de onda do efeito ICT, sendo sensível a polaridade do meio de interação, e ao mesmo tempo são sondas fluorescentes que possuem interação com albuminas em sítios específicos (RYAN, GHUMAN, *et al.*, 2011), tornando possível análises de investigação de sítios de ligação, juntamente com a polaridade do meio. A estrutura de duas destas moléculas está representada na fig. 13. O aumento da polaridade do meio faz com que a taxa de decaimento não radiativo (K_{nr}) aumente, deslocando para maiores valores os comprimentos de onda de emissão deste grupo de moléculas (MALLICK, PAL e KONER, 2016).

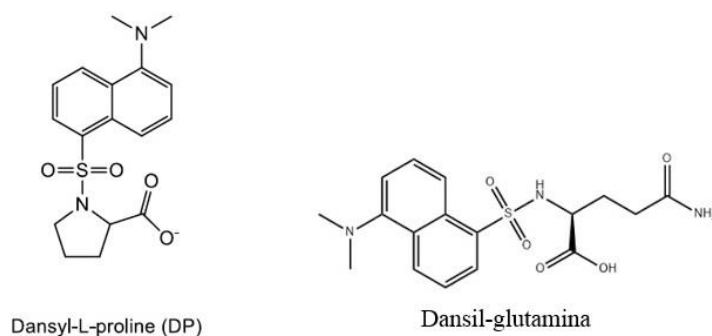


Figura 13. Representação das moléculas dansiladas, Dansil-L-Prolina e Dansil-Glutamina

2.6- Docking molecular

Na década de 70, com a criação da abordagem rotacional para o desenvolvimento de fármacos, os avanços nos estudos de purificação de proteínas e o acesso a computadores mais rápidos e com maior capacidade de armazenamento, possibilitou a criação de um banco de dados públicos com a estrutura de fármacos e proteínas denominado CADD, *Computer-Assisted Drug Design*, Design de Medicamentos Assistido por Computador, que vem sendo utilizado até hoje para o desenvolvimento de novos fármacos (BOTTEGONI, 2011).

Na década de 80, são criadas técnicas computacionais, que inicialmente faziam apenas a determinação da estrutura tridimensional de fármacos, e posteriormente

passaram a calcular a interação destes fármacos com proteínas, tais interações vieram a ser denominadas de *docking* molecular. Então no início dos anos 2000, a compreensão das estruturas e interações a nível molecular foi considerada fundamental a todos os mecanismos biológicos, tal importância se iniciou com Emil Fisher, o primeiro a utilizar o termo chave-fechadura para a interação entre a proteína e seu ligante, na sequência Paul Ehrlich afirmou que um fármaco não funciona sem uma interação (BOTTEGONI, 2011).

Antes do desenvolvimento do docking, fármacos eram confeccionados a partir de triagens de moléculas que se assemelhavam a compostos naturais, à estas moléculas eram adicionados ligantes variados a fim de encontrar novas aplicações medicamentosas.

O primeiro algoritmo de encaixe automático entre uma proteína e um ligante foi criado por Kuntz em 1982 (BOTTEGONI, 2011), através de interações com moléculas rígidas, sem levar em consideração das energias envolvidas, desde então vários programas foram sendo desenvolvidos, que possibilitaram inicialmente a flexibilização total do ligante, e na sequência a flexibilização parcial da proteína, tais desenvolvimentos somente foram possíveis à medida que os computadores foram ficando mais velozes.

Predizer a forma com que uma molécula pequena interage com uma proteína em seu sítio ativo é de fundamental importância para compreender o funcionamento das proteínas e possibilitar a criação de novos fármacos, sendo possível identificar a forma com que o ligante interage com os sítios ativos das proteínas, através do cálculo das energias de ligação e interação, definindo assim a ligação mais estável, bem como identificar a geometria de interação, e os resíduos de aminoácidos envolvidos. Na literatura, os softwares de docking mais utilizados são, SwissDock, COACH-D, EDock, MTiAutoDock e GOLD (YU, 2022).

O ponto crucial que tornou tais cálculos possíveis foi a obtenção de estruturas 3D das proteínas, tais estruturas são definidas a partir de experimentos práticos de difração de raios-X, DRX, e ressonância magnética nuclear, RMN, normalmente esta última técnica costuma resultar em representações de baixa resolução, porém é utilizada para estudo da flexibilidade da macromolécula (BOTTEGONI, 2011). Representações dentro do limite de 2,5Å são consideradas muito fiéis a realidade e de alta resolução, porém, não é apenas a resolução que deve ser considerada, mas também a integridade das estruturas, em alguns casos defeitos podem ser corrigidos por programas computacionais, mas quando estão em grande quantidade podem prejudicar os estudos de docking.

Normalmente estudos de interação entre a proteína e um ligante não levam em consideração toda a macromolécula, mas regiões muito específicas chamadas de sítio de

ligação, *ligand-binding pocket*, que normalmente são delimitados ao redor de ligantes cristalizados junto à proteína nos experimentos práticos.

Devido ao fato de as coordenadas de posicionamento dos hidrogênios de uma proteína não poderem ser determinadas através de experimentos práticos de DRX, estes são adicionados por software antes dos cálculos serem realizados. A utilização de moléculas de água nos cálculos de interação é controversa, existem autores que dizem que a presença de moléculas de água resultam em melhoras significativas dos resultados, pois auxiliam a ligação do ligante à proteína no sítio ativo, enquanto outros relatam não ser necessário a presença das moléculas de água nos cálculos (BOTTEGONI, 2011).

A fim de delimitar a quantidade exponencial de confôrmeros de uma molécula com vários pontos de rotação nos cálculos computacionais, os programas utilizam técnicas variadas para facilitar os cálculos de interação entre a proteína e um ligante, um exemplo é o algoritmo de construção incremental, que inicialmente define o ligante como um núcleo rígido com fragmentos flexíveis, o núcleo é encaixado no sítio ativo, e na sequência é adicionado as partes flexíveis (VAQUÉ, ARDEVOL, *et al.*, 2008).

Os softwares mais utilizados para cálculos de docking como, GOLD e AutoDock, utilizam o método randômico, ou estocástico, que são subdivididos em três metodologias: Monte Carlo, algoritmo genético e *tabu search*, todas buscam de forma aleatória encaixar uma pose do ligante no sítio ativo da proteína utilizando uma função de probabilidade pré-definida, quando ocorre a interação da primeira pose (menor energia), esta serve de ponto de partida para novas rodadas randômicas. A principal limitação destas metodologias é quando o ligante não se encaixa no local do ligante cristalizado, e desta forma não se obtém o resultado de pontuação do programa (VAQUÉ, ARDEVOL, *et al.*, 2008).

O método de Monte Carlo quando não obtém a menor energia na última conformação do ligante, é rodada uma função de probabilidade baseada em Boltzmann, que utiliza simulação de dinâmica de fluidos, se a conformação obtiver a menor energia, esta é pontuada, tal dinâmica é denominada critério de Metropolis, além disso, para identificar a melhor interação são rodadas simulações inicialmente em altas temperaturas, e as rodas subsequentes em menores temperaturas, este método é denominado recozimento, *annealing*, simulado de Monte Carlo, sendo o programa AutoDock o primeiro a utilizar tal metodologia de recozimento (VAQUÉ, ARDEVOL, *et al.*, 2008).

A metodologia de algoritmo genético utiliza metodologia derivada da genética para explorar o espaço conformacional dos ligantes, ao contrário do método de Monte

Carlo, inicialmente são inseridos no sítio da proteína diversas conformações do ligante, ou diversas variáveis de estado, cada conformação é a metáfora de um gene, o conjunto de todos os “genes” descreve o “genótipo”, e as coordenadas do resultado o “fenótipo”. Desta forma, programas como o GOLD, que utiliza tal metodologia, faz alterações miméticas de mutações, cruzamentos e migrações, tal como nos processos biológicos.

A terceira metodologia de busca aleatória, *tabu search*, impede que áreas já calculadas de pose do ligante seja calculada novamente, com a finalidade de favorecer a análise de novas conformações, para isso o programa realiza o cálculo de desvio quadrático médio da conformação, impedindo a realização de novos cálculos dentro de um limite do desvio calculado, Pro Leads e MVD são os softwares mais populares com tal metodologia (VAQUÉ, ARDEVOL, *et al.*, 2008).

Através destes estudos a ideia do sistema chave-fechadura foi modificada, pois foi observado que o sítio ativo da proteína adquire outra conformação para se adequar à interação com o ligante, tal sistema proposto por Koshland, foi denominado de teoria do ajuste induzido, *Induced Fit theory* (BOTTEGONI, 2011).

As etapas básicas para estudo de *docking* são: o download da proteína no banco de dados, PDB (*protein data bank*), abri-lo em um programa de visualização como o “*Discovery Studio*”, retirar da proteína as moléculas de água de cristalização, se esta for a abordagem que gera melhores resultados, e deletar qualquer molécula ou macromolécula que não faça parte da proteína desejada. Fazer o download do ligante, ou na maior parte das vezes desenhá-lo em um programa específico como o *chemdraw*, passar a molécula desenhada para o setor modelador 3D do programa para calcular a conformação de menor energia do ligante, que no caso do *chemdraw* utiliza como algoritmos de gradiente conjugado e Newton-Raphson, para encontrar a configuração de menor energia da molécula, segundo o manual do usuário, e salvar no formato .pdb. Inserir o arquivo da proteína no programa de *docking*, analisar a integridade do pdb, se necessário corrigir os erros, inserir os hidrogênios polares, introduzir cargas, inserir o ligante no programa, identificar os pontos de rotação do ligante e optar por deixar tais pontos fixos ou livres para rotacionar.

Historicamente o protocolo de *docking*, tanto proteína como o ligante, eram calculados em sua forma rígida, sem rotação, em seu estado de menor energia, na sequência os ligantes foram considerados como moléculas móveis, flexíveis, gerando resultados diferentes para cada tipo de conformação do ligante. Atualmente, existem

cálculos mais acurados que consideram a proteína também como uma macromolécula flexível, obtendo assim cálculos mais precisos de interação.

A identificação da região do sítio ativo da proteína varia em cada software, como exemplo podemos citar o AutoDock, que é definido através de uma caixa que o operador determina seus posicionamento, normalmente envolvendo os principais resíduos de aminoácidos do sítio, ou englobando todos os resíduos pertencente a ele; no caso do software GOLD, o posicionamento de onde será os cálculos e feito através da utilização de um ligante cristalizado, que passa por um estudo denominado de re-docking, que definirá as interações do ligante cristalizado com a proteína e validará tal interação, e a partir de então, todos os estudos de docking são realizados sobre o ligante cristalizado e os cálculos realizados de re-docking.

Após definir se o ligante entrará no sítio ativo da proteína, através das energias obtidas da interação, como resultado os softwares além de fornecerem os valores de energia, também fornecem todos os confômeros de menor energia, que são visualizados em softwares de visualização como o *Discovery Studio*, onde são feitos os tratamentos visuais para publicação, possibilitando mostrar todas as interações calculadas no programa de docking.

3- Objetivo Geral

Elucidar a interação entre a molécula quimiluminescente 3-(2'-espiroadamantil)-4-metoxi-4-(3''-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxetano (AMPPD) e a proteína albumina de soro humano (HSA) e os efeitos na emissão de luz desencadeados pela enzima fosfatase alcalina (ALP).

3.1- Objetivos específicos

- Estudar a interação entre a molécula quimiluminescente AMPPD e albuminas.
- Determinar os sítios de ligações.
- Aplicar docagem molecular para elucidação da interação.
- Elucidar os efeitos da presença de albuminas na performance da reação quimiluminescente disparada por ALP.
- Estudar a interação dos produtos da reação quimiluminescentes com a albumina.

4. Capítulo 1 - Artigo

O artigo apresentado nesta tese foi enviado à revista *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Chemistry* no dia 06/12/2024, revisado no dia 15/01/2025, aceito no dia 09/02/2025, e publicado online no dia 15/02/2025, e está disponível no seguinte DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2025.116339>, desta forma, o formato de escrita a seguir está de acordo com as instruções e diretrizes desta revista.

A albumina amplifica a quimioluminescência do dioxetano (AMPPD) desencadeada pela fosfatase alcalina: luz emergindo das cavidades das proteínas

Leonardo Almeida Barizon¹, Maurício Ikeda Yogui¹, Aguinaldo Robinson de Souza¹, Nelson

Henrique Morgon² and Valdecir Farias Ximenes^{1,*}

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru, São Paulo, Brazil.

² Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

*A correspondência deverá ser endereçada ao Dr. Valdecir Farias Ximenes

4.1 Resumo gráfico

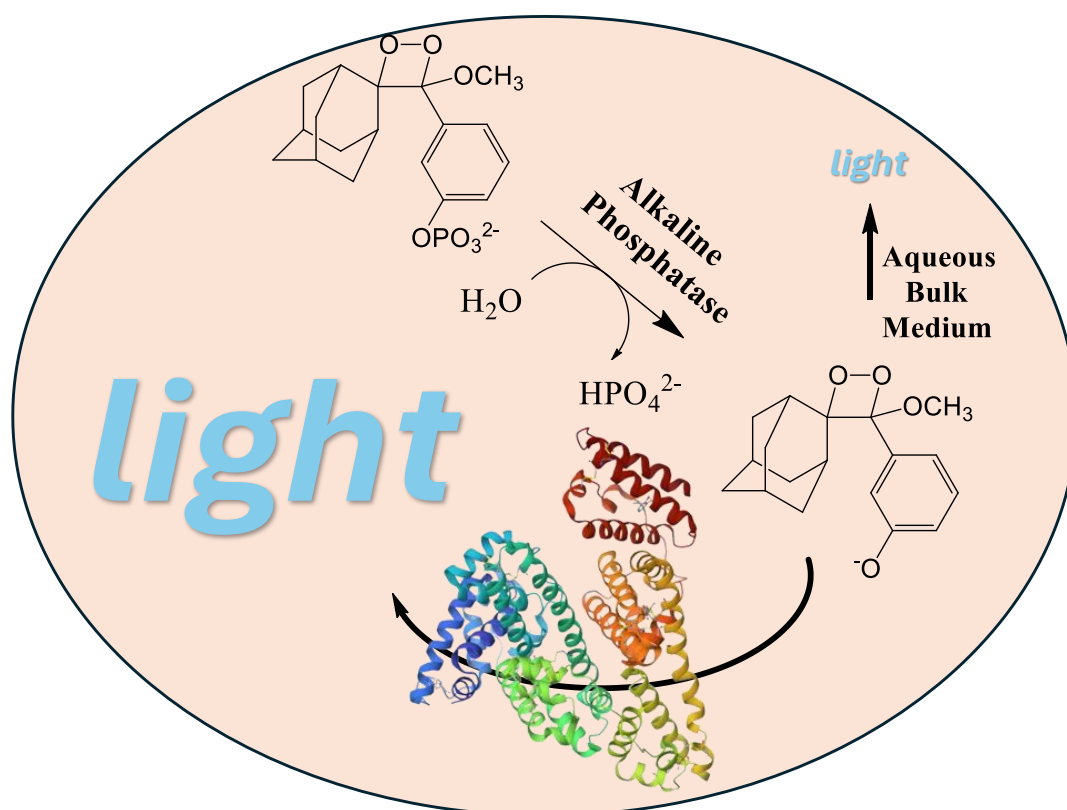


Figura 14. Resumo gráfico da reação de clivagem do AMPPD e interação com HSA emitindo luz.

4.2 - Resumo

AMPPD é uma abreviação de 3-(2'-espiroadamantil)-4-metoxi-4-(3-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxetano, um derivado termicamente estável de 1,2-dioxetano amplamente utilizado em laboratórios clínicos para imunoenaios enzimáticos devido às suas propriedades quimioluminescentes. AMPPD é um substrato para fosfatase alcalina (ALP), a enzima que catalisa a remoção do grupo fosfato de AMPPD, desencadeando a emissão de luz. Este estudo investigou o impacto das albuminas no sistema AMPPD:ALP e descobriu que a albumina sérica humana (HSA) aumenta a eficiência de emissão de luz de AMPPD:ALP em cerca de 100 vezes. A eficiência do aumento de luz variou dependendo do tipo de albumina, com albuminas séricas bovina (BSA), suína (PSA) e de coelho (RSA) sendo menos eficazes do que HSA. Conduzimos experimentos para demonstrar que, uma vez hidrolisado por ALP, o AMPPD desfosforilado difunde-se para o sítio I de HSA. Ao estudar as propriedades fotofísicas do éster fenólico gerado após a clivagem de AMPPD, descobrimos que sua complexação com HSA causou um aumento significativo em sua eficiência fluorescente, o que explica a amplificação da quimioluminescência. A transferência de energia de ressonância do éster fenólico excitado para a cumarina-153 foi detectada, confirmando a presença de ambas as moléculas na cavidade da proteína. Portanto, a introdução de receptores fluorescentes no sistema de reação pode ajustar o comprimento de onda de emissão. Além da primeira evidência direta da albumina como um intensificador para quimioluminescência, os resultados destacam a interferência potencial das albuminas em ensaios mediados por AMPPD e novas aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Quimioluminescência; AMPPD; Albumina sérica humana; Fosfatase alcalina; Transferência de energia de ressonância; Intensificador de luz.

4.3 - Introdução

A quimioluminescência é o processo de produção de luz a partir de uma reação química exotérmica. Durante esse processo, parte da energia liberada excita o produto para um estado eletrônico de maior energia. Posteriormente, o produto excitado deve liberar essa energia de forma eficiente como luz por meio de fluorescência ou fosforescência [1,2]. No entanto, atender a todas as três condições - exotermicidade, geração eficiente de estado excitado e rendimento quântico radiativo significativo de produtos - é raro. Como resultado, a quimioluminescência não é tão comum quanto os milhões de outras reações químicas exotérmicas conhecidas. No entanto, é essa característica particular que torna as reações quimioluminescentes tão benéficas no desenvolvimento de bioensaios. Na verdade, considerando esses requisitos, é menos provável que os compostos presentes no meio de reação sejam suscetíveis à quimioluminescência. Além disso, a quimioluminescência não requer excitação de luz, o que reduz a interferência da autofluorescência. Assim, a relação sinal-ruído é geralmente significativamente maior do que em métodos baseados em absorbância e fluorescência [3–7].

Entre as vias de reação para gerar estados excitados, a clivagem de peróxidos é central, estando presente na maioria das reações quimioluminescentes conhecidas. Isto é particularmente verdadeiro para o peróxido cíclico, os compostos 1,2-dioxetano presentes na maioria dos processos quimioluminescentes [1,8]. Nesta preocupação, uma das moléculas quimioluminescentes mais bem-sucedidas é o 1,2-dioxetano estável denominado 3-(2'-espiroadamantil)-4-metoxi-4-(3-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxetano e amplamente conhecido como AMPPD. O uso comercial generalizado de AMPPD depende da estabilidade térmica da molécula. A remoção do grupo fosfato é o passo inicial na desestabilização de AMPPD, levando à clivagem do anel de dioxetano. Esta clivagem produz um éster eletronicamente excitado, levando à emissão de luz através de decaimento radiativo [9]. O esquema da fig. 15 descreve a equação química estabelecida para o processo e o papel da enzima fosfatase alcalina (ALP) como um catalisador [10,11]. Assim, a atividade da enzima pode ser correlacionada com a emissão de luz, um processo químico com muitas utilidades biotecnológicas [9,11–13]. A ALP conjugada com anticorpos é comumente usada como um marcador para rastrear reações imunológicas e tem uma ampla gama de aplicações. Este sistema de detecção tem sido usado para desenvolver ensaios para doenças infecciosas, marcadores tumorais,

hormônios, fertilidade, enzimas cardíacas e muitos outros. Por exemplo, o CL-2000i® Chemiluminescence Immunoassay System (Mindray), um sistema robótico comercial baseado na luminescência AMPPD, é amplamente utilizado em laboratórios clínicos.

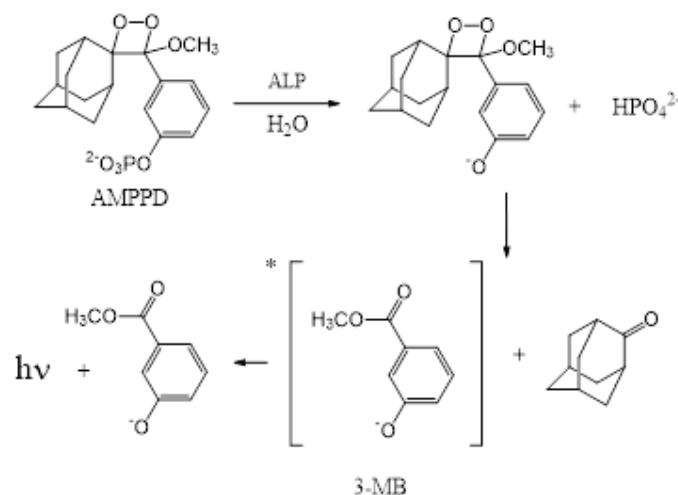


Figura 15. Emissão de luz da decomposição de AMPPD desencadeada por ALP. 3-metil benzoato (3-MB) é a espécie gerada no estado excitado [10].

A outra biomolécula central neste estudo é a albumina sérica humana (HSA), a proteína mais abundante no soro sanguíneo. Ela desempenha inúmeras funções fisiológicas, sendo uma das mais importantes seu papel como proteína transportadora de substâncias naturais e estranhas [14,15]. As albuminas séricas têm cavidades específicas para reter as moléculas que carregam, permitindo que funcionem como transportadoras de fármacos. Os bolsos de ligação mais conhecidos são denominados Sítio I e Sítio II, localizados nos subdomínios IIA e IIIA, respectivamente. Eles também são denominados sítios de fármacos 1 (DS1) e 2 (DS2) devido ao grande número de fármacos com preferência por DS1 como varfarina e fenilbutazona e DS2 para anti-inflamatórios como ibuprofeno, naproxeno e benzodiazepínicos como diazepam [16]. A HSA também é a principal proteína plasmática sanguínea para transporte de ácidos graxos [17].

Devido à ampla aplicação de AMPPD como um substrato quimioluminescente em meios biológicos complexos [9,11–13], queríamos investigar se a presença de proteínas sanguíneas poderia afetar essas reações, potencialmente levando a resultados falso-positivos ou negativos. Não seria surpreendente se AMPPD interagisse com HSA, que tem uma forte capacidade de se ligar a vários compostos. Com base nessa hipótese, nosso trabalho apresenta um estudo detalhado de como AMPPD interage com HSA e seu impacto na emissão de luz desencadeada por ALP. A principal descoberta foi que a

emissão de luz foi significativamente amplificada na presença de HSA, em cerca de 100 vezes. O mecanismo por trás desse efeito fotofísico também foi explicado.

4.4 - Materiais e métodos

4.4.1 - Produtos químicos e proteínas

Albumina sérica humana, livre de ácidos graxos e globulina (A3782); albumina sérica bovina, livre de ácidos graxos e globulina (A7030); albumina sérica suína (A1830); albumina sérica de coelho, essencialmente livre de globulina (A0764); fosfatase alcalina da mucosa intestinal bovina (P6774), 2,3,6,7-tetraidro-9-(trifluorometil)-1H,5H,11H-[1]benzopirano(6,7,8-ij)quinolizin-11-ona (cumarina 153), 4-(dicianometileno)-2-metil-6-(4-dimetilaminoestiril)-4H-pirano (DCM), metil 3-hidroxibenzoato, metil 4-hidroxibenzoato, varfarina, ibuprofeno, dansil-glutamina e dansil-prolina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Soluções estoque (10 mM) de varfarina e ibuprofeno foram preparadas em etanol. Soluções estoque (10 mM) de C153 e DCM foram preparadas em DMSO. 3-(2'-spiroadamantil)-4-metoxi-4-(3-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxetano (AMPPD) foi adquirido da Hzymes Biotech (China). Uma solução estoque (25 mM) foi preparada em água. Água Milli-Q ultrapura da Millipore (Belford, MA, EUA) foi usada para preparar os tampões e soluções.

4.4.2 - Reações quimioluminescentes

As reações foram conduzidas em um luminômetro de microplacas (Centro LB 960 Microplate Luminometer, Berthold Technologies, EUA) usando microplacas pretas de 96 poços e fundo plano. As condições de reação variaram e são descritas nas legendas das figuras para avaliar a influência de cada reagente. O AMPPD comercial (25 mM) foi diluído conforme necessário para cada ensaio. As soluções de ALP foram diluídas no tampão imediatamente antes dos ensaios. O ALP comercial é uma solução tamponada contendo 14,4 mg/mL de proteína e atividade enzimática de 3521 unidades/mg de proteína, ou seja, a solução compreende ALP 50702 u/mL. A atividade final do ALP neste trabalho foi de 50-100 u/mL. Albumina sérica humana (HSA), albumina sérica bovina (BSA), albumina sérica suína (PSA) e albumina sérica de coelho (RSA) foram dissolvidas em tampão Tris 50 mM a pH 7,0 para dar uma solução estoque 1,0 mM. As reações foram conduzidas em tampão Tris 50 mM na faixa de pH 7,0 – 10,0 ou, em casos específicos, em tampão carbonato e borato 50 mM, pH 9,0. O volume final da reação foi de 200 µL.

O disparo da reação foi realizado pela adição de AMPPD ou ALP através do injetor automático. Para experimentos na presença de 1,4-dioxano, as condições foram as mesmas, e a albumina foi substituída pelo solvente (0 – 10% v/v).

4.4.3 - Espectros de quimioluminescência e transferência de energia

Os espectros de quimioluminescência foram registrados, sem o uso de filtros, analisados todos os fótons emitidos não importando o comprimento de onda emitido, usando um leitor de microplacas multimodo híbrido no modo de luminescência (Synergy H2, BioTek, EUA). As condições de reação foram: ALP 100 U/ml, HSA 5,0 μ M, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C. Quando presentes, a concentração final das sondas fluorescentes cumarina 153 (C153) e DCM foi de 5,0 μ M. Os espectros de quimioluminescência foram obtidos após 5 minutos do início das reações.

4.4.4 - Determinação das constantes de associação

As constantes de associação foram medidas pela extinção da fluorescência intrínseca da albumina com AMPPD. As proteínas usadas foram HSA e BSA. A excitação foi definida em 295 nm e a emissão foi de 310 a 410 nm. Uma concentração fixa de albumina (5,0 μ M) foi titulada com AMPPD (0 - 15,0 μ M) em Tris 50 mM, pH 7,0, 37°C. As larguras das fendas foram de 10 nm para ambas as excitações e comprimentos de onda de emissão, e uma cubeta de quartzo de 3 mL com um comprimento de caminho de 10 mm e agitada magneticamente foi usada nas medições. Após cada adição de AMPPD, as misturas foram incubadas por 2 min antes das medições de fluorescência. As intensidades fluorescentes foram corrigidas para o efeito do filtro interno causado pela atenuação dos sinais de excitação e emissão provocados pela absorção de luz de AMPPD usando a Equação 1. F_{corr} e F_{obs} são as intensidades de fluorescência corrigidas e observadas nesta equação, respectivamente. A_{bex} e A_{bem} são as absorbâncias da mistura no comprimento de onda de excitação e emissão, respectivamente. Os espectros de absorbância foram medidos usando um espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 35 UV-visível (Shelton, CT, EUA). Os espectros de fluorescência foram obtidos usando um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Shelton, CT, EUA). Após corrigir o efeito do filtro interno, a

Equação 2 foi usada para obter as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e a constante de extinção bimolecular (k_q). A vida útil da fluorescência da albumina (τ_o) foi assumida como sendo 6 ns [18]. Nesta equação, F_0 e F são a intensidade da fluorescência na ausência e presença do *quencher* (Q). As constantes de associação foram obtidas plotando os dados experimentais na Equação 3, onde P é a concentração de proteína e L é a concentração do ligante adicionado (AMPPD). F_∞ é a fluorescência em uma concentração de saturação de L. A constante de associação (K_a) foi obtida como o inverso da constante de dissociação (K_d). O ajuste linear para as constantes de Stern-Volmer foi obtido usando o GraphPad Prism versão 7.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{\frac{(Ab_{ex} + Ab_{em})}{2}} \quad (1)$$

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} * [Q] = 1 + k_q * \tau_o * [Q] \quad (2)$$

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_\infty} = \frac{[P] + [L] + K_d - \sqrt{([P] + [L] + K_d)^2 - 4[P][L]}}{2[P]} \quad (3)$$

4.4.5 - Determinação do Sítio de Ligação

A afinidade comparativa de AMPPD para os sítios de ligação em HSA e BSA foi estudada usando dansil-glutamina, um marcador do sítio I, e dansil-prolina, um marcador do sítio II [19]. Os aminoácidos dansil (20 μ M) foram incubados com HSA (20 μ M) em Tris 50 mM, pH 7,0, 37°C. Então, o meio de reação foi titulado com AMPPD, e a alteração nos espectros de fluorescência dos aminoácidos dansil foi avaliada. A excitação foi ajustada em 340 nm, e a emissão foi de 400 a 600 nm. Os resultados foram apresentados como a porcentagem de deslocamento medindo a diminuição da fluorescência.

4.4.6 - Simulações de Docking Molecular

Os estudos de docking molecular foram realizados no software GOLD 2024.2 (Genetic Optimization for Ligand Docking) sob o parâmetro chemscore_kinase com a

função de classificação GoldScore. Os estudos de docking foram realizados exclusivamente no sítio 1 dos fármacos HSA, no qual foi selecionada a estrutura cristalográfica deste complexado com ácido iofenólico (PDB: 2YDF). Esta estrutura cristalográfica tem resolução de 2,75 Å e é livre de ácido graxo. A classificação do software consiste em escolher a melhor estrutura entre as dez disponíveis no programa, sendo esta escolha devida à sobreposição e valor de classificação mais próximo da média total. O HSA foi preparado para estudos de docking adicionando átomos de hidrogênio, removendo água e inibidores cocrystalizados. No sítio I, foi estabelecida uma circunferência de raio de 7 Å a partir do centro do ácido iofenólico para interações de docking e a molécula estudada dockou na mesma posição. As interações proteína-ligante e as imagens foram obtidas usando o Discovery Studio 2024 (DS) e o software LigPlot+.

4.4.7 - Simulações DFT

Otimizações geométricas: Todas as geometrias moleculares foram totalmente otimizadas sem restrições de simetria no nível da teoria funcional da densidade (DFT). A função de troca-correlação B3LYP foi empregada. Todos os átomos foram descritos usando o conjunto de base 6-311++G(2d,p) de Pople, juntamente com as correções de dispersão de Grimme e a função de amortecimento de Beck-Jonson. Os efeitos do solvente foram contabilizados usando o modelo SMD. Os cálculos teóricos podem, portanto, ser descritos como: B3LYPGD3(BJ)/6-311++G(2d,p) + SMD(Solvente). Os cálculos de frequência vibracional harmônica foram realizados nas geometrias otimizadas, confirmando todas as estruturas como mínimos na superfície de energia potencial.

Espectros Eletrônicos: Cálculos de espectros eletrônicos UV-Vis foram realizados nas geometrias previamente otimizadas, mas no nível teórico: PBE0-GD3(BJ)/6-311++G(3df,2p) +SMD(Solvente). Todos os cálculos foram realizados usando o programa Gaussian16

4.5 - Resultados e Discussão

4.5.1 - Efeito da HSA na eficiência da quimioluminescência

A Fig. 16 exibe o perfil de emissão de luz da hidrólise de AMPPD catalisada por ALP. A emissão foi dependente de AMPPD e ALP. Este é o comportamento esperado para este sistema [10]; no entanto, a adição de HSA causou um efeito inesperado na eficiência de emissão. De acordo com os dados, a presença de HSA causou um aumento de mais de duas ordens de magnitude em comparação com ALP sozinha. Este resultado foi inesperado, pois a interação de AMPPD com HSA poderia potencialmente limitar o acesso a ALP e, como resultado, diminuir a eficiência de hidrólise.

Uma possível explicação para essas descobertas experimentais é que HSA pode ter um efeito catalítico, apesar de sua atividade esterase menor e não específica [20]. No detalhe da Fig. 16, é evidente que a emissão de luz causada pela ação catalítica de HSA sozinho foi menor do que a de ALP. Além disso, é importante notar que, embora uma avaliação visual do detalhe da Fig. 16 possa sugerir que a atividade catalítica inespecífica de HSA era semelhante à de ALP, é crucial considerar que a concentração de HSA usada estava na faixa micromolar, enquanto ALP estava na faixa nanomolar. Em resumo, o efeito esterase não específico de HSA não foi responsável pelo aumento da emissão. Mais evidências mostrando que o efeito de HSA não estava relacionado à sua atividade esterase não específica serão fornecidas mais adiante neste trabalho.

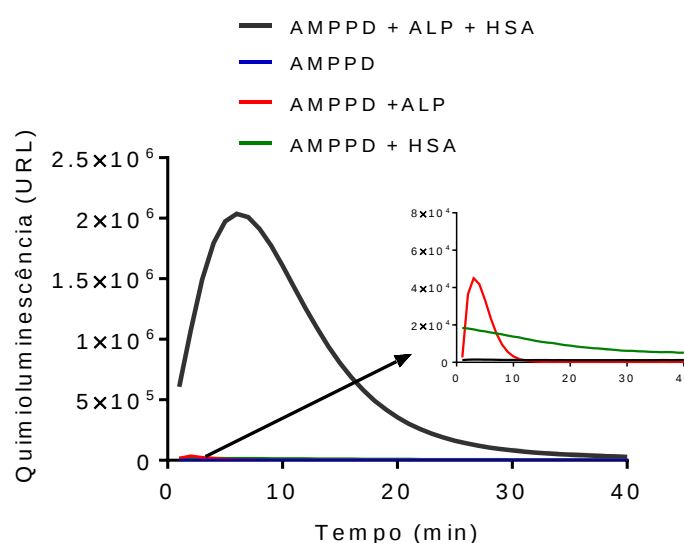


Figura 16. Emissão dependente do tempo da hidrólise de AMPPD catalisada por ALP e o efeito de HSA. Condições experimentais: ALP 50 U/ml, AMPPD 6,25 μ M, HSA 5,0 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C.

4.5.2 - Otimização da reação

Como esperado para uma reação catalisada por ALP, a eficiência da emissão de luz foi otimizada em pH alcalino. Especificamente, três tampões adequados para pH 9,0 foram comparados. A Fig. 17A mostra que os tampões Tris e carbonato foram mais eficientes do que borato. Além disso, independentemente do tampão usado, o efeito do HSA estava sempre presente. Com base nesses resultados, o tampão Tris foi selecionado para estudos posteriores. A Fig. 17B mostra a eficiência da emissão de luz de pH 7,0 a 10,0 usando tampão Tris e, a partir desses dados, o pH 9,0 foi escolhido.

A eficiência da emissão de luz também foi dependente da concentração de AMPPD. Os resultados na Fig. 18 mostram a cinética da emissão de luz na presença (18A) e ausência (18B) de HSA em concentrações crescentes de AMPPD. Conforme mostrado, independentemente da concentração de AMPPD, o HSA causou um aumento de duas ordens de magnitude na quimioluminescência.

A emissão de luz foi medida em concentrações crescentes de HSA e ALP fixo (Fig. 19). Na concentração de ALP usada, a cinética típica de brilho duradouro da emissão de luz do sistema ALP/AMPPD pode ser vista [11]. Corroborando com relatórios anteriores, o brilho persiste de minutos a horas, dependendo da concentração de AMPPD e ALP. A adição de HSA causou um aumento progressivo na emissão, atingindo a saturação em torno de 5,0 μM .

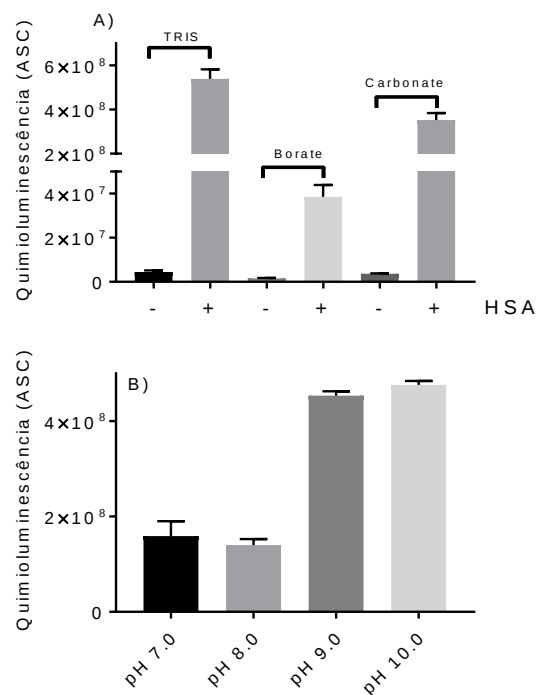


Figura 17. Efeito do pH e da natureza do tampão na emissão de luz devido à hidrólise de AMPPD catalisada por ALP na presença de HSA. A) Constituição do tampão (50 mM) em pH fixo 9,0. B) Emissão de luz integrada usando tampão Tris (50 mM) e pH de 7,0 a 10,0. Condição experimental: HSA 5,0 μ M, ALP 50 U/mL, AMPPD 6,25 μ M, 37 °C. Os resultados são exibidos como a média e o desvio padrão de três experimentos replicados.

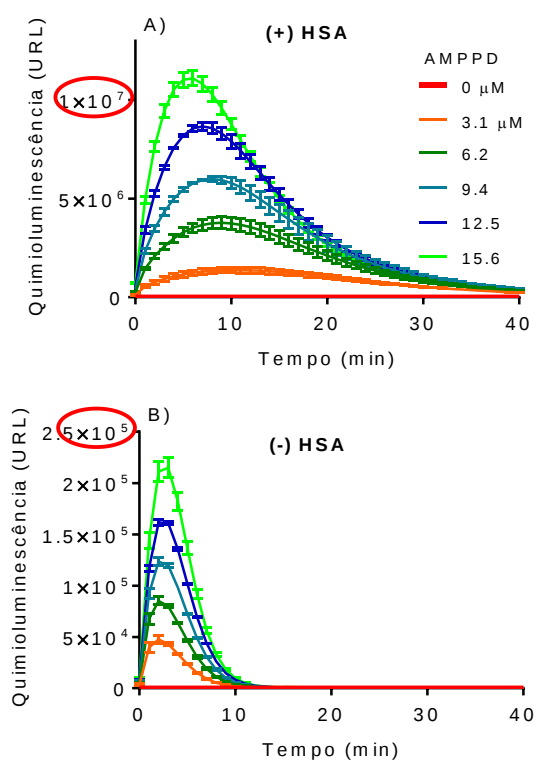


Figura 18. Efeito da concentração de AMPPD na emissão de luz. (A) Presença e (B) ausência de HSA. Condição experimental: HSA 5,0 μ M, ALP 50 U/mL, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C.

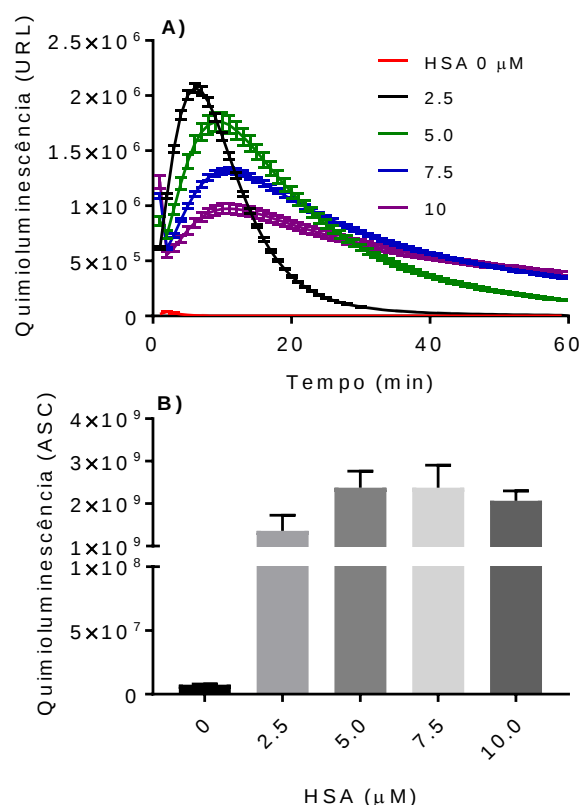


Figura 19. Efeito de HSA na emissão de luz devido à hidrólise de AMPPD catalisada por ALP. A) Emissão dependente do tempo e B) Emissão de luz integrada. Condições experimentais: ALP 50,0 U/ml, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C e HSA conforme indicado.

4.5.3 - Comparação entre albuminas de diferentes organismos

Os resultados anteriores sugerem que AMPPD (ou seu produto de hidrólise) pode se ligar aos locais de ligação da albumina de uma maneira dependente da concentração. Para investigar isso mais a fundo, o efeito da albumina de várias espécies foi testado. Albumina sérica de humanos (HSA), bovinos (BSA), coelhos (RSA) e suínos (PSA) foram comparadas. Essas albuminas apresentam alta homologia, mas também algumas diferenças em relação às afinidades do ligante [21] e hidrofobicidade [22]. Por exemplo, as proteínas maduras contêm 585 aminoácidos (HSA), 583 (BSA) e 584 (RSA). As identidades gerais da sequência de BSA e RSA, em comparação com HSA, são 75,6% e 74,2%, respectivamente [23]. Curiosamente, o aumento na emissão de luz foi significativamente maior para a proteína humana (Fig. 20A e 20B). Este resultado reforça que essas descobertas não estão relacionadas à atividade de hidrolase da albumina. De fato, a HSA tem uma constante de Michaelis igual (K_m) e uma constante de turnover

menor (k_{cat}) em comparação com a BSA em relação ao efeito catalítico hidrolítico [20]. Assim, se uma atividade hidrolítica não específica fosse responsável pelo aumento da luz, a BSA deveria ser tão eficaz quanto a HSA, o que não foi o caso. Em segundo lugar, essa descoberta reforçou nossa proposta de interação entre o produto de hidrólise do AMPPD e os sítios de ligação das albuminas, uma vez que a afinidade de ligação pode diferir entre essas albuminas homólogas, justificando os resultados. A segunda melhor albumina foi a PSA, seguida pela RSA. A Fig. 21 compara HSA e BSA em concentrações crescentes de ALP. Como era de se esperar, a emissão de luz foi proporcional à concentração de ALP, e o efeito da HSA foi confirmado, sendo significativamente maior em comparação com a BSA. Esses resultados selecionaram HSA e BSA, o melhor e o pior, para estudos posteriores. As seções a seguir apresentarão as afinidades de ligação relativas para HSA e BSA.

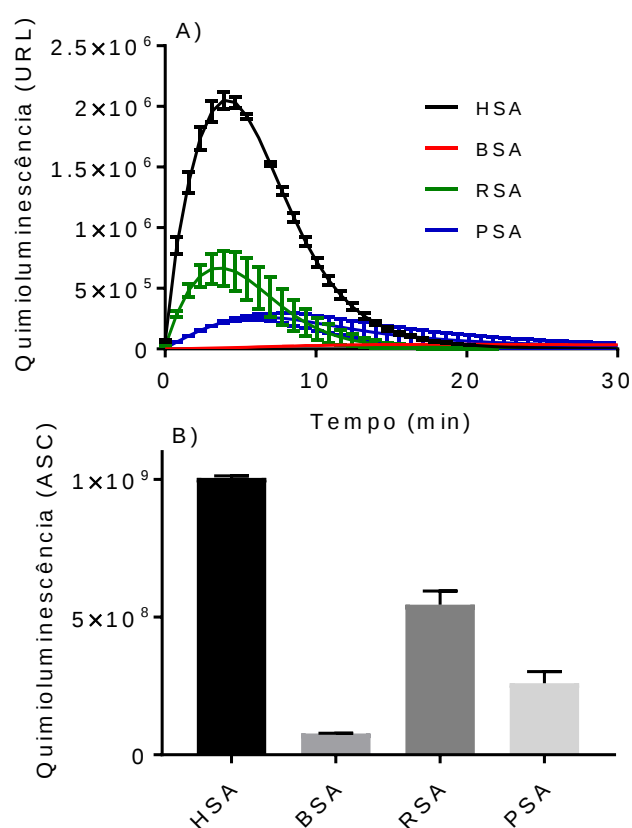


Figura 20. Efeito das diferentes albuminas na emissão de luz devido à hidrólise de AMPPD catalisada por ALP. A) Emissão dependente do tempo e B) Integral da emissão de luz. Condições experimentais: ALP 50,0 U/mL, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C, e albuminas 5,0 μ M.

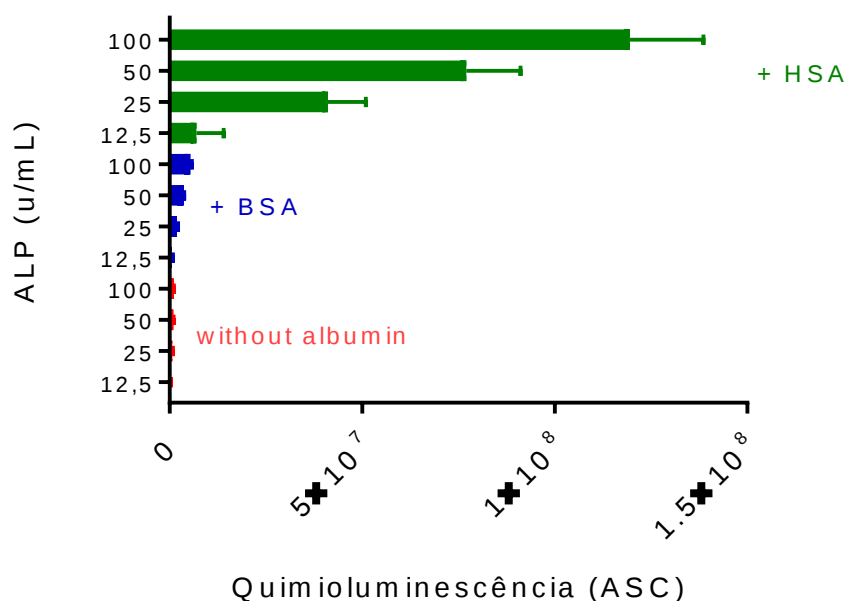


Figura 21. Emissão de luz versus atividade ALP na presença e ausência de albumina. Condições experimentais: AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, HSA 5,0 μ M, BSA 5,0 μ M, 37°C.

4.5.4 - Competição: HSA versus BSA

Considerando que HSA não estava catalisando a hidrólise de AMPPD, a questão em aberto era como ela aumentava a emissão de luz. Assim, o mecanismo pelo qual a ALP catalisa a hidrólise de ésteres de fosfato deve ser considerado para abordar esta questão. ALP é uma metaloenzima homodimérica contendo dois íons de zinco e um de magnésio em cada sítio ativo. A reação ocorre por meio do mecanismo de deslocamento duplo, também conhecido como mecanismo de pingue-pongue, pelo qual o substrato entra no sítio ativo, levando a um complexo intermediário (catálise covalente). Então, uma molécula de água acessa o sítio ativo e promove a hidrólise. Em suma, o substrato, por exemplo, p-nitrofenil fosfato, deve acessar o sítio ativo de ALP [24]. Para a hidrólise de AMPPD, os detalhes do mecanismo enzimático de desfosforilação não foram estudados, mas pode-se supor que sejam semelhantes. De fato, a ALP é considerada uma "enzima promíscua" ao aceitar diferentes ésteres de fosfato como substratos [25].

Com base nessas características da hidrólise catalisada por ALP, parece evidente que a reação com AMPPD deve ocorrer dentro do sítio ativo da enzima, onde HSA não teria acesso. Portanto, pode-se conceber que o aumento de luz observado deve estar relacionado à interação da proteína com o ânion fenolato de dioxetano originado pela

hidrólise de AMPPD (fig. 15). Portanto, hipotetizamos que o produto da hidrólise de AMPPD se difundiria para o meio e acessaria os sítios de ligação da albumina. A estabilidade relativa dessa espécie apoia essa proposta, pois, dependendo do ambiente, o ânion fenolato de dioxetano é moderadamente estável, com meia-vida para decomposição de 2 a 30 minutos. Notavelmente, essa característica é responsável pela cinética de brilho típica da emissão de luz da hidrólise de AMPPD [11].

Com base nos conceitos dos parágrafos acima, um experimento de competição foi concebido buscando evidências de que o produto de hidrólise de AMPPD estava se difundindo para o sítio de ligação do HSA. A ideia era adicionar BSA como um competidor e medir o efeito na emissão de luz. Nesta configuração experimental, o produto de hidrólise de AMPPD poderia ser compartilhado por ambas as proteínas (veja o esquema na Fig. 22). Como BSA era muito menos capaz de aumentar a emissão de luz (Fig. 21), ele deveria promover um efeito de extinção. Os resultados descritos na Fig. 22 confirmaram nossas expectativas, pois a emissão de luz foi progressivamente extinta pelo aumento da concentração de BSA. Em resumo, este resultado mostra que após a produção por hidrólise catalisada por ALP, o ânion fenolato de dioxetano se difunde para o meio, entrando nos sítios de ligação das albuminas.

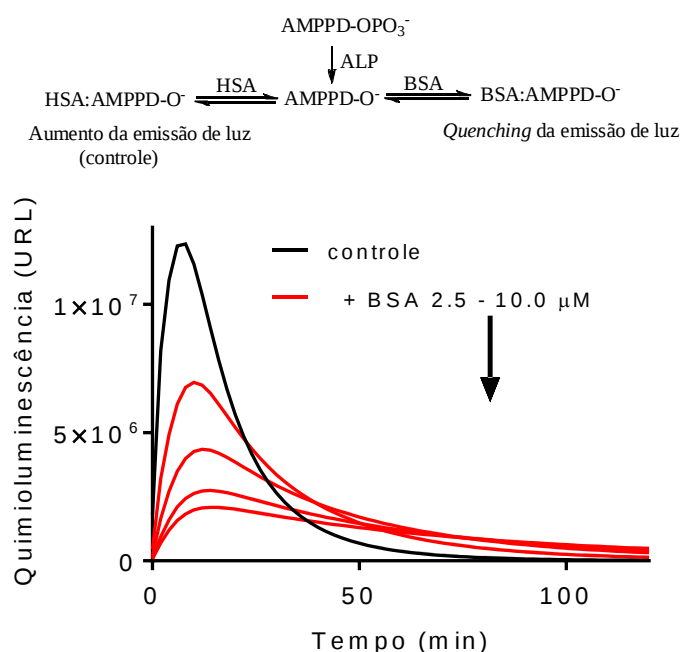


Figura 22. O efeito de quenching da BSA na emissão de luz devido à hidrólise de AMPPD catalisada por ALP na presença de HSA. O esquema descreve a proposta para uma competição entre HSA e BSA para o AMPPD desfosforilado. Controle: HSA 5,0 μM , ALP 100,0 U/ml, AMPPD desfosforilado. Controle: HSA 5,0 μM , ALP 100,0 U/ml, AMPPD 6,25 μM , Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C.

4.5.5 - Constantes de associação de AMPPD com albuminas

Com base nas descobertas anteriores, propusemos que o ânion fenolato de dioxetano (fig. 15) poderia se difundir para as cavidades HSA. Este ambiente favorável deve ser responsável pelo aumento da emissão de luz. Portanto, o próximo passo foi determinar a afinidade de AMPPD pelas albuminas. As constantes de associação foram determinadas medindo a fluorescência intrínseca da albumina e o efeito de extinção da ligação com AMPPD. Confirmando a expectativa, as Figs. 23A e 23B mostram que as intensidades de fluorescência intrínseca da proteína foram diminuídas pela adição de AMPPD. Ainda mais importante, HSA foi claramente mais suscetível a AMPPD do que BSA.

A Fig. 23C mostra o gráfico a partir do qual as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) foram calculadas, resultando em $1,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (HSA) e $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (BSA) usando a Equação 2. Vale a pena notar que esse resultado não foi devido a um efeito trivial de filtro interno, uma vez que o AMPPD absorve luz UV abaixo de 280 nm, mas, de qualquer forma, as medições de fluorescência foram corrigidas usando a Equação 1 antes do cálculo do K_{sv} .

A partir dos valores de K_{sv} e assumindo a vida média do triptofano na albumina em torno de 6 ns, as constantes de extinção bimoleculares (k_q) resultaram em aproximadamente $10^{12} - 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Equação 2). Como esse valor é maior do que a constante máxima de extinção de colisão de dispersão ($\sim 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$), o mecanismo de extinção pode ser considerado um processo estático [18]. Em outras palavras, a extinção deve ser causada pela formação de um complexo de estado fundamental entre AMPPD e as albuminas. Com base nessas descobertas, os dados de *quenching* foram usados para calcular as constantes de associação (K_a) ajustando os dados experimentais na Equação 3, resultando em $2,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (HSA) e $1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (BSA) (Fig. 23D). Essas magnitudes das constantes de associação são típicas de ligantes de albuminas, por exemplo, mesalazina ($3,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) [26], varfarina ($2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) [27] e naproxeno ($3,8 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}$) [28], levando à conclusão de que AMPPD pode ser considerado um ligante de albuminas, como assumimos anteriormente. A segunda descoberta importante é que AMPPD foi um ligante melhor de HSA do que BSA, o que é consistente com o anterior, onde HSA foi um intensificador muito melhor de emissão de luz.

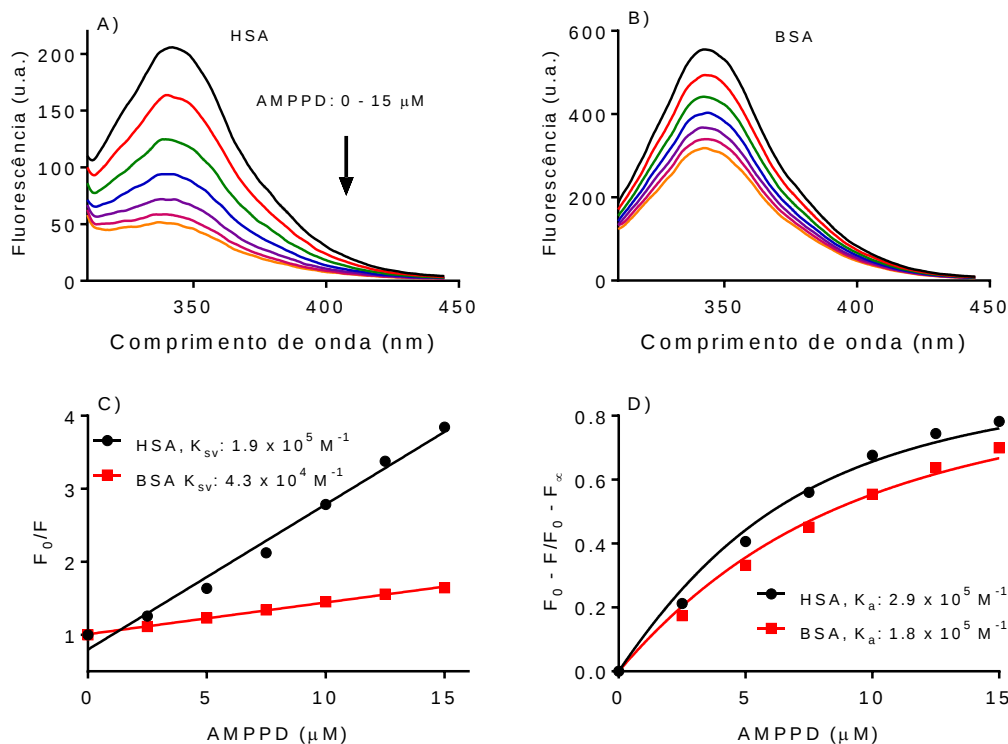


Figura 23. Extinção da fluorescência da albumina devido à complexação com AMPPD e cálculo das constantes de Stern-Volmer e de associação. (A,B) Espectros de fluorescência da albumina e o efeito de extinção devido à adição de AMPPD. C) Gráfico de Stern-Volmer e D) curva isotérmica para cálculo das constantes de ligação. Veja as Equações 1-3 para detalhes. Condição experimental: HSA e BSA 5,0 μM, AMPPD conforme indicado, Tris 50 mM, pH 7,0, 37°C.

4.5.6 - Determinação de sítios de ligação preferenciais

Uma vez que AMPPD é um ligante de HSA, a próxima questão imediata é onde, ou seja, qual sítio de ligação é o mais apropriado para acomodar o AMPPD. Para responder a essa questão, os marcadores de sítio fluorescentes dansil-glutamina (sítio I) e dansil-prolina (sítio II) foram empregados [19,29]. A Fig. 24 mostra o comportamento típico da complexação desses aminoácidos fluorescentes em HSA, ou seja, um aumento significativo da fluorescência e deslocamento do comprimento de onda para o azul. Então, a adição de um ligante competitivo causa diminuição da fluorescência devido ao deslocamento competitivo [19,29]. Como mostrado, AMPPD foi um melhor deslocador de dansil-glutamina, evidenciando sua preferência pelo sítio de ligação I de HSA.

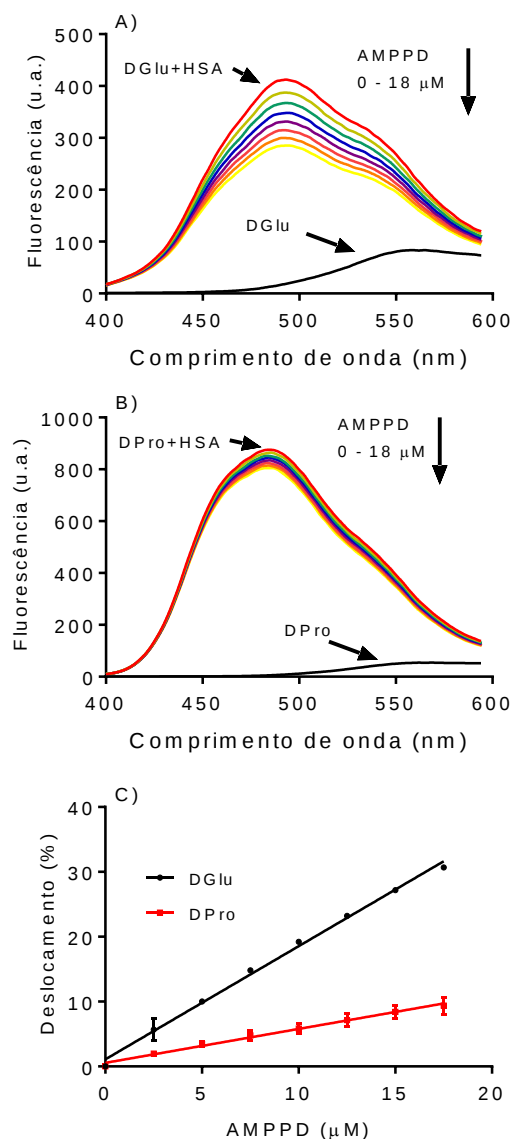


Figura 24. Determinação do sítio de ligação de AMPPD em HSA. (A, C) Deslocamento competitivo de dansil-glutamina (DGlu, sítio I) e (B, C) dansil-prolina (DPro, sítio II) de HSA. Condição experimental: HSA 20 μM , DGlu 20 μM , DPro 20 μM e AMPPD conforme indicado, Tris 50 mM, pH 7,0, 37 °C. A excitação foi ajustada em 340 nm.

Evidências adicionais da preferência de AMPPD para ligação no sítio I de HSA foram obtidas estudando o efeito dos fármacos varfarina (sítio I) e ibuprofeno (sítio II) na quimioluminescência desencadeada pela hidrólise catalisada por ALP do AMPPD. O conceito experimental era promover competição entre AMPPD e os fármacos pelos sítios de ligação de albumina. Os resultados descritos na Fig. 25 confirmaram o anterior, uma vez que a emissão de luz foi mais afetada pela presença de varfarina do que de ibuprofeno. Em suma, o aumento da emissão de luz deve estar ligado ao acesso do produto de hidrólise de AMPPD ao sítio I de HSA.

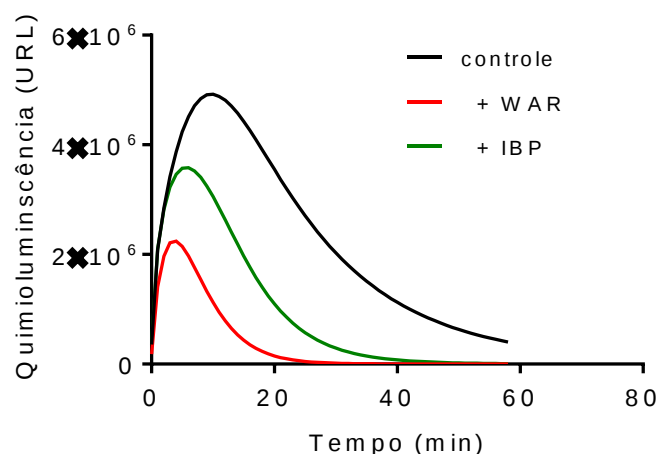


Figura 25. Efeito da varfarina (WAR) e do ibuprofeno (IBP) na quimioluminescência aumentada por HSA de ALP/AMPPD. Controle: HSA 5,0 μ M, ALP 100 U/ml, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C. Quando presentes, WAR e IBP eram 250 μ M.

4.5.7 - Espectro de quimioluminescência e transferência de energia

A decomposição de AMPPD gera um éster com um espectro de emissão quimioluminescente que pode ser registrado. O comprimento de onda de intensidade máxima é em torno de 470 nm [11]. Essa característica também foi observada aqui e, como era de se esperar, a presença de HSA causou um aumento significativo na intensidade (Fig. 26). Como mostrado, a ausência de AMPPD ou ALP impediu a emissão.

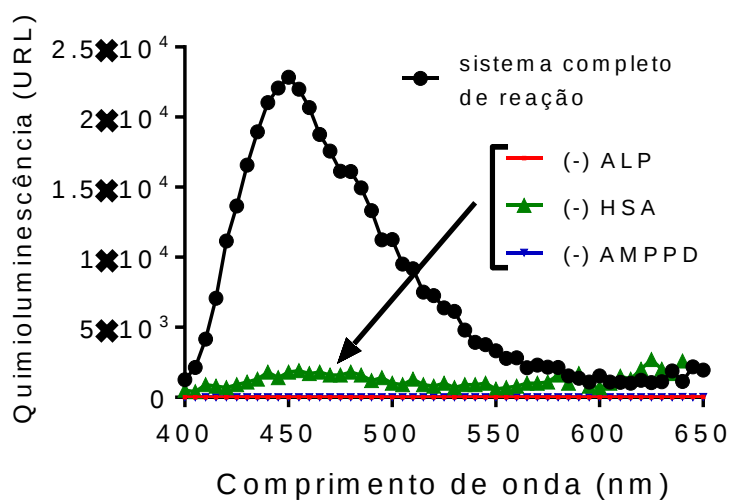


Figura 26. Espectros de quimioluminescência do sistema AMPPD/ALP/HSA e controles. Sistema completo: ALP 100 U/ml, HSA 6,25 μ M, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C.

As descobertas e evidências anteriores sugerem que a radiação do produto de hidrólise do AMPPD é emitido de dentro da proteína. Para investigar isso, um experimento de transferência de energia de ressonância (RET) foi projetado. O experimento foi baseado no fato de que mais de um ligante pode ser ligado simultaneamente no sítio I. Portanto, o RET pode ser detectado para os ligantes fluorescentes da albumina no sítio I [30]. Com base nessas características biofísicas, buscamos evidências de que o éster fenolato excitado eletronicamente gerado na decomposição do AMPPD (3-MB, fig. 15) poderia ser um doador de energia para receptores adequados. As escolhas foram os compostos fluorescentes cumarina 153 (C153) e o corante laser DCM. Essas sondas têm duas características essenciais: i) ligantes de HSA [30–32] e ii) seus espectros de absorção têm algum grau de superposição com o espectro de emissão do éster excitado, uma condição experimental para RET [18]. Especificamente, C153 absorve a 440 nm, emite a 540 nm e DCM a 480 nm e 620 nm, respectivamente.

A Fig. 27A confirmou as expectativas. Como mostrado, adicionar C153 e DCM causou a extinção da emissão de luz excitada de 3-MB. Mais importante, as bandas de emissão das sondas fluorescentes foram detectadas, ou seja, a transferência de energia ocorreu de 3-MB excitado para C153 e DCM. Obviamente, a única fonte de energia capaz de excitar C153 e DCM é o éster fenólico excitado gerado pela decomposição de AMPPD. Como controles, a ausência de qualquer reagente impediu a emissão de C153 e DCM (Figs. 27B e 27C).

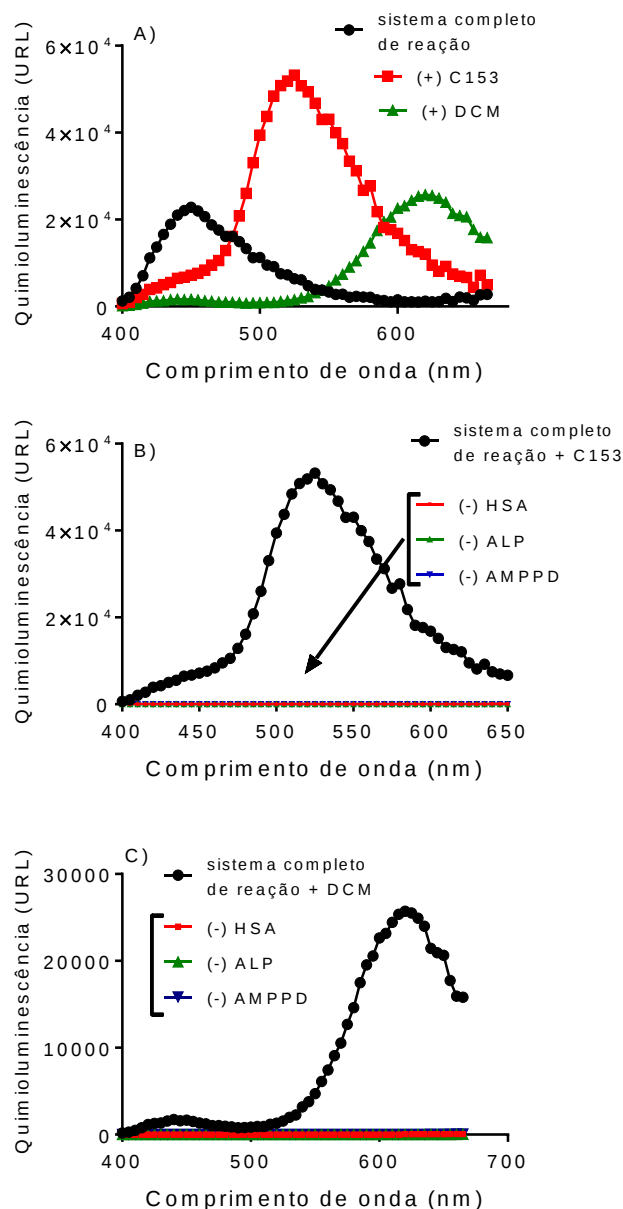


Figura 27. Evidência de RET do éster excitado eletronicamente gerado pela decomposição de AMPPD em corantes fluorescentes. (A) O efeito da adição de C153 (5,0 μ M) ou DCM (5,0 μ M) ao sistema de reação completo consistiu em ALP 100 U/ml, HSA 6,25 μ M, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C. (B,C) Revogação da emissão de luz devido à falta dos componentes.

O RET detectado confirmou que o produto de hidrólise do AMPPD emite do sítio de ligação do HSA. O fenômeno RET requer duas condições, superposição espectral e proximidade, geralmente de 10 a 100 Å, entre o doador e o aceitador [18]. Assim, a falta de transferência de energia na ausência de HSA mostra que uma das condições RET não estava presente, ou seja, proximidade. Em outras palavras, a transferência de energia não ocorre no solvente (Figs. 27B e 27C). Para fortalecer a proposta de transferência de

energia, em um segundo conjunto de experimentos, a concentração de C153 foi fracionada. A Fig. 27 mostra a extinção dependente da concentração da fluorescência do éster e o aumento concomitante da fluorescência de C153, ou seja, um efeito RET típico.

O fenômeno RET também foi detectado usando outras albuminas e, confirmando os resultados anteriores, a eficiência de transferência de energia foi maior em HSA em comparação com BSA, RSA e PSA (Fig. S2). Em suma, o RET detectado confirma fortemente a emissão de luz da cavidade hidrofóbica da albumina. A fig. 28 descreve a proposta para transferência de energia.

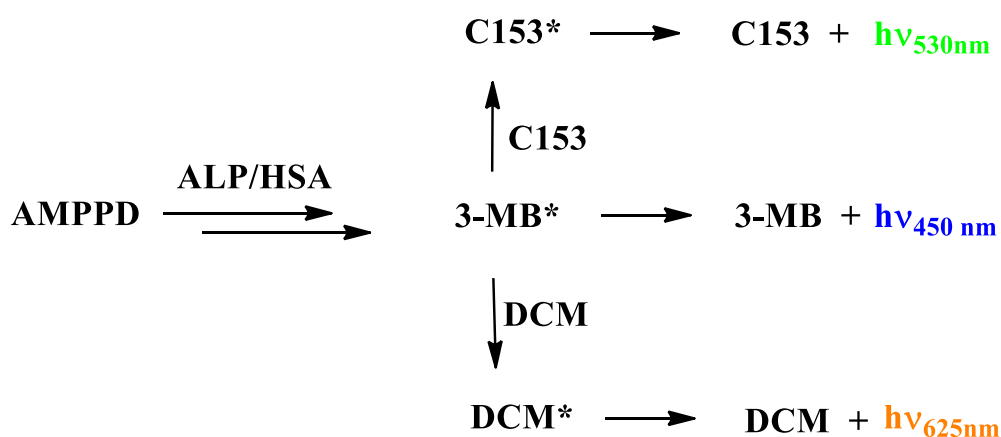


Figura 28. Proposta de caminho para transferência de energia de 3 MB para C153 e DCM dentro do sítio I da HSA.

4.5.8 - Efeito da polaridade do meio

De acordo com nossos resultados, pode-se propor que a maior hidrofobicidade dentro da cavidade da proteína pode estar por trás do aumento da emissão do sistema AMPPD na presença de HSA. A constante dielétrica aparente para a cavidade do sítio I foi relatada como sendo aproximadamente 6, o que é significativamente menor do que a constante dielétrica do meio aquoso, que é aproximadamente 80 [33,34]. Essa constante dielétrica menor pode criar uma condição favorável para aumentar a eficiência da quimioluminescência reduzindo a polaridade do meio. Em concordância, o papel do solvente no rendimento quântico do AMPPD e outros sistemas de dioxetano é significativo. Khalid et al. demonstraram recentemente que os rendimentos quânticos singlete desses sistemas geralmente aumentam com a polaridade do meio até um valor máximo e então diminuem para polaridades mais altas [35].

Com base nessas suposições, testamos o efeito do 1,4-dioxano na mistura de reação. Esse solvente foi escolhido devido à sua compatibilidade com o meio biológico em concentrações de até 35% [36]. A Fig. 29 mostra os resultados da adição de até 10% de 1,4-dioxano. A presença desse solvente orgânico levou a um aumento gradual na emissão de luz. Embora o efeito tenha sido menos pronunciado do que a presença de HSA, ele seguiu uma tendência semelhante, apoiando a proposta de que a hidrofobicidade do microambiente da cavidade da proteína contribui para a propriedade de aprimoramento da proteína.

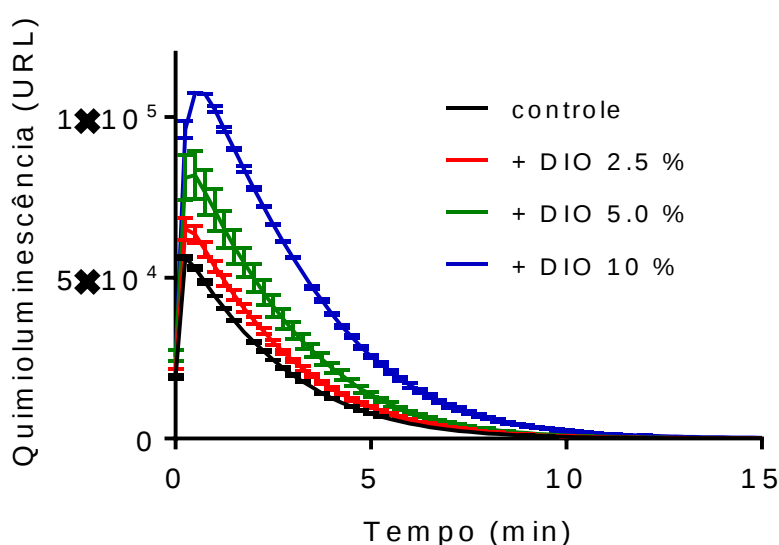


Figura 29. Efeito do 1,4-dioxano (DIO) na eficiência de emissão de luz. Controle: ALP 100 U/ml, AMPPD 6,25 μ M, Tris 50 mM, pH 9,0, 37°C e DIO conforme indicado.

4.5.9 - Efeito da ligação de HSA nas propriedades fotofísicas das espécies emissivas

O produto da hidrólise do AMPPD sofre clivagem do anel de dioxetano, gerando o éster fenólico excitado (metil 3-hidroxibenzoato, 3-MB), que fluoresce emitindo luz (fig. 15). Uma vez que nossas descobertas anteriores mostraram que o fenômeno ocorre dentro do HSA, estudamos as propriedades fotofísicas do 3-MB isolado. A Fig. 30 exhibe os espectros de fluorescência do 3-MB ligado em HSA e BSA. Há alguns pontos importantes a serem observados. Primeiro, na ausência de proteínas, o éster não emitia luz no meio aquoso. A descoberta foi importante porque sugeriu que o efeito do HSA na

quimioluminescência do AMPPD pode estar relacionado a um aumento no rendimento quântico de fluorescência do 3-MB excitado. Além disso, reforça a ideia de que a emissão ocorre nas cavidades da HSA. Esta proposta é apoiada pela observação de que muitas sondas polares mostram maior rendimento quântico de fluorescência ao interagir com microambientes hidrofóbicos como membranas e cavidades de macromoléculas [37]. Por fim, isso também explica por que adicionar BSA foi muito menos eficaz em aumentar a quimioluminescência do que HSA. Conforme mostrado, em comparação com HSA, a proteína bovina foi menos eficiente em aumentar o rendimento quântico de 3-MB.

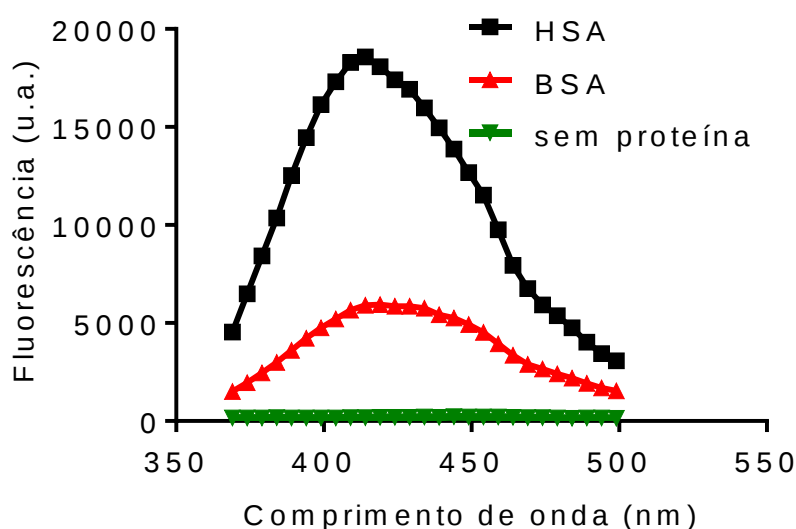


Figura 30. Espectros de fluorescência de 3-MB complexado ou não com albuminas. 3-MB (25 µM) dissolvido em Tris 50 mM, pH 9,0, na ausência ou presença de HSA ou BSA (25 µM).

4.5.10 - Estudo das Espécies Emissivas: 3-MB versus 4-MB

Na seção anterior, demonstramos que o éster gerado no estado excitado durante a hidrólise de AMPPD aumentou o rendimento quântico de fluorescência dentro de HSA. A eficiência da ligação de 3-MB com HSA foi avaliada para avançar esta proposta. Foi realizada por titulação de 3-MB com HSA (Fig. 31A). Corroborando com a expectativa, o aumento da fluorescência dependente da concentração e a saturação indicaram a ligação de 3-MB com HSA. Um achado interessante foi verificado que o isômero de 3-MB, ou seja, 4-MB, mesmo compartilhando alta similaridade estrutural, não tem sua fluorescência aumentada pela presença de HSA (Fig. 31B). Essa descoberta reforçou nossa proposta de que o efeito de HSA na hidrólise catalisada por ALP de AMPPD está

relacionado às características singulares de 3-MB geradas em estado excitado dentro da cavidade da proteína e que causam um aumento no rendimento quântico de fluorescência. Corroborando com isso, a interação de HSA com 3-MB pode ser detectada no estado fundamental. A Fig. 32 descreve os espectros de absorção de HSA e 3-MB isolados e o complexo HSA:3-MB. Como mostrado, uma pequena banda centrada em 340 nm foi detectada, o que indicou a complexação. A figura inserida mostra a diferença no espectro.

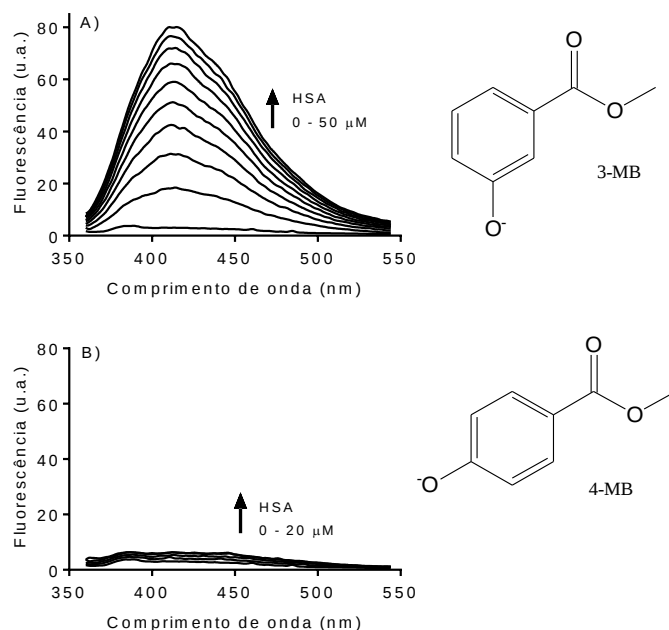


Figura 31. (A) Efeito dependente da concentração de HSA na fluorescência de 3-MB e (B) comparação com o isômero 4-MB. 3-MB e 4-MB (25 μ M), HSA conforme indicado, Tris 50 mM, pH 9,0.

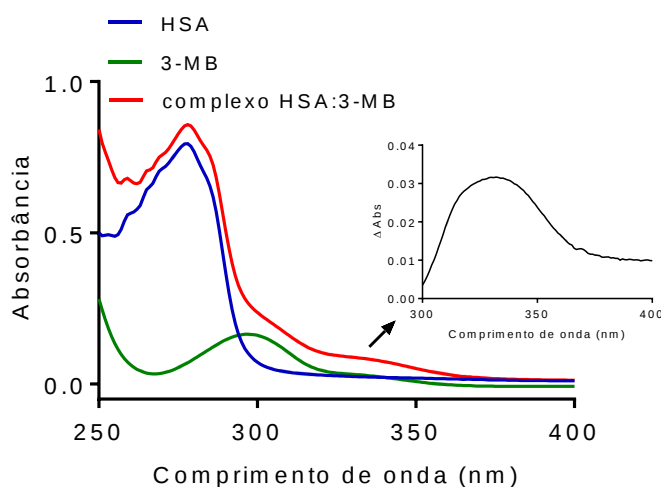


Figura 32. Espectros de absorção de HSA, 3-MB e o complexo HSA:3-MB. O inset mostra o a diferença do espectro: complexo HSA:3-MB menos HSA isolado + 3-MB. Condição experimental: 3-MB (50 μ M), HSA (25 μ M), Tris 50 mM, pH 9,0.

4.5.11 - Simulações computacionais

Para reforçar a proposta de que o aumento da quimioluminescência está relacionado à interação de 3-MB na cavidade HSA, o docking molecular foi aplicado para identificar sua interação no sítio I. Para esta tarefa, a estrutura cristalográfica de HSA complexada com ácido iofenóxico foi selecionada (PDB ID: 2YDF) [38]. O ácido iofenóxico tem uma dimensão e geometria semelhantes ao 3-MB, favorecendo a simulação de docking. O 3-MB flexível estava livre para se acomodar dentro das cavidades da proteína rígida. A Fig. 33A mostra a pose mais estável do 3-MB e as interações com três resíduos de aminoácidos no sítio I. Sendo eles, ARG257, TYR150 e ILE290. A energia de estabilização foi de -39,47 kcal/mol.

A partir da conformação de energia mais baixa do 3-MB e dos resíduos de aminoácidos que fazem interação no sítio-I, os espectros de absorção foram simulados aplicando a metodologia DFT (veja M&M para detalhes computacionais). A Fig. 33B mostra os espectros UV-Vis calculados do 3-MB sozinho e junto com os resíduos de aminoácidos. Como mostrado, um pequeno aumento de intensidade com máximo em torno de 320 nm foi obtido, consistente com o espectro experimental. Em suma, a interação do 3-MB na cavidade da proteína pode estar por trás da alteração de suas propriedades fotofísicas e consequente efeito na quimioluminescência do AMPPD.

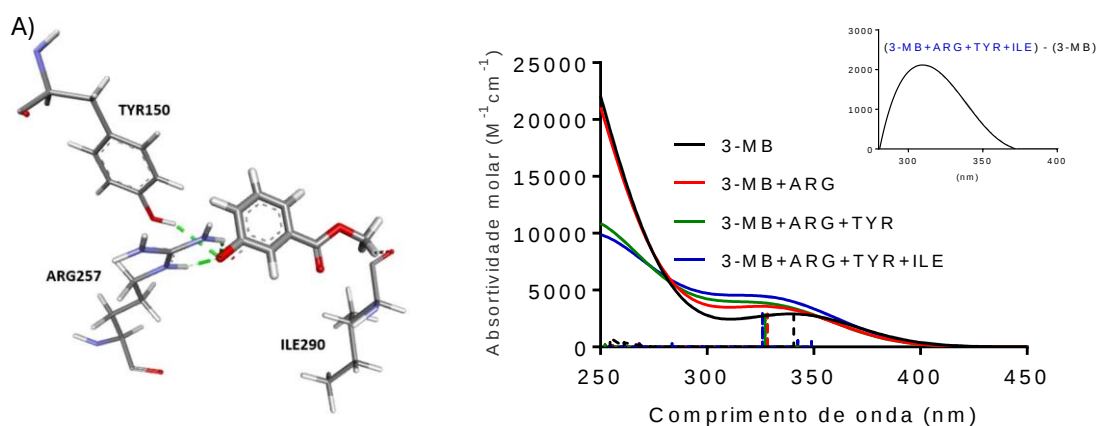


Figura 33. Docking molecular e espectro simulado por DFT de 3-MB no sítio I de HSA. A) Pose de energia mais baixa de 3-MB e sua interação com resíduos de aminoácidos no sítio I. B) Espectros simulados de 3-MB na presença e ausência de aminoácidos. A figura inserida mostra o espectro de diferença (3-MB+ARG257+TRY150+ILE290) menos 3-MB.

4.6 - Conclusão

AMPPD é um substrato quimioluminescente comumente usado para fosfatase alcalina. Nossa pesquisa revelou que AMPPD também funciona como um ligante para HSA, aumentando a emissão de luz. Descobrimos que esse aumento é causado pela difusão de AMPPD desfosforilado para o sítio I em HSA. Dentro da cavidade da proteína, a quebra de AMPPD produz 3-hidroxibenzoato eletronicamente excitado, que é então cercado por um ambiente hidrofóbico, aumentando significativamente a emissão de luz. O comprimento de onda da emissão pode ser modificado pela introdução de aceitadores fluorescentes no sistema de reação usando transferência de energia por ressonância. Essas descobertas oferecem novos insights sobre a emissão de luz de AMPPD e têm potenciais aplicações biotecnológicas.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, N°: 302121/2022-6, 422893/2021-8), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, N°: 2024/00959-0). Simulações de dinâmica molecular foram realizadas no Centro de Computação Científica (NCC/GridUNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil.

4.7 – Referências

- [1] M.C. Cabello, F.H. Bartoloni, E.L. Bastos, W.J. Baader, The Molecular Basis of Organic Chemiluminescence, *Biosensors* 13 (2023) 452. <https://doi.org/10.3390/bios13040452>.
- [2] A. Fa, de S. Ga, de SJ Sp, K. M, B. Wj, Efficiency of electron transfer initiated chemiluminescence, *Photochemistry and Photobiology* 89 (2013). <https://doi.org/10.1111/php.12102>.
- [3] L. Zhao, J. Xu, L. Xiong, S. Wang, C. Yu, J. Lv, J.-M. Lin, Recent development of chemiluminescence for bioanalysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 166 (2023) 117213. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117213>.

- [4] K. Deshpande, L. Kanungo, Chemiluminescence and fluorescence biosensors for food application: A review, *Sensors and Actuators Reports* 5 (2023) 100137. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2022.100137>.
- [5] L.A. Romodin, Chemiluminescence Detection in the Study of Free-Radical Reactions. Part 2. Luminescent Additives That Increase the Chemiluminescence Quantum Yield, *Acta Naturae* 14 (2022) 31–39. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11427>.
- [6] M.A. Tzani, D.K. Gioftsidou, M.G. Kallitsakis, N.V. Pliatsios, N.P. Kalogiouri, P.A. Angaridis, I.N. Lykakis, M.A. Terzidis, Direct and Indirect Chemiluminescence: Reactions, Mechanisms and Challenges, *Molecules* 26 (2021) 7664. <https://doi.org/10.3390/molecules26247664>.
- [7] Z. Hai, J. Li, J. Wu, J. Xu, G. Liang, Alkaline Phosphatase-Triggered Simultaneous Hydrogelation and Chemiluminescence, *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017) 1041–1044. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b11041>.
- [8] B. Zhou, M. Xian, L. Ye, W. Tang, J.-L. Zhou, 1,2-Dioxetane-based Chemiluminescence Probes for Tumor Optical Molecular Imaging, *ChemistrySelect* 8 (2023). <https://doi.org/10.1002/slct.202301826>.
- [9] W. Adam, D. Reinhardt, C.R. Saha-Möller, From the firefly bioluminescence to the dioxetane-based (AMPPD) chemiluminescence immunoassay: a retroanalysis, *Analyst* 121 (1996) 1527–1531. <https://doi.org/10.1039/AN9962101527>.
- [10] W. Adam, I. Bronstein, B. Edwards, T. Engel, D. Reinhardt, F.W. Schneider, A.V. Trofimov, R.F. Vasil'ev, Electron Exchange Luminescence of Spiroadamantane-Substituted Dioxetanes Triggered by Alkaline Phosphatase. Kinetics and Elucidation of pH Effects, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 10400–10407. <https://doi.org/10.1021/ja961904g>.
- [11] I. Bronstein, B. Edwards, J.C. Voyta, 1,2-dioxetanes: novel chemiluminescent enzyme substrates. Applications to immunoassays, *J Biolumin Chemilumin* 4 (1989) 99–111. <https://doi.org/10.1002/bio.1170040116>.
- [12] L. Z, H. L, H. N, S. Z, W. H, L. S, L. H, L. X, D. Y, W. Z, Chemiluminescent detect of E. coli O157:H7 using immunological method based on magnetic nanoparticles, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 10 (2010). <https://doi.org/10.1166/jnn.2010.1811>.
- [13] Z. L, W. D, S. G, L. L, Dual-labeled chemiluminescence enzyme immunoassay for simultaneous measurement of total prostate specific antigen (TPSA) and free prostate specific antigen (FPSA), *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence* 32 (2017). <https://doi.org/10.1002/bio.3358>.
- [14] S. Patel, C. Aundhia, A. Seth, N. Shah, D. Gohil, K. Pandya, Human Serum Albumin: A Novel Drug Delivery Carrier System, *Journal of Pharmaceutical Research International* (2021) 18–24. <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i44B32648>.

- [15] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, Human serum albumin: From bench to bedside, *Molecular Aspects of Medicine* 33 (2012) 209–290. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>.
- [16] R. Guzzi, R. Bartucci, Interactive multiple binding of oleic acid, warfarin and ibuprofen with human serum albumin revealed by thermal and fluorescence studies, *Eur Biophys J* 51 (2022) 41–49. <https://doi.org/10.1007/s00249-021-01582-w>.
- [17] K. Yamasaki, S. Hyodo, K. Taguchi, K. Nishi, N. Yamaotsu, S. Hirono, V.T.G. Chuang, H. Seo, T. Maruyama, M. Otagiri, Long chain fatty acids alter the interactive binding of ligands to the two principal drug binding sites of human serum albumin, *PLoS One* 12 (2017) e0180404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180404>.
- [18] J. Lakowicz, Lakowicz JR (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd edn. Springer, New York, 2006, 2006.
- [19] L. de C. Bertozo, M. Maszota-Zieleniak, M. Bolean, P. Ciancaglini, S.A. Samsonov, V.F. Ximenes, Binding of fluorescent dansyl amino acids in albumin: When access to the protein cavity is more important than the strength of binding, *Dyes and Pigments* 188 (2021) 109195. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109195>.
- [20] Theoretical and Practical Aspects of Albumin Esterase Activity | Russian Journal of Bioorganic Chemistry, (n.d.). <https://link.springer.com/article/10.1134/S1068162020030036> (accessed October 14, 2024).
- [21] L. de C. Bertozo, M. Kogut, M. Maszota-Zieleniak, S.A. Samsonov, V.F. Ximenes, Induced circular dichroism as a tool to monitor the displacement of ligands between albumins, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 278 (2022) 121374. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121374>.
- [22] R. Maier, M.R. Fries, C. Buchholz, F. Zhang, F. Schreiber, Human versus Bovine Serum Albumin: A Subtle Difference in Hydrophobicity Leads to Large Differences in Bulk and Interface Behavior, *Crystal Growth & Design* 21 (2021) 5451–5459. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.1c00730>.
- [23] M. Ka, P. Pj, D. A, Z. Md, J. K, S. Aj, C. M, M. W, Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins, *Molecular Immunology* 52 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011>.
- [24] Phosphate Monoester Hydrolysis by Trinuclear Alkaline Phosphatase; DFT Study of Transition States and Reaction Mechanism - Chen - 2014 - ChemPhysChem - Wiley Online Library, (n.d.). <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cphc.201402016> (accessed October 14, 2024).
- [25] Promiscuity in the Enzymatic Catalysis of Phosphate and Sulfate Transfer | Biochemistry, (n.d.). <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.biochem.6b00297> (accessed October 14, 2024).

- [26] N. Shahabadi, S.M. Fili, Molecular modeling and multispectroscopic studies of the interaction of mesalamine with bovine serum albumin, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 118 (2014) 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.08.110>.
- [27] V. Maes, Y. Engelborghs, J. Hoebeke, Y. Maras, A. Vercruysse, Fluorimetric analysis of the binding of warfarin to human serum albumin. Equilibrium and kinetic study, *Mol Pharmacol* 21 (1982) 100–107.
- [28] L. I, L.-V. V, A. F, M. Ma, G. C, Binding of naproxen enantiomers to human serum albumin studied by fluorescence and room-temperature phosphorescence, *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 105 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.12.007>.
- [29] M. Maciążek-Jurczyk, K. Janas, J. Pożycka, A. Szkudlarek, W. Rogóż, A. Owczarzy, K. Kulig, Human Serum Albumin Aggregation/Fibrillation and its Abilities to Drugs Binding, *Molecules* 25 (2020) 618. <https://doi.org/10.3390/molecules25030618>.
- [30] V.F. Ximenes, Concomitant binding of two fluorescent probes at site-I of human serum albumin: The protein acting as a scaffold enabling fluorescence resonance energy transfer, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 234 (2022) 112542. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112542>.
- [31] J. Shobini, A.K. Mishra, K. Sandhya, N. Chandra, Interaction of coumarin derivatives with human serum albumin: investigation by fluorescence spectroscopic technique and modeling studies, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 57 (2001) 1133–1147. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(00\)00492-3](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(00)00492-3).
- [32] S.K. Pal, D. Mandal, D. Sukul, S. Sen, K. Bhattacharyya, Solvation Dynamics of DCM in Human Serum Albumin, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 1438–1441. <https://doi.org/10.1021/jp002368o>.
- [33] Md.E. Haque, S. Ray, A. Chakrabarti, Polarity Estimate of the Hydrophobic Binding Sites in Erythroid Spectrin: A Study by Pyrene Fluorescence, *Journal of Fluorescence* 10 (2000) 1–6. <https://doi.org/10.1023/A:1009402126863>.
- [34] 4-Dimethylamino-beta-nitrostyrene, a fluorescent solvatochromic probe to estimate the apparent dielectric constant in serum albumin: Experimental and molecular dynamics studies - ScienceDirect, (n.d.). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S101060302200421X> (accessed October 14, 2024).
- [35] M. Khalid, S.P. Souza, M.C. Cabello, F.H. Bartoloni, LFML Ciscato, E.L. Bastos, OAAE Seoud, W.J. Baader, Solvent polarity influence on chemiexcitation efficiency of inter and intramolecular electron-transfer catalyzed chemiluminescence, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 433 (2022) 114161. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2022.114161>.
- [36] K.E. Van Holde, SF Sun, Bovine Serum Albumin in Water-Dioxane Mixtures, *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 66–72. <https://doi.org/10.1021/ja00860a017>.

[37] A.S. Klymchenko, Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications, *Acc. Chem. Res.* 50 (2017) 366–375. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00517>.

[38] Crystallographic analysis reveals the structural basis of the high-affinity binding of iophenoxic acid to human serum albumin - PubMed, (n.d.). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21501503/> (accessed October 14, 2024).

5. Capítulo 2 – Estudo de *docking* molecular

A fim de avaliar a interação entre o AMPPD e as albuminas, utilizou-se a estrutura cristalográfica da HSA complexada com o ligante ácido 5-(2,4-difluorofenil)-2-hidroxi-benzóico, fig. 34-A, PDB id: 2BXE. O ligante cristalizado possui dois grupos volumosos, vários grupos funcionais que possibilitam realizar interações polares e dimensões similares ao AMPPD, fig. 34-B. Além disso, está ligado nos sítios I e II. Estas características, a torna adequado para o estudo da interação do AMPPD com HSA nos sítios.

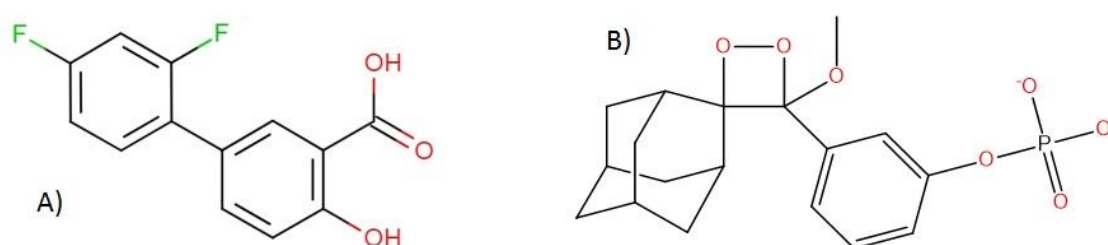


Figura 34. A) representação da molécula: ácido 5-(2,4-difluorofenil)-2-hidroxi-benzóico; B) representação da molécula do AMPPD.

5.1 – Estudo de interações com a proteína HSA

5.1.1 – Interações da HSA (sítio 1) com AMPPD

Análises de docking utilizando o programa Gold mostraram que existe a interação do ligante AMPPD com o sítio 1 da proteína HSA, sendo que a energia de interação resultou em -61,38 kcal/mol, valor bastante próximo da anergia de interação do ligante cristalizado, ácido 5-(2,4-difluorofenil)-2-hidroxi-benzoico, -65,72 kcal/mol obtido por re-docking.

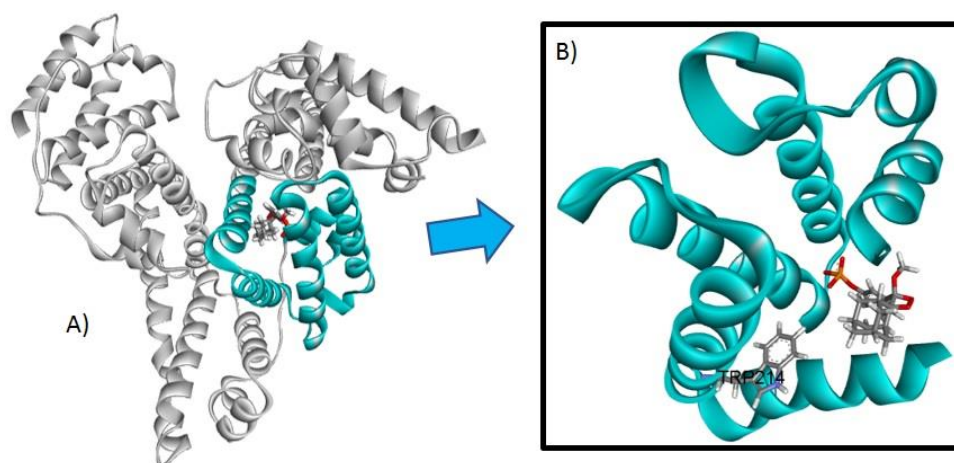


Figura 35. A) representação no formato de fitas da estrutura da HSA destacado o sítio 1 da proteína em azul. B) Ampliação do sítio 1 com o AMPPD em seu interior, o resíduo de triptofano está representado no formato *sticks*.

Na fig. 35-A, é possível observar a estrutura da proteína no formato de fitas, e em destaque em azul as fitas dos resíduos de aminoácidos que caracterizam o sítio 1 da HSA e o posicionamento do AMPPD, demonstrando visualmente a interação do ligante neste sítio.

Na fig. 35-B é representada a ampliação somente das fitas do sítio 1 em um ângulo diferente, possibilitando uma melhor visualização do posicionamento do ligante dentre do sítio. Nesta mesma ampliação foi destacado na fita inferior o resíduo do único resíduo de triptofano na HSA. Trata-se de aminoácido com propriedade fluorescente e o responsável por possibilitar as análises de supressão de fluorescência realizadas neste trabalho. Nota-se que o triptofano se encontra muito próximo ao ligante AMPPD, corroborando com os resultados práticos, da supressão de fluorescência do triptofano conforme maior a concentração do AMPPD no meio.

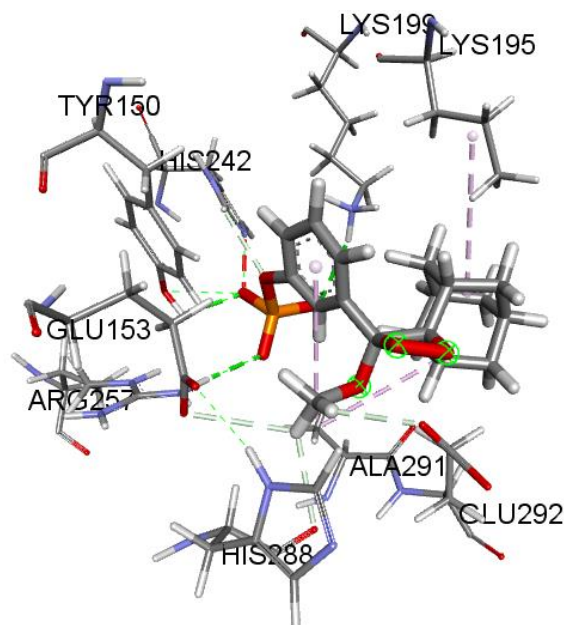


Figura 36. Detalhe das interações entre o AMPPD e os resíduos de aminoácidos do sítio 1 da HSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares.

Uma análise mais detalhada, fig. 36, nos mostra que existem interação diretas do AMPPD com 9 aminoácidos presentes no sítio I: TYR150, HIS242, ARG257 e LYS199, GLU292 interagindo por ligação de hidrogênio (linhas tracejadas em verde) e LYS195, ALA291, por interações apolares. Observa-se que todos os aminoácidos que fazem ligação de hidrogênio estão posicionados próximo ao grupo fosfato do ligante, e os demais aminoácidos apolares no restante do ligante, que é predominantemente apolar como o grupo adamantanona e grupo metila.

Analisando as estruturas dos aminoácidos citados acima que fazem ligação de hidrogênio com o ligante, observa-se a presença de grupos amina em três deles, um grupo fenol e um grupo amida que são os responsáveis pelas ligações de hidrogênio, a tirosina e a histidina com grupos volumosos aromáticos e ambos com a presença de átomos polares nos anéis e cadeia carbônica pequena. Já os aminoácidos arginina, lisina e glutamina não possuem anéis aromáticos e apresentam cadeias alifáticas entre os grupos polares, dando-lhes caráter pouco menos polar e possibilitando também interações apolares. Os resíduos dos aminoácidos, tirosina arginina e lisina interagem através de ligação de hidrogênio com o grupo fosfato do AMPPD, já os aminoácidos histidina e

glutamina interagem através de ligação de hidrogênio, de forma mais fraca, com os hidrogênios do grupo metil do AMPPD.

Analisando os aminoácidos que fazem interações apolares citados, a lisina, que também aparece anteriormente fazendo ligação de hidrogênio, neste caso sua cadeia alifática faz interação apolar com o grupo adamantanona do AMPPD, e o resíduo de alanina, apesar de possuir o grupo amina primária que dá o caráter polar ao resíduo, neste caso é o grupo metil que faz as interações apolares com o grupo diamantanona e com o anel aromático através de interação π -orbital.

Portanto tais resultados de docking corroboram com os resultados práticos obtidos, com a supressão de fluorescência do resíduo de triptofano com a entrada do ligante AMPPD no sítio 1 da proteína albumina humana.

5.1.2 - Interações da HSA (sítio 2) com AMPPD

Os resultados energéticos obtidos através do docking da interação do AMPPD com o sítio 2 da proteína albumina humana foram satisfatórios (-15,94 kcal/mol), porém muito menos favorável comparado ao resultado de interação com o sítio 1 (-61,38 kcal/mol), ou seja, a interação com o sítio 1 é 3,85 vezes mais favorável que do que no sítio 2.

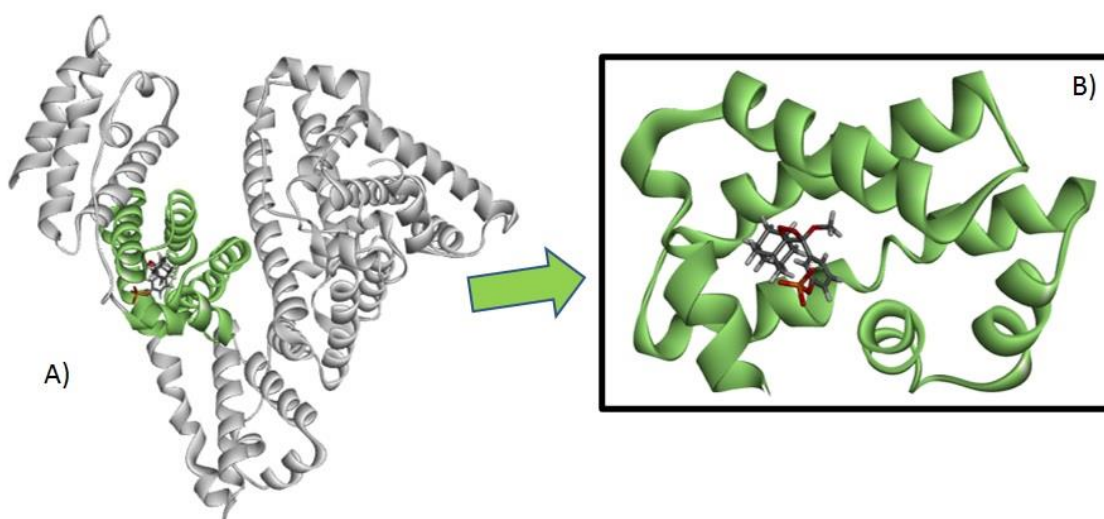


Figura 37. A) representação no formato de fitas da estrutura da HSA destacado o sítio 2 da proteína em verde. B) Ampliação do sítio 2 com o AMPPD em seu interior.

Fazendo uma análise visual dos resultados de docking da interação da HSA com o AMPPD no sítio 2 da proteína, fig. 37, observa-se que o ligante está inserido entre as fitas em verde da cadeia proteica, que representam os resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio 2. A fig. 37-B, representa somente as fitas do sítio 2 em um outro ângulo mostrando que houve a entrada do ligante do sítio em questão.

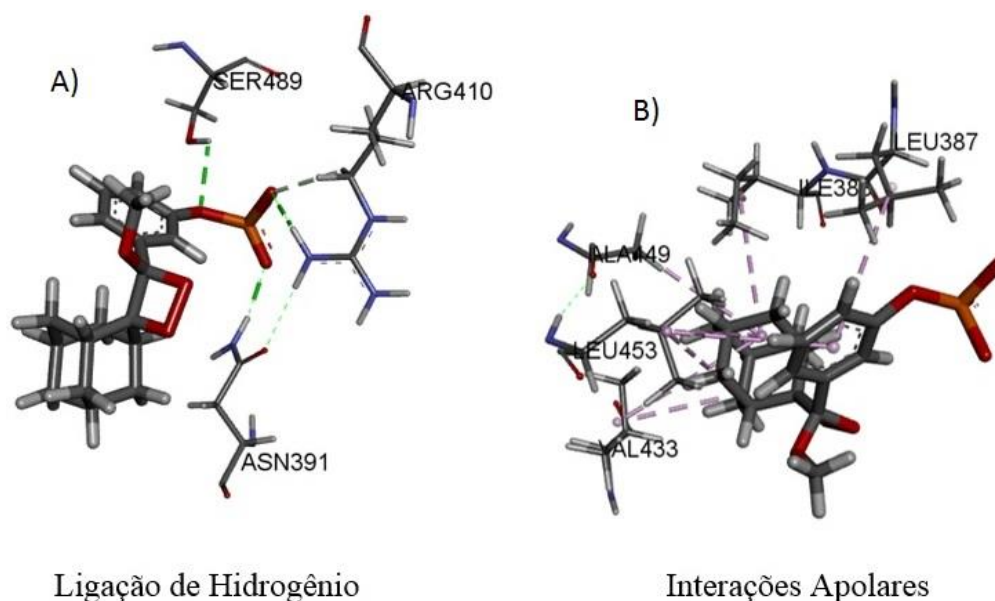


Figura 38. Detalhe das interações entre o AMPPD e os resíduos do sítio 1 da HSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares. A) resíduos que fazem ligações de hidrogênio. B) resíduos que fazem interações apolares.

Realizando uma análise mais aprofundada da interação, fig. 38, observa-se que há três resíduos de aminoácidos que fazem ligação de hidrogênio com o AMPPD, e cinco resíduos de aminoácidos que fazem interações apolares, comparando com o sítio 1, onde cinco resíduos de aminoácidos fazem ligação de hidrogênio e somente dois fazem interações apolares, há um caráter de interação praticamente oposto, sendo o sítio 1 predominantemente polar e o sítio 2 predominantemente apolar, para a interação com o AMPPD em específico, o que torna a interação no sítio 1 mais forte de forma relativa ao sítio 2. Corroborando com os resultados energéticos teóricos e com os resultados práticos obtidos em laboratório, onde a supressão da fluorescência do resíduo do triptofano no sítio 1 foi muito mais acentuada comparada com a supressão da fluorescência no sítio 2, com a adição do ligante AMPPD, conclusão obtida através de ensaios de competição com as sondas dansiladas específicas para sítio 1 e 2.

Os resíduos de aminoácidos que fazem a interação polar no sítio 2 com o AMPPD são, asparagina, serina e arginina, destes três, somente a arginina participa da interação no sítio 1.

Todos os três resíduos de aminoácidos fazem ligação de hidrogênio somente com o grupo fosfato do AMPPD, os resíduos da asparagina e arginina interagem utilizando os grupos amina, e a serina o grupo álcool.

As interações apolares ocorrem através dos resíduos de aminoácidos, leucina, isoleucina, alanina e valina. Destes quatro aminoácidos a alanina aparece em interação polar no sítio 1 da HSA com o AMPPD e em interação π -orbital apolar com o anel aromático do AMPPD, também no sítio 1, no sítio 2 este resíduo de posição 449 aparece em uma interação apolar com seu grupo metila na estrutura diamantanona do AMPPD.

Existem dois resíduos do aminoácido leucina participando das interações apolares no sítio 2, os de posição 453 e 387, o primeiro faz dois tipos de interações apolares com seu grupo alifático, uma interação com o anel aromático do AMPPD e uma interação apolar com o grupo diamantanona, já o segundo resíduo, o de posição 387, faz uma interação apolar π -orbital também com o anel aromático do AMPPD.

Os resíduos de ILE388 e VAL433 interagem com seus grupos alifáticos, também com o grupo diamantanona do AMPPD.

5.1.3 - Interações da HSA (sítio 1) com AMPPD desfosforilado

Os resultados de análises energéticas realizadas do programa de docking GOLD, apresentaram resultados de -64,93 kcal/mol da interação do AMPPD desfosforilado com o sítio 1 da HSA, comparando com o resultado do AMPPD completo para o sítio 1 que foi de -61,38 kcal/mol, nos mostra que a interação do AMPPD desfosforilado é 5,8% mais favorável do que a interação do AMPPD completo, não sendo uma diferença muito grande, porém ainda sim mais favorável.

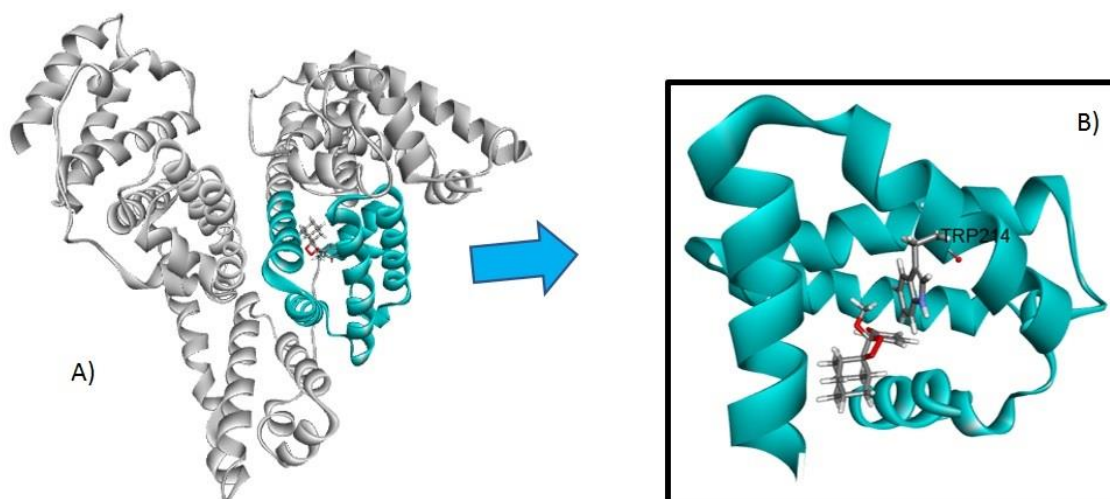


Figura 39. A) representação no formato de fitas da estrutura da HSA destacado o sítio 1 da proteína em azul. B) Ampliação do sítio 1 com o AMPPD desfosforilado em seu interior, o resíduo de triptofano está representado no formato *sticks*.

Realizando uma análise visual da interação do AMPPD desfosforilado com a HSA, fig. 39, notamos que o ligante entra na cavidade do sítio 1 da proteína, representado através das fitas em azul, da fig. 39.

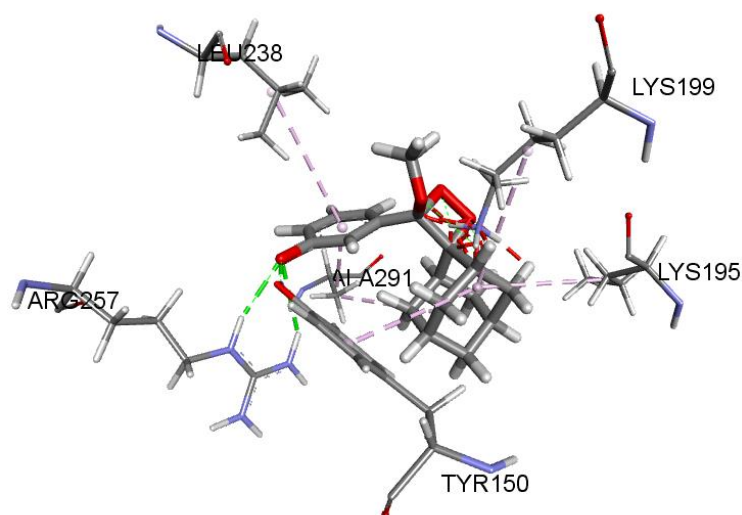


Figura 40. Detalhe das interações entre o AMPPD desfosforilado e os resíduos de aminoácidos do sítio 1 da HSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares.

Realizando uma análise mais detalhada das interações do ligante com a proteína, fig. 40, notamos uma interação interessante ocorrendo, a do triptofano, único aminoácido fluorescente, e o único na HSA, que se encontra no sítio 1 desta proteína, realizando duas interações com o AMPPD desfosforilado, uma ligação de hidrogênio com o oxigênio na posição 3, ou meta, do anel aromático do ligante, e uma interação apolar com o grupo adamantanona. Cabe aqui lembrar os experimentos realizados anteriormente do 3-MB e do 4-MB, onde o primeiro apresentou fluorescência na presença da proteína, e o segundo não, podendo essa interação com o triptofano ser o responsável por esse fenômeno, devido ao posicionamento do resíduo de aminoácido ser mais próximo a posição 3 do íon de oxigênio, e distante da posição 4 deste íon no isômero 4-MB, como é possível de ser observado na fig.40.

Através da simulação de docking, foi apontado que o ligante interage com seis aminoácidos no sítio 1, são eles, TRP150, LIS199, ARG257 polares, e LIS195, ALA291, LEU238 que fazem interações apolares, ou seja, três interações polares e três apolares, porém, a arginina possui dois grupos amina fazendo interação, também com o oxigênio na posição 3 como o triptofano, corroborando ainda mais com o motivo da diferença das posições 3 e 4 do anel aromático do ligante.

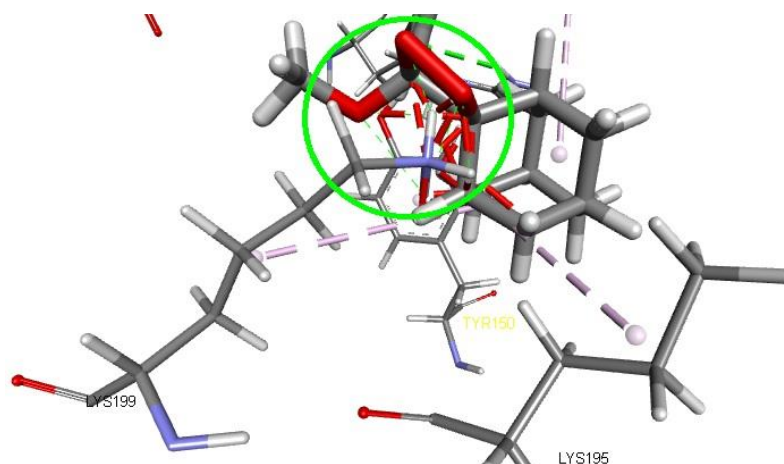


Figura 41. Detalhe das interações múltiplas do resíduo LYS199 com o grupo dioxetano, destacado no interior do círculo verde.

Outra interação forte a ser observada é da LYS199, que faz mais de uma ligação de hidrogênio com o grupo dioxetano e a éter adjacente do AMPPD desfosforilado como é observado na fig. 41. Portanto apesar de existir a mesma quantidade de aminoácidos

polares e apolares, as interações polares ocorrem mais de uma vez, tornando a interação predominantemente polar.

5.1.4 - Interações da HSA (sítio 2) com AMPPD desfosforilado

Os cálculos de energia gerados pela interação do AMPPD desfosforilado interagindo no sítio 2 da HSA no conformero de menor energia no valor de -22,66 kcal/mol, comparando à energia do AMPPD completo neste mesmo sítio que foi de -15,94 kcal/mol, observamos que a interação do AMPPD desfosforilado é 42,2% mais favorável do que o ligante completo no sítio 2, uma diferença relevante, comparando as duas situações do ligante, porém ambas as interações estão bem menos favoráveis quando comparadas às interações do sítio 1.

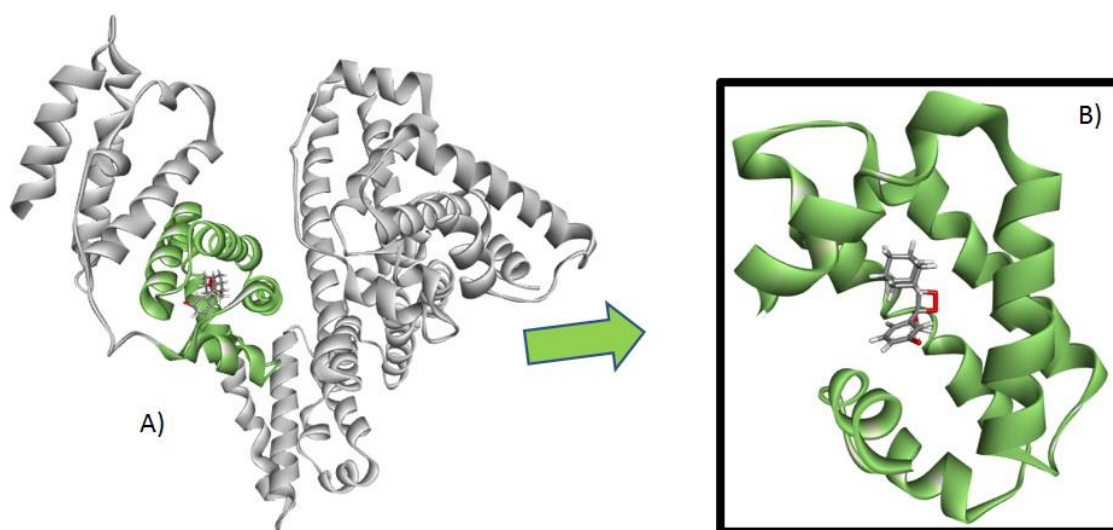


Figura 42. A) representação no formato de fitas da estrutura da HSA destacado o sítio 2 da proteína em verde. B) Ampliação do sítio 2 com o AMPPD desfosforilado em seu interior.

Realizando uma análise visual, é possível notar que o AMPPD desfosforilado entra no sítio 2 da HSA, representado pelas fitas em verde da fig. 42, posicionando-se no meio do sítio.

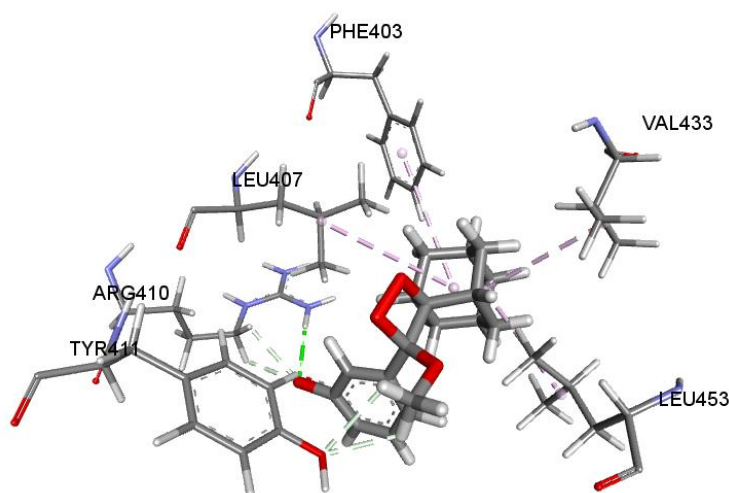


Figura 43. Detalhe das interações entre o AMPPD desfosforilado e os resíduos de aminoácidos do sítio 2 da HSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares.

Realizando uma análise mais detalhada da interação do AMPPD desfosforilado com os aminoácidos do sítio 2 da HSA, fig. 43, observa-se que o ligante interage também com 6 aminoácidos assim como no sítio 1 da HSA. São eles, ARG410, TYR411, LEU407, VAL433, LEU453, PHE403. Destes seis aminoácidos somente dois fazem ligação de hidrogênio, a ARG410 e a TYR411, porém somente a ARG410 faz três ligações de hidrogênio, uma com um hidrogênio de seu grupo amina, e duas com os hidrogênios adjacentes do grupo amina, ainda considerado ligação de hidrogênio segundo os cálculos de docking, o interessante destas interações citadas é que todas são feitas com o oxigênio na posição 3 do anel benzênico, o que não seria possível com o isômero na posição 4, também mostrando a importância deste isômero utilizado para o incremento da fluorescência, apesar de estarmos analisando o sítio menos favorável.

A TYR411 também faz mais de uma ligação de hidrogênio, interagindo o oxigênio do éter do aminoácido com dois hidrogênios do grupo éster do AMPPD desfosforilado.

Com exceção da tirosina que possui um grupo fenol, a fenilalanina é o único aminoácido citado até então que possui um grupo benzênico volumoso, apolar. No caso da interação do resíduo deste aminoácido na posição 403 com o AMPPD desfosforilado, o anel benzênico faz uma interação π -orbital com o grupo diamantanona, que é a região apolar do ligante.

Os resíduos de LEU407, LEU453 e VAL433, que possuem apenas grupos polares em suas estruturas, fazem interações o grupo diamantanona do AMPPD desfosforilado.

5.1.5 - Interações da HSA (sítio 1) com 3-MB

Cálculo de docking molecular mostraram que o 3-MB possui interação energeticamente favorável com o sítio 1 da HSA com um valor -39,47 kcal/mol, comparando com os dois outros estados do ligante, AMPPD completo, e AMPPD desfosforilado, este é o ligante menos favorável dos três, possuindo valores energéticos de interação respectivamente de -61,38 kcal/mol e -64,93 kcal/mol.

Como foi descoberto neste trabalho que o AMPPD entra na HSA desfosforilado, levando em consideração o valor energético de tal ligante, temos que a interação do 3-MB no sítio 1 da HSA é 39,2% menos favorável energeticamente do que o AMPPD desfosforilado. Porém para o mecanismo da reação, inicialmente o mais importante é a entrada do AMPPD desfosforilado na cavidade, na sequência o 3-MB acaba se mantendo na cavidade, o que causa o incremento no rendimento quântico, como já relatado anteriormente com os experimentos práticos.

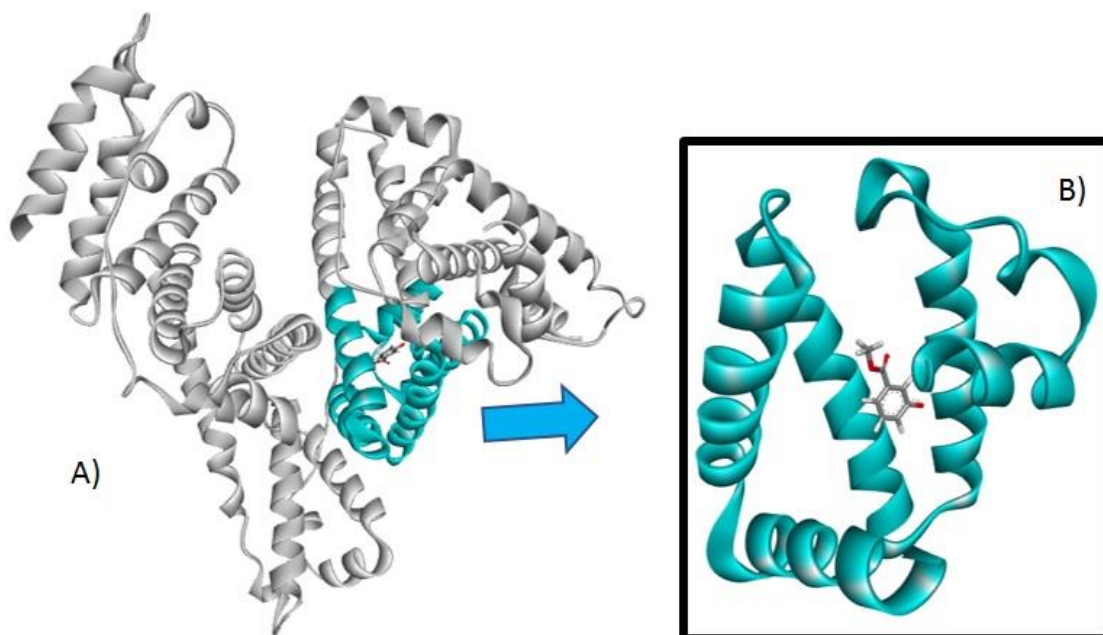


Figura 44. A) representação no formato de fitas da estrutura da HSA destacado o sítio 1 da proteína em azul. B) Ampliação do sítio 1 com o 3-MB em seu interior.

Analisando a interação do 3-MB com o sítio 1 da HSA, fig. 44, visualmente notamos que o ligante entra no centro do sítio 1 da HSA, representado pelas fitas de cor azul.

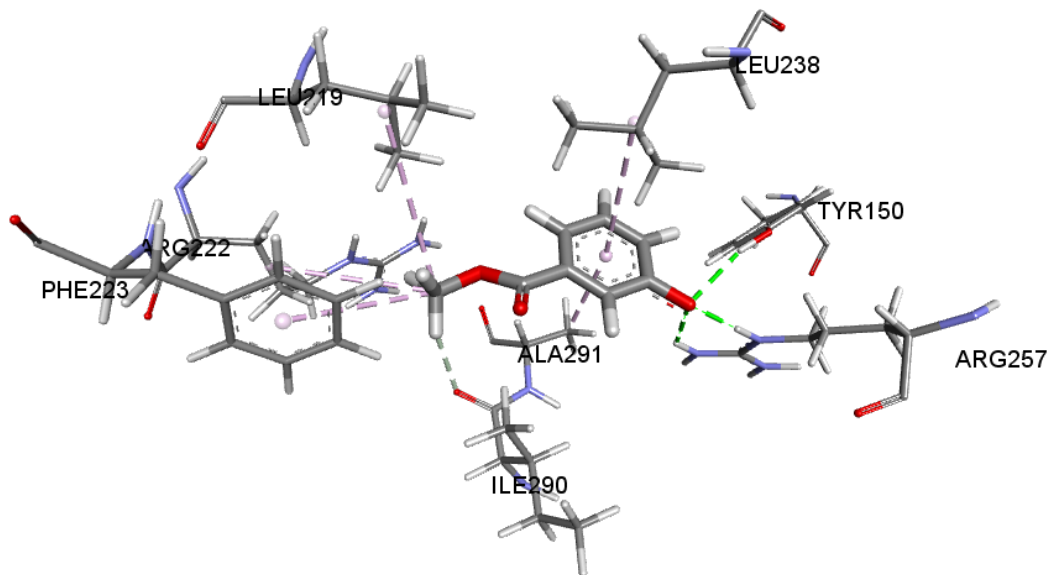


Figura 45. Detalhe das interações entre o 3-MB e os resíduos de aminoácidos do sítio 1 da HSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares.

Uma análise mais detalhada desta interação, fig. 45, nos mostra que o ligante interage com oito resíduos de aminoácidos no sítio 1 da HSA, são eles: ARG257, TYR150, ILE290, LEU219, ARG222, PHE223, LEU238, ALA291. Uma grande quantidade de resíduos, destes três fazem ligação de hidrogênio e cinco interações apolares, a mesma quantidade e proporção de interações que o AMPPD completo no sítio 2 da HSA.

Na interação do 3-MB, a ARG257 e a TYR150, fazem ligações de hidrogênio com o oxigênio na posição 3 do anel aromático do 3-MB, a arginina utilizando dois de seus grupos amina e a tirosina utilizando seu grupo fenol, sendo as interações mais fortes dos oito aminoácidos que participam do processo. Fator importante para explicar a especificidade da interação do 3-MB em comparação ao 4-MB com a HSA.

A ILE290 faz duas interações com o ligante, uma polar entre sua carbonila e um dos hidrogênios do grupo éter do 3-MB, considerada ligação de hidrogênio pelos cálculos de docking, e outra interação apolar entre sua cadeia alifática e o anel aromático do ligante.

A LEU219, ARG222 e a PHE223, fazem interações apolares entre com o carbono do grupo éter do 3-MB, no caso da leucina e da arginina utilizando suas cadeias alifáticas, e no caso da fenilalanina utilizando seu anel benzênico.

E os resíduos de LEU238 e ALA291 utilizam duas cadeias alifáticas para fazer interação apolar com o anel aromático do 3-MB.

Apesar de ser menos favorável energeticamente a interação do 3-MB em comparação ao AMPPD desfosforilado, o primeiro interage com mais resíduos de aminoácidos que segundo, oito resíduos interagem com o 3-MB e seis interagem com o AMPPD desfosforilado, porém em ambos os casos três resíduos de aminoácidos fazem ligação de hidrogênio com os ligantes. Sendo assim a interação do 3-MB com o sítio 1 da HSA é bem efetiva, justificando o incremento do rendimento quântico encontrado nos experimentos práticos.

5.1.6 - Interações da HSA (sítio 2) com 3-MB

Os cálculos de docking mostraram que a energia de interação entre o 3-MB e o sítio 2 da HSA é favorável em -38,82 kcal/mol, muito semelhante a energia encontrada para o sítio 1 com esse ligante, sendo a interação no sítio 2, 1,6% menos favorável, ou seja, praticamente iguais energeticamente.

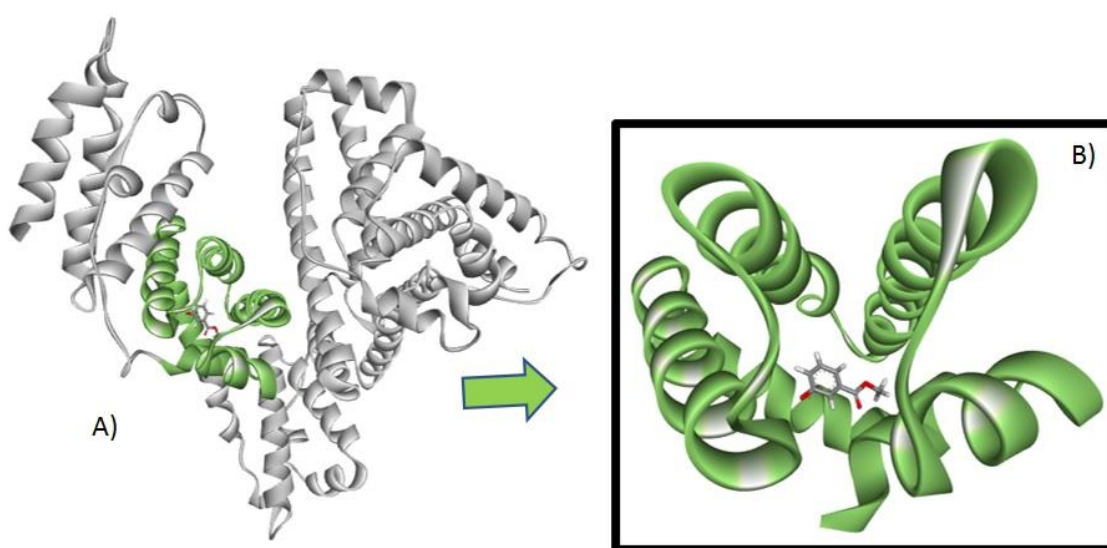


Figura 46. A) representação no formato de fitas da estrutura da HSA destacado o sítio 2 da proteína em verde. B) Ampliação do sítio 2 com o 3-MB em seu interior.

Através de uma análise visual, é possível observar que o 3-MB entra no sítio 2 da HSA, representado pelas fitas em verde na fig. 46.

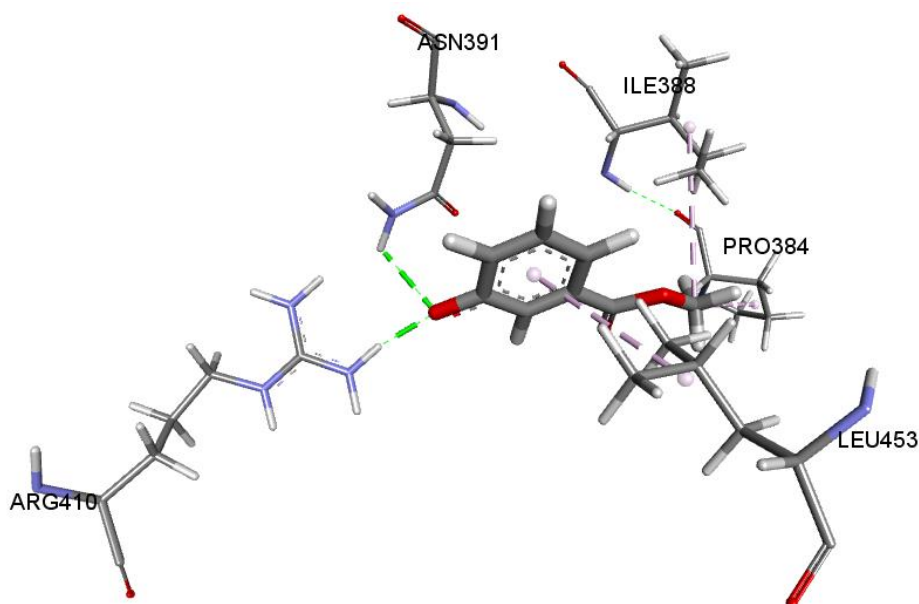


Figura 47. Detalhe das interações entre o 3-MB e os resíduos de aminoácidos do sítio 2 da HSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares.

Identificando os aminoácidos que participam da interação, fig. 47, notamos que apenas cinco aminoácidos participam, o menor número de todas as análises realizadas. Os aminoácidos são: ASN391, ARG410, PRO384, ILE388 e LEU453, destes, dois fazem ligação de hidrogênio, que são a asparagina e a arginina.

Analisando os locais de interação, tanto a ASN391 quanto a ARG410 fazem ligação de hidrogênio com o oxigênio na posição 3 do anel aromático do 3-MB, a asparagina através do nitrogênio de seu grupo amida e a arginina através de um hidrogênio de um de seus grupos amina. Novamente o posicionamento do oxigênio no anel aromático sendo importante para interação, e normalmente são as interações mais fortes do ligante com a sítio da proteína em todas as situações apresentas.

Os resíduos de aminoácidos da PRO384 e ILE388 fazem interações apolares com o carbono do grupo éter do 3-MB, a prolina utilizando a região apolar de sua cadeia

heterocíclica e a isoleucina utilizando sua cadeia alifática. E o resíduo da LEU453 faz interação apolar utilizando sua cadeia alifática com o anel aromático do 3-MB.

Comparando a interação do 3-MB do sítio 2 com a interação do sítio 1, apesar de ambas possuírem praticamente a mesma energia, sendo o sítio 2 levemente menos favorável, na análise de interação com os resíduos de aminoácidos, a interação do sítio 2 aparenta ser muito mais fraca, com três aminoácidos a menos participando da interação e uma ligação de hidrogênio a menos comparado ao sítio 1, o que corrobora com os resultados práticos, que mostra a interação no sítio 1 sendo muito mais efetiva comparada ao sítio 2 da HSA.

5.2 – Estudo de interações com a proteína BSA

5.2.1 - Interações da BSA (sítio 1) com AMPPD

Cálculos de docking da interação do AMPPD com a albumina sérica bovina, BSA, foram realizados utilizando o PDB: 4or0, e mostraram que o AMPPD se liga ao sítio 1 da BSA apesar desta ligação ser muito menos favorável comparado a interação com a HSA, também no sítio 1, sendo obtido valor energético de -25,11 kcal/mol, comparado com a HSA para o mesmo sítio que foi de -61,38 kcal/mol, a interação com a BSA foi 59,1% menos favorável energeticamente, o que corrobora com os resultados dos experimentos práticos realizados.

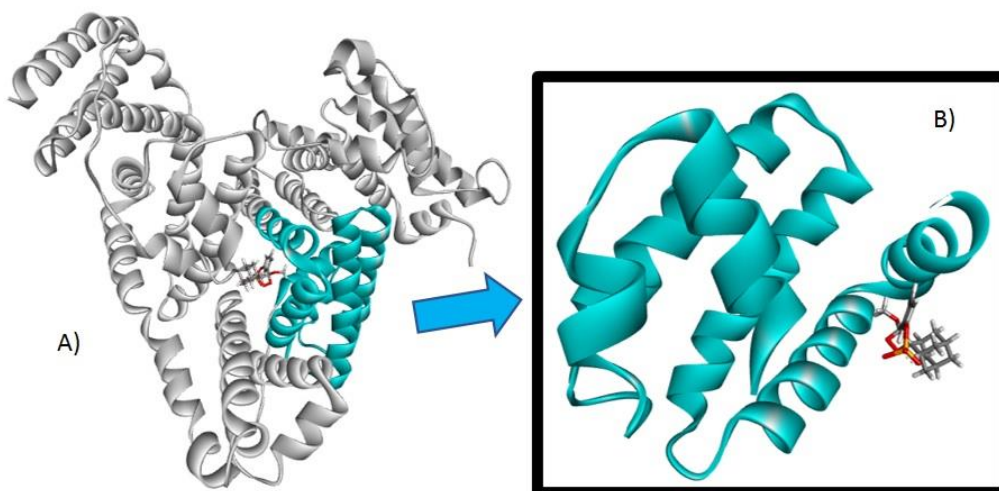


Figura 48. A) representação no formato de fitas da estrutura da BSA destacado o sítio 1 da proteína em azul. B) Ampliação do sítio 1 com o AMPPD em sua borda.

Uma análise visual nos mostra que o AMPPD se liga pelo lado de fora do sítio 1 da BSA, interagindo com os resíduos de aminoácidos da extremidade do sítio, representado pelas fitas em azul da fig. 48.

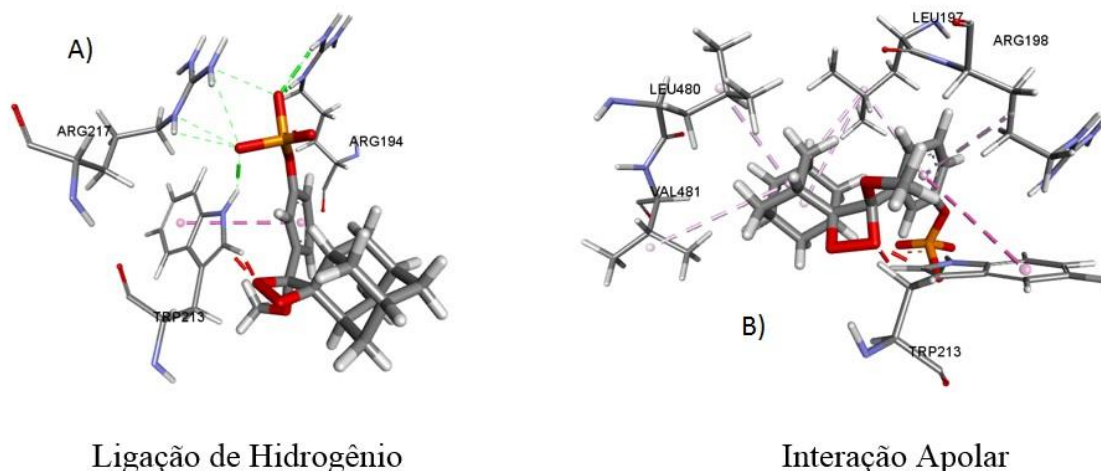


Figura 49. Detalhe das interações entre o AMPPD e os resíduos do sítio 1 da BSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares. A) resíduos que fazem ligações de hidrogênio. B) resíduos que fazem interações apolares.

Em uma análise mais detalhada das interações da fig. 49, observamos que o AMPPD interage com oito aminoácidos no sítio 1 da BSA, uma quantidade grande de interações, e apesar de não aparentar visualmente, somente 2 resíduos de aminoácidos não fazem parte do sítio 1 da BSA, sendo eles a VAL481 e a LEU480, os outros seis aminoácidos fazem parte do sítio 1, sendo eles, ARG194, TYR213, ARG217, LEU197, ARG198, ARG198.

Destes oito resíduos de aminoácidos, três fazem ligação de hidrogênio, a ARG194, TYR213 e a ARG217. Os resíduos de ARG194 e ARG217 fazem ligação de hidrogênio com o grupo fosfato do AMPPD, o resíduo 192 faz duas interações através de seus grupos amina, e o resíduo 217 faz quatro interações, também através de seus grupos amina.

O terceiro resíduo que faz ligação de hidrogênio é o TYR213, através do nitrogênio de seu anel também com o grupo fosfato do AMPPD, e de um dos hidrogênios do anel com o grupo dioxetano do AMPPD. Este mesmo triptofano faz uma interação apolar do tipo π -orbital entre seu anel externo e o anel benzênico do AMPPD.

Os resíduos de aminoácidos LEU480 e VAL481 fazem interação apolar com o grupo diamantanona do AMPPD utilizando suas cadeias alifáticas, a LEU197 também faz interação apolar tanto com o grupo diamantanona como com o anel aromático do AMPPD, esta última interação do tipo π -orbital, mesmo tipo de interação que faz com a ARG198.

Apesar da interação do AMPPD com a BSA ser muito menos favorável energeticamente comparada a interação com a HSA, as análises de interação não demonstram essa diferença, o grande diferencial é que o AMPPD se encaixa na borda do sítio, não chegando a entrar efetivamente.

5.2.2 - Interações da BSA (sítio 2) com AMPPD

Cálculos de energia mostraram que o AMPPD não se liga ao sítio 2 da BSA, apresentando resultado de +14,63 kcal/mol, o que condiz com os resultados experimentais.

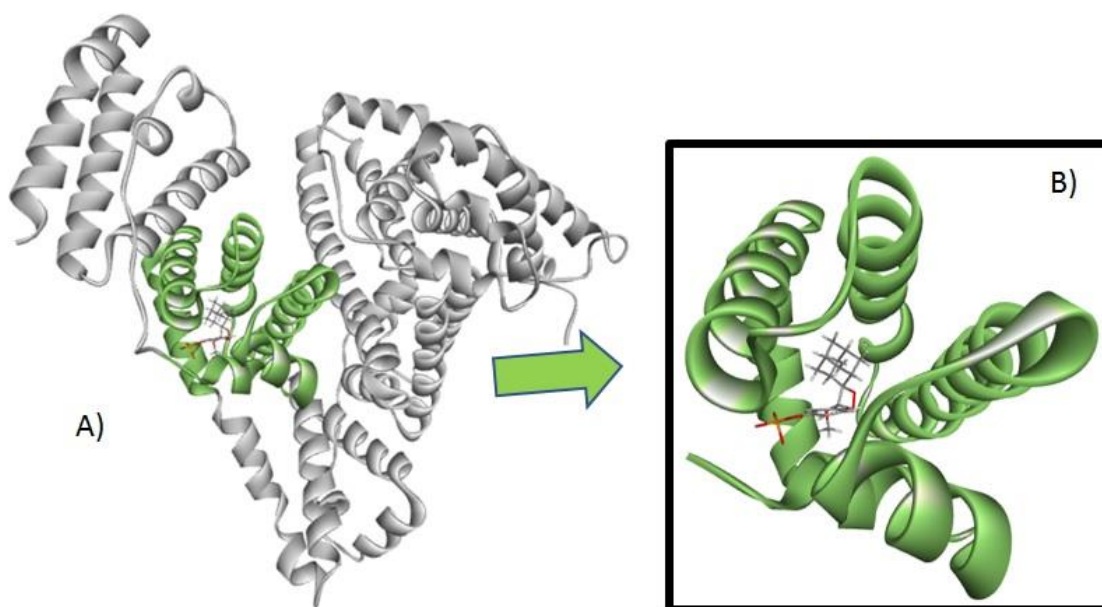


Figura 50. A) representação no formato de fitas da estrutura da BSA destacado o sítio 2 da proteína em verde. B) Ampliação do sítio 2 com o AMPPD em seu interior.

Diferente do sítio 1 da BSA, neste caso o AMPPD entra de fato no sítio 2, representado pelas fitas verdes na fig. 50.

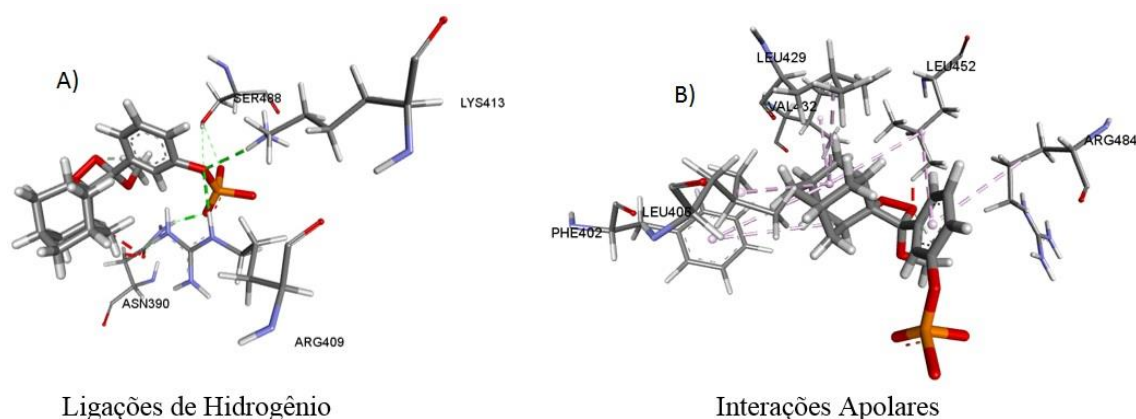


Figura 51. Detalhe das interações entre o AMPPD e os resíduos do sítio 2 da BSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares. A) resíduos que fazem ligações de hidrogênio. B) resíduos que fazem interações apolares.

Analisando as interações do AMPPD com o sítio 2 da BSA, fig. 51, observa-se que o ligante interage com dez resíduos de aminoácidos no interior do sítio, apesar da energia global desse processo ser desfavorável. Os resíduos de aminoácidos que participam dessa interação são: ASN390, ARG409, LYS413 e SER488 os resíduos que fazem ligações de hidrogênio, e PHE402, LEU405, LEU429, VAL432, LEU452 e ARG484 que fazem interações apolares com o AMPPD.

Todos os resíduos de aminoácidos que fazem ligações de hidrogênio interagem através de seus grupos amina com o grupo fosfato do AMPPD, os resíduos de PHE402, LEU406, LEU429, VAL432 fazem interação apolar com o grupo diamantanona do AMPPD, a LEU452 faz interação apolar com o grupo diamantanona e com o anel aromático do AMPPD, e o resíduo de ARG484 faz interação apolar somente com o anel benzênico do AMPPD.

O grande número de interações que o AMPPD faz com os resíduos de aminoácidos do sítio 2 da BSA não reflete o montante final de energia de interação que faz com que o processo final seja desfavorável.

5.2.3 - Interações da BSA (sítio 1) com AMPPD desfosforilado

Análises de energia de interação entre o AMPPD desfosforilado e o sítio 1 da BSA nos mostra que a interação é favorável, apresentando valor de -12,47 kcal/mol, a metade

do valor da interação do AMPPD completo com o sítio 1 da BSA, o que dificulta a permanência do ligante desfosforilado dentro do sítio para a clivagem deste intermediário estável e o incremento de rendimento quântico pela presença do 3-MB na proteína, como foi descoberto tal mecanismo ao longo deste trabalho.

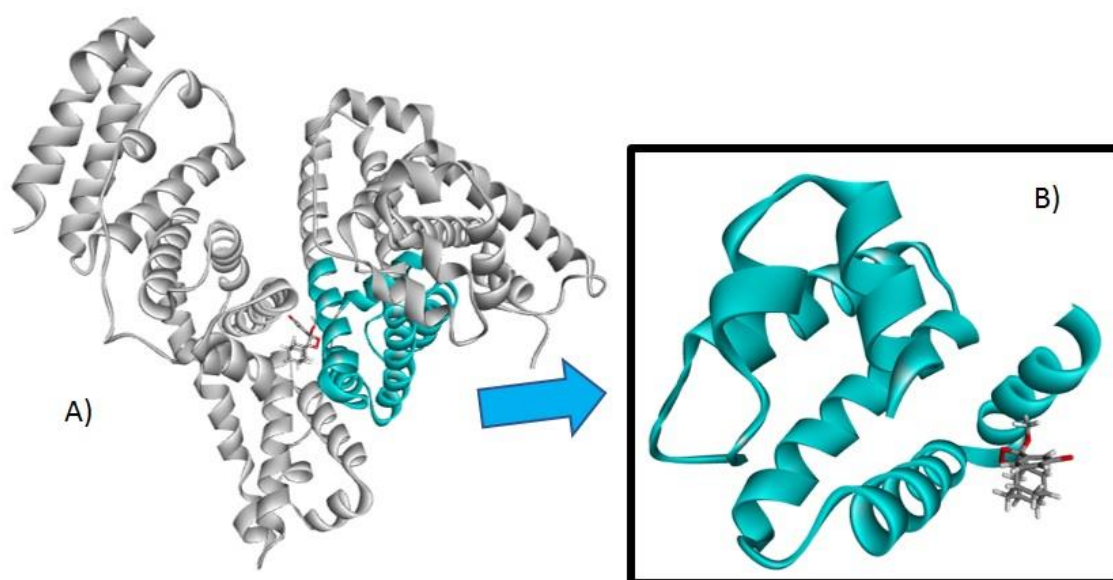


Figura 52. A) representação no formato de fitas da estrutura da BSA destacado o sítio 1 da proteína em azul. B) Ampliação do sítio 1 com o AMPPD desfosforilado em sua borda.

Realizando uma análise visual da fig. 52, observa-se que o ligante não chega a entrar na cavidade do sítio 1 da BSA, representado pelas fitas em azul, ficando ligado à extremidade do sítio, praticamente da mesma forma que o AMPPD completo se ligou a esse mesmo sítio da BSA.

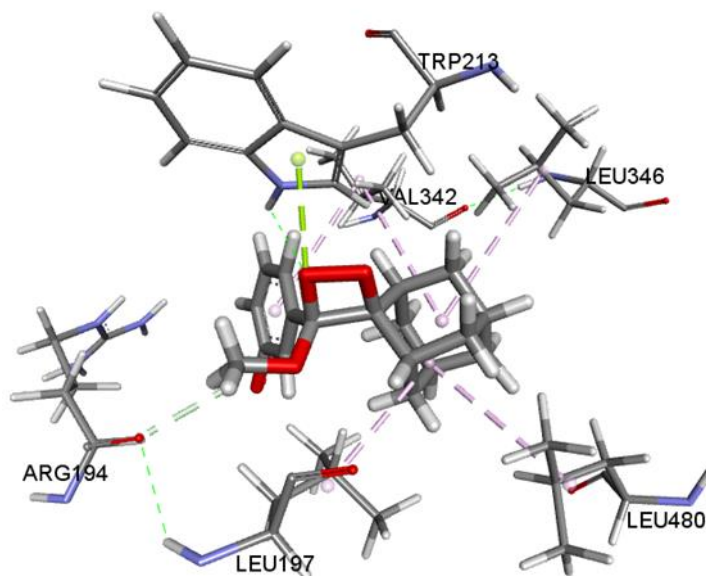


Figura 53. Detalhe das interações entre o AMPPD desfosforilado e os resíduos de aminoácidos do sítio 1 da BSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares.

Em uma análise mais detalhada das interações do AMPPD desfosforilado com os resíduos de aminoácidos do sítio 1 da BSA, fig. 53, notamos que o ligante interage com seis resíduos de aminoácidos, são eles: TYR213 faz ligação de hidrogênio se ligando ao grupo dioxetano através de seu grupo amina e a ARG194 faz ligação de hidrogênio com um hidrogênio do grupo metila do éter do AMPPD desfosforilado, LEU197, LEU480 e LEU346 que fazem interações apolares com o grupo diamantanona do AMPPD desfosforilado, a VAL342 faz interações apolares com o grupo diamantanona e o anel benzênico do ligante, portanto, dois resíduos fazendo ligação de hidrogênio e quatro resíduos fazendo interações apolares.

Vale ressaltar que dois dos resíduos de aminoácidos citados não fazem parte do sítio 1 analisado, sabendo que o sítio 1 abrange os resíduos das posições 196 a 294, portanto as LEU346 e LEU480 não fazem parte deste sítio, estes integram os resíduos do sítio 2 da BSA, porém a maior parte dos resíduos é do sítio 1, o que provavelmente justifique a interação ser favorável apesar do valor baixo de energia.

Vale salientar nesta interação entre o AMPPD desfosforilado e o sítio 1 da BSA que o oxigênio na posição 3 do anel benzênico do ligante não participa de nenhuma interação com a proteína, o que não ocorreu em nenhuma das interações entre os diversos estados do ligante e a HSA, portanto devendo ser um fator determinante na força de

interação, o que corrobora novamente com a ausência do fenômeno de incremento de rendimento quântico para o isômero 4-MB como explorado anteriormente nos experimentos práticos relatados anteriormente.

5.2.4 - Interações da BSA (sítio 2) com AMPPD desfosforilado

Cálculos de docking molecular mostraram que o AMPPD desfosforilado não possui interação energeticamente favorável com o sítio 2 da BSA, da mesma forma como ocorreu para o ligante completo para este mesmo sítio, apresentando valor de +15,77 kcal/mol, praticamente o mesmo valor encontrado para a interação do ligante completo.

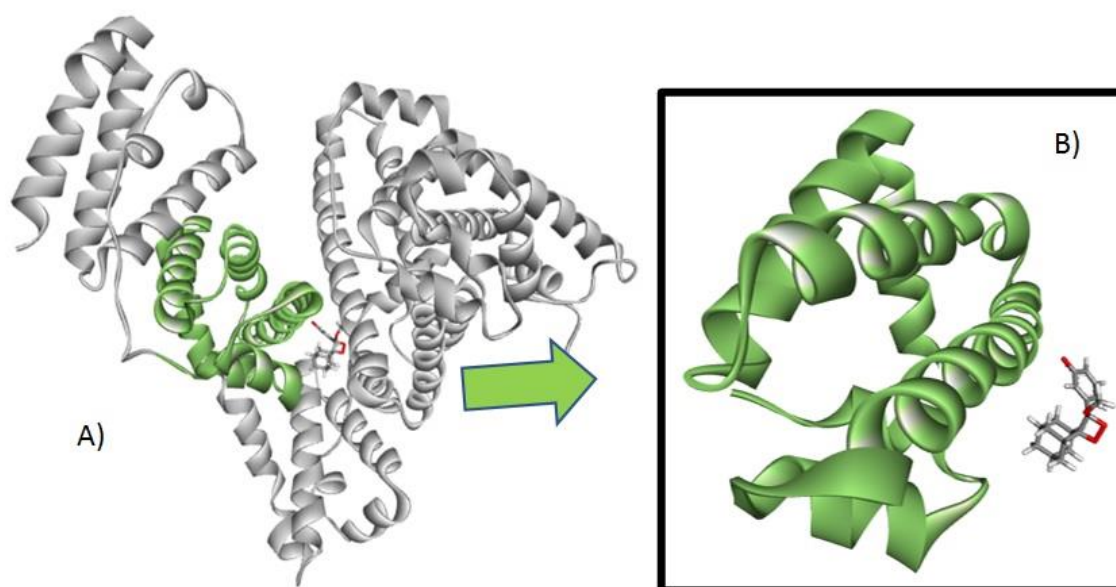


Figura 54. A) representação no formato de fitas da estrutura da BSA destacado o sítio 2 da proteína em verde. B) Ampliação do sítio 2 com o AMPPD desfosforilado fora de seu domínio.

Visualmente é possível observar que o ligante fica muito fora do sítio 2 da BSA, representado pelas fitas em verde da fig. 54. Semelhante ao caso do AMPPD desfosforilado no sítio 1 e do AMPPD completo no sítio 1 da BSA, porém neste caso do sítio 2 é o caso em que o ligante se encontra mais afastado do centro do sítio.

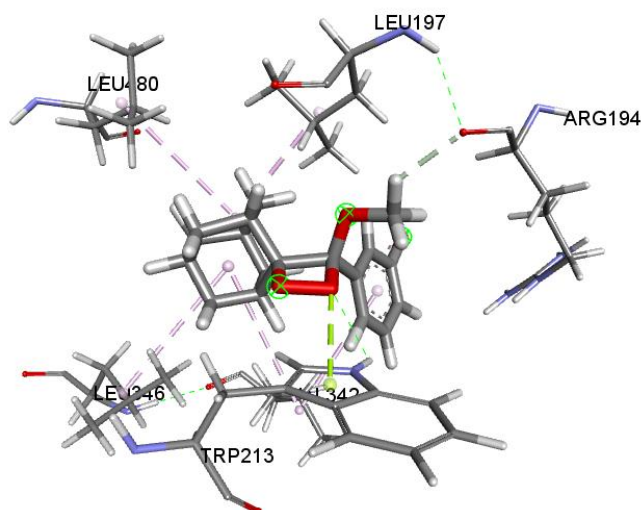


Figura 55. Detalhe das interações entre o AMPPD desfosforilado e os resíduos de aminoácidos do sítio 2 da BSA, as linhas tracejadas em verde são representações das ligações de hidrogênio, e as em lilás representações das interações apolares.

Uma análise mais detalhada das interações realizadas entre o AMPPD desfosforilado e o sítio 2 observa-se que seis resíduos de aminoácidos participam da interação com o ligante, sendo eles: ARG194, LEU197, TYR213, VAL342, LEU346 e LEU480. Sabendo que os resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio 2 vai da posição 391 até a posição 495, destes seis aminoácidos citados apenas um faz parte do sítio 2, o que corrobora com a fig. 55, do ligante fora do sítio, provavelmente por este motivo é energeticamente desfavorável.

Dos resíduos de aminoácidos citados, o TYR213 e ARG194 fazem ligação de hidrogênio com o AMPPD desfosforilado, ambos os resíduos pertencentes ao sítio 1 e não ao 2 que está sendo analisado neste momento, somente lembrando a técnica utilizada para esses cálculos de docking no programa GOLD, o ligante de interesse é rodado, calculado, na mesma posição de um ligante cristalizado neste caso no sítio 2, e mesmo assim neste caso o AMPPD desfosforilado não fez interações com os resíduos de aminoácidos deste sítio. Os demais resíduos fazem interações apolares com o ligante.

Novamente o oxigênio do anel aromático do AMPPD desfosforilado não faz nenhuma interação com os resíduos de aminoácidos da BSA.

Tabela 1. Resumo das energias de interação dos ligantes com a proteína HSA, unidade de medida kcal.mol⁻¹.

HSA	AMPPD	AMPPD desf.	3-MB
Sítio 1	-61,38	-64,93	-39,47
Sítio 2	-15,94	-22,66	-38,82

Tabela 2. Resumo das energias de interação dos ligantes com a proteína BSA, unidade de medida kcal.mol⁻¹.

BSA	AMPPD	AMPPD desf.
Sítio 1	-25,11	-12,47
Sítio 2	+14,63	+15,77

Nas tabelas 1 e 2 é possível notar a grande discrepância de interação que existe entre os ligantes e as albuminas HSA e BSA, observa-se que albumina humana possui interações mais favoráveis em todas as situações estudadas.

5.3 – Conclusão

Os cálculos de docking no programa GOLD corroboraram com todos os resultados obtidos nos experimentos práticos, sendo de grande valia para mostrar se as interações eram energeticamente favoráveis, e quais as posições exatas de interação das diferentes situações do ligante AMPPD dentro dos sítios das proteínas HSA e BSA, ajudando também a mostrar a importância do posicionamento do oxigênio do anel benzênico do AMPPD na interação do ligante dentro do sítio, sendo provavelmente um fator determinante no incremento do rendimento quântico causado pela interação do 3-MB com a proteína HSA, justificando o principal fenômeno observado de aumento de luminescência do AMPPD na presença da HSA.

6 - Referências Bibliográficas

- ABUIN, E.; CALDERÓN, C.; LISSI, E. Interaction of alkylpyridinium chlorides with human serum albumin studied by fluorescence techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 2008. 295–300.
- ADAM, W. et al. Electron Exchange Luminescence of Spiroadamantane-Substituted Dioxetanes Triggered by Alkaline Phosphatase. Kinetics and Elucidation of pH Effects. **Journal of the American Chemical Society**, 1996.
- AL-HARTHI, S. et al. Towards the functional high-resolution coordination chemistry of blood plasma human serum albumin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2019.
- BAOQU, W. et al. Thiol–Chromene “Click” Reaction-Activated Chemiluminescent Probe for Thiol Detection In Vitro and In Vivo. **Applied materials & interfaces**, 2023. 34505–34512.
- BELINSKAIA, D. A.; GONCHAROV, N. V. Theoretical and Practical Aspects of Albumin Esterase Activity. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, 2020. 287–298.
- BERTOZO, L. C. et al. Entropy-driven binding of octyl gallate in albumin: Failure in the application of temperature effect to distinguish dynamic and static fluorescence quenching. **J Mol Recognit**, 2020.
- BERTOZO, L. C. et al. Induced circular dichroism as a tool to monitor the displacement of ligands between albumins. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Maio 2022.
- BHATTACHARYA, A. A. et al. Concentration-Dependent Reversible Self-Oligomerization of Serum Albumins through Intermolecular β -Sheet Formation. **American Chemical Society**, 2014.
- BOTTEGONI, G. Protein-ligand docking. **Frontiers in Bioscience**, 2011. 2289-2306.
- BRONSTEIN, I.; EDWARDS, B. S.; VOYTA, J. C. 1,2-Dioxetanes: Novel chemiluminescent enzyme substrates. Applications to immunoassays. **Luminescence**, 1989.
- CARTER, D. C. et al. Three-dimensional structure of human serum albumin. **Science**, 1989. 1195–8.
- CHANG, J. et al. Direct and Specific Detection of Glyphosate Using a Phosphatase like Nanozyme-Mediated Chemiluminescence Strategy. **Analytical Chemistry**, 2023. 4479-4485.
- CHEN, S. L.; LIAO, R. Z. Phosphate Monoester Hydrolysis by Trinuclear AlkalinePhosphatase; DFT Study of Transition States and ReactionMechanism. **ChemPhysChem**, 2014. 2321 – 2330.
- CHEN, Y. C.. et al. Binding between Saikosaponin C and Human Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy and Molecular Docking. **Molecules**, 2016. p. 153.
- CHEN, Y. M.; GUO, L. H. Fluorescence study on site-specific binding of perfluoroalkyl acids to human serum albumin. **Archives of Toxicology**, 2009. 255–261.
- DAS, G. et al. Effect of synchrotron polarization on grazing incidence X-ray fluorescence analysis, 2014. 2405–2413.

DE WEERT, M. V.; STELLA, L. Fluorescence quenching and ligand binding: a critical discussion of a popular methodology. **J Mol Struct**, 2011. 998.

DEEB, O. et al. Exploration of Human Serum Albumin Binding Sites by Docking and Molecular Dynamics Flexible Ligand–Protein Interactions. **Biopolymers**, 2009.

DEMIR, F. T.; DEMIR, E. Potential genotoxic and biological effects of 1,4 dioxane on. **Environmental Science & Health**, 2023.

DIMA, V. et al. Can umbilical alkaline phosphatase be used as a hemolysis marker in neonates? **Romanian Medical Journal**, 2021. 98-104.

ERNEST, C. T. High-Resolution Studies of the $\tilde{A}^1A_2-\tilde{X}^1A_1$ Electronic Transition of Formaldehyde: Spectroscopy and Photochemistry. **University of Miami**, 2011.

FAN, N. et al. ALP-Activated Chemiluminescence PDT Nano-Platform for Liver Cancer-Specific Theranostics. **Applied Bio Materials**, 2021. 1740-1748.

GHUMAN, J. et al. Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin. **Journal of Molecular Biology**, 2005. 38-52.

GILLESPIE, P. G.; HUDSPETH, A. J. Chemiluminescence detection of proteins from single cells. **Biochemistry**, 1991. 2563-2567.

GRACIANI, F. S.; XIMENES, V. F. Investigation of Human Albumin-Induced Circular Dichroism in Dansylglycine. **PLOS one**, 2013.

GUDEM, M.; KOWALEWSKI, M. Cavity-Modified Chemiluminescent Reaction of Dioxetane. **The journal of physical chemistry**, 2023. 9483–9494 This article is licensed under CC-BY 4.0.

HAO, C. et al. Fluorescence quenching study on the interaction of ferroferric oxide nanoparticles with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2017. 191-197.

HUANG, J.; PU, K. Activatable Molecular Probes for Second Near-Infrared Fluorescence, Chemiluminescence and Photoacoustic Fluorescence Chemiluminescence and Photoacoustic. **Angewandte Chemie**, 2020. 1717–11731.

JALALI, F.; DORRAJI, P. S.; MAHDIUNI, H. Binding of the neuroleptic drug, gabapentin, to bovine serum albumin: Insights from experimental and computational studies. **Journal of Luminescence**, 2014. 347–352.

JUÁREZ, J. et al. Hydration effects on the fibrillation process of a globular protein: the case of human serum albumin. **Royal Society of Chemistry**, 2012.

JUÁREZ, J.; TABOADA, P.; MOSQUERA, V. Existence of Different Structural Intermediates on the Fibrillation Pathway of Human Serum Albumin. **Elsevier BV**, 2009.

JURCZYK, M. M. et al. Human Serum Albumin Aggregation/Fibrillation and its Abilities to Drugs Binding. **Molecules**, 2020.

KANEGAE, M. P. P. et al. Chemiluminescent Determination of Leukocyte Alkaline Phosphatase: An Advantageous Alternative to the Cytochemical Assay. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, 2007. 91-96.

- KHALID, M. et al. Solvent polarity influence on chemiexcitation efficiency of inter and intramolecular electron-transfer catalyzed chemiluminescence. **Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry**, 2022.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Baltimore - USA: Springer Science+Business Media, LLC, 2006.
- LALLÈS, J. P. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. **Nutrition Reviews**, 2014. 82-94.
- LIU, M. H. et al. An electrostatic force-independent dephosphorylation-driven chemiluminescent biosensor for sensitive and rapid detection of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in human breast tissues. **Chemical Engineering Journal**, 2023.
- LIU, Y. et al. CB-Dock2: improved protein–ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting. **Nucleic Acids Research**, 2022. 159-164.
- MAIER, R. et al. Human versus Bovine Serum Albumin: A Subtle Difference in Hydrophobicity Leads to Large Differences in Bulk and Interface Behavior. **Crystal Growth & Design**, 2021.
- MAJOREK, K. A. et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. **Molecular Immunology**, 2012. 174-182.
- MALLICK, S.; PAL, K.; KONER, A. L. Probing microenvironment of micelle and albumin using diethyl 6-(dimethylamino)naphthalene-2,3-dicarboxylate: An electroneutral solvatochromic fluorescent probe. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2016. 81-89.
- MERLOT, A. M.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Unraveling the mysteries of serum albumin more than just a serum protein. **Frontiers in physiology**, 2014. 1-7.
- MILLÁN, J. L. Alkaline Phosphatases Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. **Springer**, 2006. 335-341.
- ONCLEY, J. L. Dielectric behavior and atomic structure of serum albumin. **Biophysical Chemistry**, 2003. 151–158.
- OUYANG, H. et al. Emitter–Quencher Pair of Single Atomic Co Sites and Monolayer Titanium Carbide MXenes for Luminol Chemiluminescent Reactions. **American Chemical Society**, 2021. 60945–60954.
- PAAL, K.; SHKARUPIN, A.; BECKFORD, L. Paclitaxel binding to human serum albumin—Automated docking studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2007. 1323–1329.
- PABIS, A.; DUARTE, F.; KAMERLIN, S. C. L. Promiscuity in the Enzymatic Catalysis of Phosphate and Sulfate Transfer. **Biochemistry**, 2016. 3061–3081.
- PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, 2017.
- PETERS, T. J. **All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications**. San Diego, California: Academic Press, 1995.
- QUAN, Z. et al. Mechanistic Investigation of H₂O₂-dependent Chemiluminescence from Tetrabromo-1,4-Benzoquinone. **European Chemical Societies Publishing**, 2022. 1-9.

- ROY, S. Fluorescence quenching methods to study protein–nucleic acid interactions. **Methods Enzymol.**, 2004. 175-187.
- RYAN, A. J. et al. Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin. **Journal of Structural Biology**, 2011. 84-91.
- SINGH, T. S.; MITRA, S. Interaction of cinnamic acid derivatives with serum albumins: A fluorescence spectroscopic study. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2011. 2011.
- SIVERTSEN, A. et al. Synthetic cationic antimicrobial peptides bind with their hydrophobic parts to drug site II of human serum albumin. **BMC structural biology**, 2014. 1472-6807.
- SZMACINSKI, H.; TERPETSCHNIG, E.; LAKOWICZ, J. R. Synthesis and evaluation of Ru-complexes as anisotropy probes for protein hydrodynamics and immunoassays of high-molecular-weight antigens. **Biophysical Chemistry**, 1996. 109-120.
- VAQUÉ, M. et al. Protein-ligand Docking: A Review of Recent Advances and Future Perspectives. **Current Pharmaceutical Analysis**, 2008. 1-19.
- VIMALRAJ, S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. **Gene**, 2020.
- WANG, Q. et al. Binding interaction of atorvastatin with bovine serum albumin: Spectroscopic methods and molecular docking. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2016. 155–163.
- YAMMINE, A.; GAO, J.; KWAN, A. H. Tryptophan fluorescence quenching assays for measuring protein-ligand binding affinities: principles and a practical guide. **Bio-Protocol**, 2019.
- YU, X. et al. Studies on the interactions of theaflavin-3,3'-digallate with bovine serum albumin: Multi-spectroscopic analysis and molecular docking. **Food Chemistry**, 2022.
- YUE, L.; LIU, Y. J. Mechanism of AMPPD Chemiluminescence in a Different Voice. **Journal of chemical theory and computation**, 2013. 2300–2312.
- ZENDJABIL, M. Review Glycated albumin. **Clinica Chimica Acta**, 2020. 240-244.