



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA

**ESTUDOS DE INTERAÇÃO DO TIMEROSAL COM ALBUMINA DO SORO BOVINO
(BSA) SIMULANDO CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS E EMPREGANDO TÉCNICAS
ESPECTROSCÓPICAS: MECANISMO E PERFIL DE FIBRILAÇÃO PROTEICA**

JOÃO CÉSAR NASCIMENTO SANTOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

JOÃO CÉSAR NASCIMENTO SANTOS

ESTUDOS DE INTERAÇÃO DO TIMEROSAL COM ALBUMINA DO
SORO BOVINO (BSA) SIMULANDO CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS E
EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS: MECANISMO E
PERFIL DE FIBRILAÇÃO PROTEICA

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Maceió – AL
2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S237e

Santos, João César Nascimento.

Estudos de interação do timerosal com albumina do soro bovino (BSA) simulando condições fisiológicas e empregando técnicas espectroscópicas : mecanismo e perfil de fibrilação protéica / João César Nascimento Santos. – 2017.

59 f.: il.

Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.

Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 51-59.

1. Timerosal. 2. Albumina do soro bovino (BSA). 3. Mecanismo de interação. 4. Fibrilação. I. Título.

CDU: 544.6



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

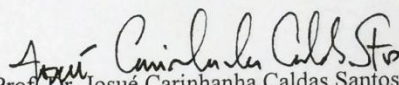


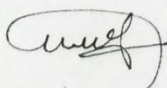
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

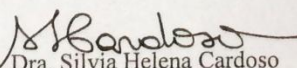
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de João César Nascimento Santos, intitulada: "Estudos de Interação do Timerosal com Albumina do Soro Bovino (BSA) Simulando Condições Fisiológicas e Empregando Técnicas Espectroscópicas: Mecanismo e Perfil de Fibrilação Proteica", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 24 de fevereiro de 2017, às 14h, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Josué Carinhonha Caldas Santos
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)


Profa. Dra. Ana Maria Queijeiro Lopez
(PPGQB/IQB/UFAL)


Profa. Dra. Sílvia Helena Cardoso
(Campus Arapiraca UFAL)

Dedico este trabalho a minha tia-mãe Maria Amara. Amor incondicional tenho desfrutado nesta árdua jornada e isto me deu base e força para alcançar o meu sonho, o mestrado em Química.

AGRADECIMENTOS

A meu Senhor Jesus Cristo pelas oportunidades criadas a meu favor, sendo esta conclusão do mestrado meu sonho de ensino médio. Por guiar-me pelas veredas da verdade e justiça e que agora, suas palavras claras como a neve e suas instruções fazem toda a diferença no meu cotidiano.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Josué Carinhana que proporcionou que este período fosse os dois anos que mais aprendi na minha vida!

A Profa. Dra. Isis Martins por realizar os ensaios de RMN¹H e ajudar na interpretação dos resultados. Aos Prof^{os} Dr. Ângelo de Fátima, doutoranda Braga e Dr. Jarbas Resende pela contribuição na análise por Dicroísmo Circular.

É imensurável a gratidão que tenho por minha família, e este sentimento é constantemente nutrido, na maior parte, por eles mesmos. A figura máxima de todo esse amor é minha mãe, Luciene Nascimento, cujos valores morais sempre me foram transmitidos com eficiência. Também é dela que me vem às expressões verbais de confiança e olhares de esperança mais confortantes e animadores. Longas conversas nas sextas-feiras à noite acerca das dificuldades do mestrado e sempre ouvia um voz calma a suave: meu filho, você consegue! O que mais poderia dizer a não ser um... Te amo!

Ao meu pai, José João, pelo esforço desmedido para suportar toda essa carga que é ter o filho mais velho se debruçando numa pós-graduação e assim, suportar as dificuldades financeiras e emocionais.

A minha irmã, Luciane Mayara, que foi uma ferramenta eficaz quando precisei de alguém que me ajudasse nas tarefas que a vida demanda, afinal, continuamos com vida social “fora da pós”.

A minha tia, Maria Amara, por “me adotar” e me passar toda a base/suporte que precisei durante esses dois anos. Meu muito obrigado! Deus me abençoou de forma sublime ao colocar a senhora na minha vida. Amo-te!

Aos meus colegas do LINQA que sempre me ajudaram. É um orgulho fazer parte desta equipe. Dentre estes, agradeço de forma especial a Carol Fradique por todo seu apoio e companheirismo, até mesmo nas maiores dificuldades. Isabella Miranda e Allyson Roberto por dividirmos nossas experiências desde o início desta jornada. Também agradeço a Marina Magalhães que em vários momentos me ajudou e me mostrou “o melhor caminho” nos experimentos e no laboratório como um todo. Experiências valiosas encontrei nos diálogos com Elysson, ajudando-me a vencer alguns obstáculos da falta de convivência num grupo de pesquisa.

A prof.^a Dr. Ana Maria pelas longas conversas e instruções que me foram passadas no início do mestrado. Serei eternamente grato!

“Bem-aventurado o homem que encontra sabedoria, e o homem que adquire conhecimento, pois ela é mais proveitosa do que a prata, e dá mais lucro do que o ouro.”

Provérbios 3.13-14.

RESUMO

A interação entre albumina do soro bovino (BSA) e timerosal (TM), composto orgânico de mercúrio, foi investigada utilizando métodos espectroscópicos. Os resultados, por fluorescência molecular, evidenciam que a interação acontece por *quenching* estático através de forças eletrostáticas de forma espontânea ($\Delta G = - 4,40 \text{ kJ mol}^{-1}$ a 30°C). A constante de ligação (K_b) foi de $3,24 \pm 0,01 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ (30°C) sendo considerada uma interação moderada. A fluorescência em três dimensões revelou que TM causa mudanças estruturais envolvendo a cadeia polipeptídica da BSA assim como altera a polaridade dos resíduos de triptofano e tirosina, confirmada por dicroísmo circular (DC) que evidenciou aumento no conteúdo de α -hélice após interação com TM. Além disto, TM diminui a hidrofobicidade superficial da proteína. Bilirrubina foi utilizada como marcador para o subdomínio IB, confirmando que TM interage nesta região da proteína. O estudo do mecanismo de interação propôs que TM reage com BSA através do resíduo de cisteína livre, formando o aduto BSA-HgEt com liberação de ácido tiosalicílico (ATS), que interage com os aminoácidos com cadeia lateral positiva. Por fim, foi visto que TM acelera a cinética de fibrilação proteica em 42%, sendo um possível indício da toxicidade deste composto em sistemas biológicos.

Palavras-Chaves: Timerosal. BSA. Mecanismo de interação. Fibrilação.

ABSTRACT

Interaction between bovine serum albumin (BSA) and thimerosal (TM), organic mercury compound, was investigated by spectroscopic methods. The results, by molecular fluorescence, show that the interaction takes place by static quenching with electrostatic forces spontaneously ($\Delta G = - 4.40 \text{ kJ mol}^{-1}$ at 30°C). The binding constant (K_b) was $3.24 \pm 0.01 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ (30°C) is considered a moderate interaction. Fluorescence in three dimensions revealed that TM causes structural involving the the polypeptide chain BSA changes in the polarity of the tryptophan and tyrosine residues confirmed by circular dichroism (CD) showed an increase in α -helix content after interaction with TM. In addition, the TM decreases the surface hydrophobicity of the protein. Bilirubin was used as a marker for the subdomain IB, confirming that TM interacts in this region of the protein. The study of the interaction mechanism proposed that TM is reacted with BSA through the free cysteine residue, forming the adduct BSA-HgEt release of thiosalicylic acid (ATS), which interacts with amino acids with side chain positive. Besides, it was seen that TM accelerates the protein fibrillation kinetics by 42%, with a possible indication of the toxicity of this compound in biological systems.

Keywords: Thimerosal. BSA. Interaction mechanism. Fibrillation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 –	Formação do complexo proteína-ligante.....	14
Figura 02 –	Estrutura química do Timerosal (TM) e seus respectivos produtos de degradação: ácido tiosalicílico (ATS) e etil mercúrio (EtHg ⁺).....	18
Figura 03 –	Estrutura da albumina do soro bovino.....	20
Figura 04 –	a) Espectro de fluorescência da BSA (2 µM) com adição de incrementos de TM (0-80 µM); b) Curva linear para cálculo de Stern-Volmer no processo de <i>quenching</i> ; c) Curva para determinação da constante de ligação.....	26
Figura 05 –	Curva de Van't Hoff para a interação BSA-TM.....	28
Figura 06 –	Efeito de NaCl (0-150 mM) na interação do complexo BSA-TM.....	29
Figura 07 –	Espectros de absorção de BSA (3 µM), TM (12 µM), da mistura BSA+TM e a diferença dos espectros (BSA+TM) – TM.....	30
Figura 08 –	Espectro de fluorescência tridimensional para BSA 2µM (a) com adição de TM (50 µM) (b).....	31
Figura 09 –	Espectro de dicroísmo circular da BSA (2µM) na presença de TM (2 µM, 4 µM e 8 µM).....	33
Figura 10 –	Efeito de competidores na constante da interação BSA-TM.....	35
Figura 11 –	a) Espectro de fluorescência do complexo ANS-BSA com adição de TM. ANS (2 µM), BSA (2 µM), TM (0-80 µM); b) Adição de ANS (0-30 µM) ao sistema BSA-TM, BSA (2 µM), TM (40 µM); c) Ligação ANS a BSA (2 µM) na ausência (▲) e presença (●) de TM (40 µM).....	36
Figura 12 –	a) Espectro de emissão dos resíduos de tirosina (λ= 15 nm) e triptofano (λ= 60 nm) na interação BSA-TM. Fluorescência sincronizada para o resíduo de tirosina (b) e o resíduo de triptofano (c) com adição de incrementos de TM (0-80 µM).....	38
Figura 13 –	Estrutura química dos marcadores de sítio varfarina (a), ibuprofeno(b), diazepam (c) e bilirrubina (d).....	39
Figura 14 –	Sítio de ligação utilizando os marcadores varfarina, ibuprofeno, diazepam e bilirubina, todos a 2 e 4 µ M na interação da BSA (2 µM) com TM (0-80 µM) monitorando variação de K _b	39

Figura 15 –	Reação de Ellman.....	40
Figura 16 –	Absorvância das soluções: BSA, BSA+EtHgCl, BSA+NEM, TM e BSA+TM. Todos a 60 μ M.....	41
Figura 17 –	Reações da BSA e TM empregando DTNB.....	41
Figura 18 –	Hipóteses para o mecanismo de interação.....	42
Figura 19 –	Absorção das soluções de: cisteína, ATS, BSA e a soma das absorções de BSA+ATS e a absorção da mistura BSA+ATS. Todos a 60 μ M.....	43
Figura 20 –	Produtos de degradação do TM.....	43
Figura 21 –	Titulação espectrofluorimétrica da BSA (2 μ M) com incrementos de EtHg ⁺ (a), ATS (b) e DATS (c), todos variando 0-100 μ M.....	44
Figura 22 –	Espectro de RMN ¹ H de TM (1 mM) monitorado durante 15 dias (a) e espectro das soluções de EtHg ⁺ , cisteína, TM+cisteína, ATS+EtHg ⁺ , TM e ATS (b, c e d).....	46
Figura 23 –	Espectro de RMN ¹ H de TM (1 mM) na presença de BSA nas proporções 100:1, 50:1 e 25:1.....	46
Figura 24 –	Sobreposição espectral da emissão de fluorescência de BSA (curva a), com absorção de TM (curva b).....	48
Figura 25 –	a) Espectro de fluorescência da tioflavina T (20 μ M) para a fibrilação da BSA (2,5 mg L ⁻¹) na presença de TM (100 μ M); b) Cinética de fibrilação para a BSA (2,5 mg L ⁻¹ , ■) na presença e ausência de TM (●) e EtHgCl (▲) ambos a 100 μ M.....	50

LISTA DE TABELA

Tabela 01	Parâmetros, vantagens e desvantagens sobre as principais técnicas para avaliação da interação proteína-ligante.....	16
Tabela 02 –	Parâmetros de ligação e termodinâmicos para a interação entre BSA e TM em diferentes temperaturas.....	27
Tabela 03 –	Características do espectro de fluorescência tridimensional para a interação BSA-TM.....	32
Tabela 04 –	Espécies presentes no plasma e no soro humano.....	34
Tabela 05 –	Parâmetros de hidrofobicidade na superfície da BSA na presença e ausência de TM.....	37
Tabela 06 –	Fluorescência sincronizada para a interação BSA-TM.....	38
Tabela 07 –	Marcadores de sítio de ligação na avaliação da interação entre BSA-ATS e BSA-DATS.....	44
Tabela 08 –	Deslocamento químico do espectro de TM na ausência e na presença de diferentes proporções de BSA.....	47
Tabela 09 –	Parâmetros cinéticos no processo de fibrilação da BSA.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

A – Absorvância

ADTS – Ácido 2,2 ditiodibenzoico

ANS – Ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato

ATS – Ácido tiosalicílico

BSA – Albumina do soro bovino

Cis – Cisteína

DC – Dicroísmo circular

DTNB – Ácido 5,5-bisditionitrobenzoico

F – Fluorescência

FRET – Transferência de energia por ressonância de fluorescência

HSA – Albumina do soro humano

HSP – Índice de hidrofobicidade na superfície da proteína

K_b – Constante de ligação

K_{SV} – Constante de Stern-Volmer

MRE – Elipicidade molar do resíduo

NEM – *N*-etilmaleimida

RMN – Ressonância magnética nuclear

TM – Timerosal

Trp – Triptofano

Tir – Tirosina

TT – Tioflavina T

UV – Ultra violeta

UV-vis – Ultra violeta no visível

3D- Tridimensional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Química supramolecular.....	13
1.2	Interação proteína-ligante.....	13
1.3	Estudo da interação proteína-ligante <i>in vitro</i> através de fluorescência molecular.....	14
1.4	Timerosal.....	18
1.5	Albumina do soro bovino.....	19
1.6	Estudos entre TM e espécies mercuradas com proteínas.....	20
2	JUSTIFICATIVA	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	Geral.....	22
3.2	Específicos.....	22
4	EXPERIMENTAL	23
4.1	Reagentes e soluções.....	23
4.2	Procedimentos.....	23
4.2.1	Fluorescência molecular.....	23
4.2.2	Espectrometria de absorção molecular (UV-vis).....	24
4.2.3	Dicroísmo circular (DC).....	24
4.2.4	Ensaio de Ellman.....	24
4.2.5	Ressonância magnética nuclear (RMN).....	25
4.2.6	Avaliação da formação de amiloides.....	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	Parâmetros de ligação e termodinâmicos.....	26
5.2	Avaliação da força iônica.....	29
5.3	Avaliação da interação por UV-vis.....	30
5.4	Avaliação de alterações conformacionais na estrutura da BSA.....	31
5.4.1	Fluorescência tridimensional.....	31
5.4.2	Dicroísmo circular.....	32
5.5	Avaliação de competidores no processo de interação BSA-TM.....	33
5.6	Avaliação da interação na presença de ANS.....	35
5.7	Fluorescência sincronizada.....	37
5.8	Sítio preferencial de ligação.....	38

5.9	Mecanismo de interação.....	40
5.9.1	Ensaio de Ellman.....	40
5.9.2	Titulação espectrofluorimétrica com os produtos de degradação do TM.....	43
5.9.3	Ressonância magnética nuclear (RMN).....	44
5.10	Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência (FRET).....	47
5.11	Avaliação da formação de amiloides.....	48
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Química supramolecular

A química supramolecular pode ser definida como a química dos arranjos moleculares e das ligações intermoleculares a partir da associação de várias espécies com funcionalidade específica. Esta se baseia nas ligações entre moléculas de natureza não covalente resultando em um conjunto de moléculas organizadas com propriedades específicas como reconhecimento, transporte e sinalização molecular (YE et al., 2014). Nessa área da química, os estudos são ampliados para além da molécula, com grau de complexidade superior, denominadas supermoléculas que são responsáveis por fatores como organização molecular, reconhecimento, interações hospedeiro-convidado, comunicação molecular, translocação, transporte, replicação e montagem estrutural (YE et al., 2014; MCLAUGHLIN; HAMBLIN; SLEIMAN, 2011). Além disto, esta área da química é de fundamental importância para a compreensão e avaliação de macromoléculas presentes em sistemas biológicos como na modificações na função proteica em resposta a ação de uma molécula, nos sistemas enzima-substrato e na interação entre DNA com fármacos (PIETERS et al., 2016).

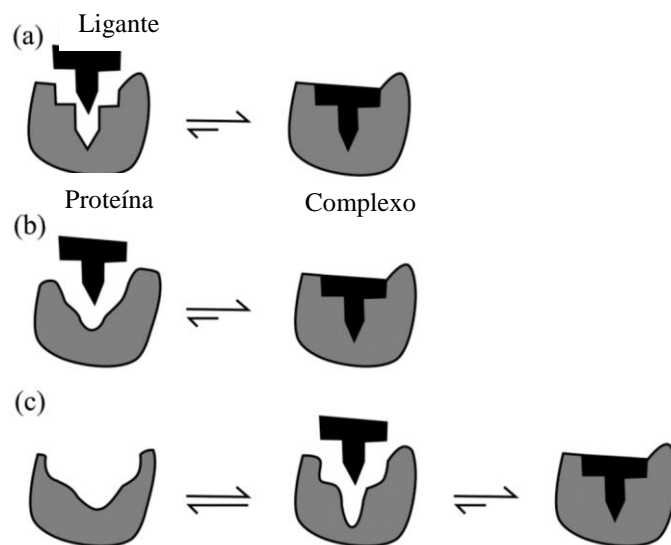
1.2 Interação proteína-ligante

As proteínas são macromoléculas essenciais para a manutenção de processos biológicos vitais e parte dessas funções são baseadas na capacidade de desempenharem interação química (FU et al, 2014; LODISH et al., 2005). Existe uma gama de possibilidades de interação com proteínas podendo ser proteína-proteína, proteína-ligante (proteína interagindo com uma molécula) ou proteína-íon (LODISH et al., 2005).

Estudos de interação envolvendo proteínas são utilizados para compreensão de processos biológicos como catálise enzimática e o transporte seletivo (HELD et al., 2011; ALLISON et al., 2014). A interação entre uma proteína e um ligante (pequena molécula) acontece numa cavidade da superfície da proteína denominada sítio de ligação (SALENTIN et al., 2014). Esse tipo de interação está representado na Figura 1 em três tipos de modelos. A primeira ilustração (Figura 1a) representa o modo de ligação conhecido como chave-fechadura, em que tanto a proteína quanto o ligante possuem estrutura rígida e com isso, só há ligação caso as estruturas fossem completamente compatíveis. O segundo modelo (Figura 1b) é o de ajuste induzido que propõe que a região de ligação na proteína é flexível, assim o ligante induz a proteína a mudar sua conformação para que aconteça a ligação. Entretanto, evidências experimentais mostram que estes dois modelos não são adequados para representar

a maioria das interações proteína-ligante existentes. O modelo que melhor representa tais interações é chamado de seleção conformacional (Figura 3c). Este se baseia no fato de que o estado nativo de uma proteína não existe como uma formação única e rígida, mas como um vasto conjunto de estados conformacionais que coexistem em equilíbrio e que o ligante liga-se seletivamente ao estado conformacional mais favorável formando um complexo supramolecular, deslocando o equilíbrio para este estado (DU et al, 2016).

Figura 1– Formação do complexo proteína-ligante.



Fonte: DU, 2015.

A interação resultante é composta por múltiplas ligações de interações fracas: interações eletrostáticas, ligação de hidrogênio, interações de Van der Waals, além de interações hidrofóbicas. Isto resulta numa ligação proteína-ligante com alta afinidade e seletividade (PACE; SCHOLTZ; GRIMSLEY, 2014; TINBERG et al., 2013).

1.3 Estudo da interação proteína-ligante *in vitro* através de fluorescência molecular

Na avaliação da interação proteína-ligante *in vitro*, são empregadas várias técnicas para esta finalidade, tais como: fluorescência molecular, UV-vis, dicroísmo circular (DC), ressonância magnética nuclear (RMN), diálise, infravermelho, espectrometria de massas, eletroforese (capilar e em gel), *docking molecular*, entre outras (DONG; MA; LIU, 2013). A Tabela 1 apresenta algumas informações da contribuição de cada técnica com relação aos estudos de interação.

Apesar do exposto, a técnica de espectroscopia de fluorescência molecular é a mais utilizada e têm sido bastante aplicada desde o final da década de 1960 para estudos de interação proteína-ligante (GONZALES-HORTA; HERNANDES; CHAVEZ-MONTES,

2013). Vários estudos de interação com base na fluorescência são desenvolvidos em áreas de interesse farmacêutico, biológico, ambiental e industrial (SOTOMAYOR et al., 2008).

Estudos por fluorescência molecular são aplicados em sistemas envolvendo proteína-ligante visando a obtenção de informações acerca da afinidade e de como ocorre o processo de interação entre um determinado composto de importância biológica e a macromolécula. A informação obtida pode ser útil na síntese e planejamento de fármacos mais eficazes, assim como na investigação de interações em meio biológico entre enzima e substrato ou com espécies que possam apresentar efeitos deletérios ou tóxicos como mercúrio, chumbo e prata, que podem se ligar de forma irreversível a proteína afetando a sua estrutura e função (NATESAN et al., 2015; FAN, et al., 2013; CHUNMEI et al., 2014). Essa ampla aplicabilidade consiste no fato de muitas proteínas possuem fluoróforos naturais, os resíduos de tirosina e triptofano, que permitem os estudos de alterações que ocorrem na proteína (MUNISHKINA; FINK, 2007). Esta técnica apresenta grande faixa de concentração linear, alta sensibilidade e seletividade. Além disto, permite o monitoramento da proteína e também do ligante, considerando que o ligante apresente fluorescência numa região espectral diferente da emissão da proteína (MADRAKIAN et al., 2014).

As medidas por fluorescência nos sistemas envolvendo interação com proteína são feitas a partir da variação do sinal de fluorescência na presença e ausência do ligante avaliado. Desta forma, utiliza-se o sinal da fluorescência intrínseca da proteína, o sinal de fluorescência do ligante, caso este ligante possua, ou aplica-se uma sonda fluorescente que se ligue a proteína para monitorar este tipo de sistema sendo sua emissão diferente da proteína e do ligante quando estão separados.

A partir destes estudos, considerando a variação do sinal de fluorescência com adição de incrementos do ligante, é possível obter informações como: o mecanismo de *quenching* (dinâmico, estático ou ambos), constantes de ligação (K_b), número de sítios de ligação (estequiometria), parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG), forças intermoleculares envolvidas no processo de interação além do monitoramento da estrutura tridimensional da proteína (ZHAO et al., 2014; KANDAGAL et al., 2006).

Tabela 1- Parâmetros, vantagens e desvantagens sobre as principais técnicas para avaliação da interação proteína-ligante.

Continua

Técnica / Estratégia	Parâmetros	Vantagens	Desvantagem	Referências
Fluorescência molecular	Mecanismo de <i>quenching</i> Constante de ligação Número de sítios de ligação Parâmetros termodinâmicos Forças intermoleculares Distâncias intermoleculares Monitoramento em 3D Conformação proteica	Técnica simples com elevada sensibilidade e seletividade. É possível a utilização de sondas fluorimétricas para monitorar a interação. Além disto, esta técnica permite obter a análise em tempo real. Apresenta baixo custo de manutenção e utiliza pequenas quantidades de amostra.	É necessária a presença de espécies fluorescentes. Na utilização de sondas é possível que ocorra mudanças estruturais na proteína.	YAN; MARRIOT, 2003; SRIDHARAN et al., 2014; GONZALES-HORTA; HERNANDES; CHAVEZ-MONTES, 2013; SOTOMAYOR et al., 2008.
UV-vis	Formação de complexo Parâmetros termodinâmicos Mecanismo de <i>quenching</i> Conformação proteica	Simplicidade e baixo custo.	Baixa sensibilidade e seletividade.	SOTOMAYOR et al., 2008; WANG; NI, 2014.
Dicroísmo circular	Avaliação de mudanças na estrutura secundária (conteúdo de α -hélice)	Alta sensibilidade.	Elevado tempo de aquisição dos espectros.	SILIGARDI et al., 2014; CHAVES et al., 2016.
Ressonância magnética nuclear	Região da interação Constante de ligação Parâmetros termodinâmicos	Alta sensibilidade. Determina o epítipo do ligante no processo de interação além de também monitorar a proteína mesmo sem conhecimento prévio da função da proteína.	Altas concentrações das espécies além da utilização de solventes deuterados. Técnica de alto custo de manutenção.	FIGUEIREDO; MARSAIOLI, 2007; PELLECCHIA, 2005.
Equilíbrio de diálise	Isoterma da interação Parâmetros termodinâmicos Constantes de ligação	Obtenção do equilíbrio de ligação. Método simples e isento de problemas elétricos e mecânicos.	Tempo de equilíbrio longo e adsorção inespecífica.	VELDHUIS et al. 2004; SMITH, 2006; YANG; LI; SNYDER, 2012.
Infravermelho	Conformação da Proteína Estabilidade proteica Parâmetros de ligação	Análise em suspensão, nas fases sólida e líquida e em diferentes solventes. Técnica de fácil execução e rápida. Possui seletividade espectral além de ser de baixo custo.	Altas concentrações da amostra. Múltiplas varreduras da mesma amostra.	HARIS, 2010; BARTH, 2007.

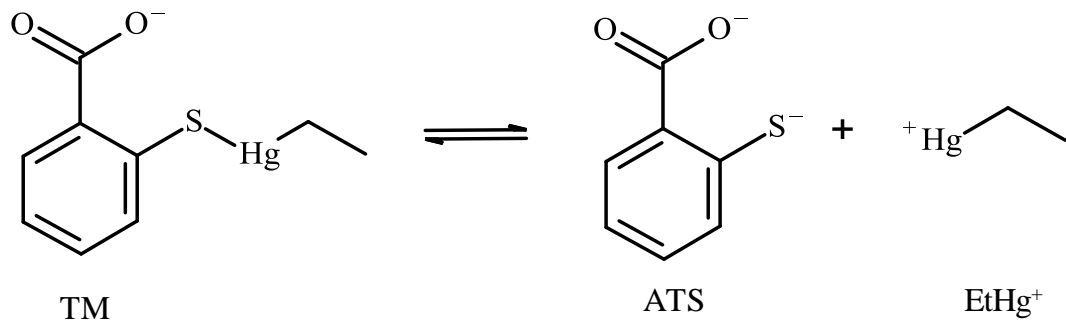
Técnica / Estratégia	Parâmetros	Vantagem	Desvantagem	Referências
Espectrometria de massas	Estequiometria do complexo Constante de ligação.	Detecta múltiplas moléculas simultaneamente. Alta sensibilidade, precisão e especificidade.	Não se aplica a espécies voláteis e apresenta difícil controle da eficiência na taxa de ionização em amostras complexas.	JAUMOT; GARGALLO, 2012; YANG; LI; SNYDER, 2012.
Eletroforese	Mudanças na carga molecular da proteína	Alta resolução. Técnica simples, rápido e de baixo custo.	Não alcança o equilíbrio químico e a mobilidade eletroforética depende de vários fatores além da interação.	MORAES et al., 2013; HELLMAN; FRIED, 2007.
<i>Docking</i> molecular	Energia de ligação; Alteração na conformação do ligante; Estrutura espacial do complexo; Região de interação.	Rápido e de baixo custo. Faz previsões de como acontece a interação.	Considera estrutura rígida e o vácuo como meio. Não considera efeito do solvente e grau de protonação das moléculas.	REHMAN et al., 2015. DU et al., 2016.
Métodos eletroquímicos	Constante de ligação Parâmetros cinéticos Forças intermoleculares Avaliação de processos redox Reversibilidade ou não do processo	Análise simples e rápida. Alta sensibilidade e baixo limite de detecção.	Detecção indireta.	SUN et al., 2006; DORRAJI; AZAR; RASOULIFARD, 2014. GRIESHABER et al., 2008.
Microscopia de força atômica	Mudanças na conformação da proteína Forças intermoleculares.	Alta resolução.	Processo lento com risco de contaminação. Área restrita de leitura.	WANG; YANG; ERIE, 2007. GARCIA et al., 2010; FERREIRA; YAMANAKA, 2006.
Estudos calorimétricos	Parâmetros termodinâmicos Constante de ligação Número de sítios de ligação	Alta afinidade de ligação.	Técnica de baixa sensibilidade com utilização de elevadas quantidades de amostras.	REHMAN et al., 2015; YANG, XIYAN, SNYDER, 2012.
Espectroscopia Raman	Detecção de grupos funcionais em região específicas da proteína Mudanças conformacionais Parâmetros termodinâmicos	Técnica rápida de alta seletividade espectral. Não necessita tratamento prévio da amostra.	Baixa sensibilidade e alto tempo de análise.	KENGNE-MOMO et al., 2012; JANGIR et al., 2012; BARTH, 2007.
Difração de raios-X	Estrutura tridimensional do complexo	Comportamento das moléculas em solução não pode ser examinado. Limitada a obtenção de cristais em condições de difratar a luz.	Difícil manuseio e identificação do ligante.	GARCIA et al., 2010; WU et al., 2005.
Ressonância de Plasmon de superfície	Alterações conformacionais	Técnica sensível com cinética em tempo real.	É preciso escolher entre afinidade de ligação e sensibilidade. Dificuldade na imobilização das moléculas.	XIYAN, SNYDER, 2012; WANG; YANG; ERIE, 2007; HELMERHORST et al., 2012.

Fonte: adaptado de Silva, 2016.

1.4 Timerosal

Timerosal (TM, Figura 2) é um composto organomercurial (contém 49,55% em massa de mercúrio) utilizado como conservante em produtos farmacêuticos, cosméticos, *spray* antisséptico, produtos de limpeza e vacinas por apresentar propriedades bactericidas e antifúngicas (GEIER et al., 2015). As vacinas contra hepatite B, vírus H1N1 e a tríplice viral, são alguns exemplos do uso deste conservante em que a concentração de TM declarada é da ordem de 25 µg Hg por 0,5 mL (GEIER et al., 2016). Quanto a este aspecto, existem vários estudos que apontam uma relação da utilização de TM com efeitos deletérios a saúde, principalmente em crianças e gestantes (DÓREA, 2017; GEIER et al, 2017).

Figura 2– Estrutura química do Timerosal (TM) e seus respectivos produtos de degradação: ácido tiosalicílico (ATS) e etil mercúrio (EtHg⁺).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Goldman (2013) demonstrou que a aplicação de uma única vacina contendo TM em grávidas nas primeiras oito semanas de gestação pode gerar uma exposição do feto ao mercúrio em cerca de 125.000 vezes o permitido pela agência de proteção ambiental (EPA), podendo resultar desde má formação até mesmo morte do feto. Segundo Geier e colaboradores (2013), crianças que recebem doses de TM oriundas de vacinas nos primeiros meses de vida são mais propensas a desenvolverem transtornos neurológicos como o autismo e a hiperatividade. Além disto, Lee e colaboradores (2015) mostraram que TM induz estresse oxidativo em células epiteliais (Hela S) levando-as a morte celular, indicando a citotoxicidade deste composto. Efeitos deletérios do TM estão em constante investigação, pois este composto é a terceira maior via de contaminação por mercúrio, sendo suplantado pela exposição através de amálgamas dentárias que utilizam mercúrio elementar (Hg⁰) e pela ingestão de alimentos contaminados, como peixe e arroz, com metilmercúrio (YEPSE et al., 2015). Todos os compostos orgânicos de mercúrio são potencialmente tóxicos e bioacumulados, sendo seus efeitos mais pronunciados na região do cérebro. De forma geral, compostos orgânicos de mercúrio são mais tóxicos em relação aos inorgânicos, como

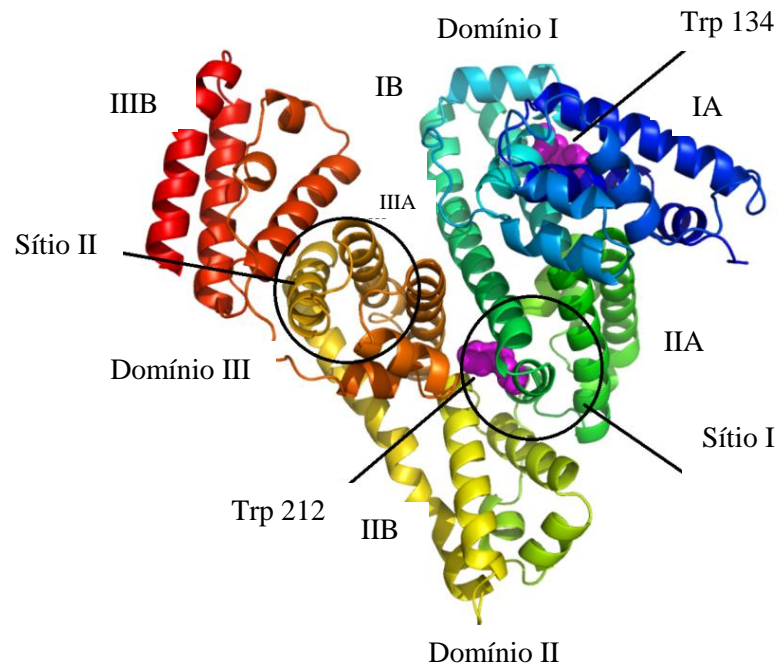
exemplo, o IC_{50} para células neurais é de 1,15 a 10,31 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o metilmercúrio (CH_3Hg^+) e 6,44 a 160,97 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o Hg(II) (TONG; WANG; LU, 2016). Neste contexto, os danos associados ao TM se devem, principalmente, pela clivagem da ligação S-Hg com possível liberação de etil-mercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$), uma neurotoxina, que apresenta toxicidade comparada ao CH_3Hg^+ , espécie mais tóxica de mercúrio (DÓREA, 2011). Apesar dos indícios da toxicidade do TM à saúde humana e agressões ao meio ambiente como o descarte inadequado de produtos vencidos contendo estes organomercuriais (YEPSE et al., 2015), Estados Unidos e países em desenvolvimento ainda utilizam TM desprezando seus potenciais efeitos nocivos (YEPSE et al., 2015; YOUNG; GEIER, D.A.; GEIER, M.R., 2008).

1.5 Albumina do soro bovino

Timerosal ao entrar em contato com o meio biológico pode interagir com biomoléculas podendo ser distribuído por diversos tecidos. Uma dessas macromoléculas é a albumina do soro que é a proteína mais abundante do plasma e do organismo humano. Nos mamíferos a albumina é sintetizada no fígado sendo o transporte de ácidos graxos, íons metálicos, fármacos, vitaminas, hormônios, entre outras espécies sua principal função (MAJOREKA et al., 2012; GELAMO; TABAKE; 2000).

A BSA (albumina do soro bovino, figura 2), nos estudos de interação, é empregada como modelo em relação à HSA (albumina do soro humano). Isto se deve a semelhança de 76% na sequência de aminoácidos (MAJOREKA et al., 2012). Esta macromolécula possui propriedades fluorescentes intrínsecas devido à presença de aminoácidos aromáticos como tirosina e triptofano (MAJOREKA et al., 2012). A BSA possui 583 resíduos de aminoácidos e três domínios estruturalmente similares classificados em I, II e III e subdivididos em subdomínio A e B (CARTER; HO, 1994). Na sua estrutura existem duas regiões onde a probabilidade de interação é maior, denominados sítios I e II localizados nos subdomínios IIA e IIIA, respectivamente (SUDLOW; BIRKETT; WADE, 1975). Uma das principais diferenças entre estas albuminas é que a albumina humana possui um resíduo de triptofano (214) no sítio I, enquanto que a albumina bovina possui um resíduo deste aminoácido no sítio I (212) e outro próximo a subdomínio IB (134), sendo esta a região em que se encontra um único resíduo de cisteína livre (34) em ambas as proteínas (SULKOWSKA, 2002).

Figura 3– Estrutura da albumina do soro bovino (BSA).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

1.6 Estudos entre TM e compostos mercurados com proteínas

Estudos demonstram a formação de adutos entre mercúrio inorgânico Hg(II) , MeHg^+ , EtHg^+ , fenilmercúrio, entre outras espécies, com HSA e BSA a partir da ligação com grupos tióis presentes na biomolécula. Li e colaboradores (2007), através de CE-ET AAS e espectrometria Raman mostrou que existe forte afinidade entre as diferentes espécies de mercúrio com HSA, e por dicroísmo circular (DC), verificou que Hg(II) foi a espécie que mais alterou a estrutura secundária da proteína (LI et al., 2007). Trümpler e colaboradores (2009), utilizando cromatografia líquida acoplada a ICP-MS simulando condições similares a uma injeção intravenosa comprovaram que a presença de proteínas (HSA e beta-lactoglobulina A) aceleram o processo de hidrólise do TM, resultando na formação de EtHg^+ , o qual reage com o resíduo de cisteína livre. Ademais, Guo e colaboradores (2008) demonstraram a especificidade dos organomercuriais para regiões contendo grupos sulfidrila em peptídeos e proteínas. Através de técnicas espectroscópicas como fluorescência molecular, DC e UV-vis, Chunmei (2014) e Shen e colaboradores (2013), avaliaram a interação entre Hg(II) , espécie utilizada na medicina chinesa para produção de fármacos, com BSA, e constataram que TM causa mudanças na estrutura secundária da proteína. As alterações na estrutura da proteína induzidas pelo mercúrio e derivados, podem representar um mecanismo de defesa, quando ao se ligar a espécies tóxicas de mercúrio, a albumina impede que fiquem

na forma livre (não ligada) no meio biológico. Contudo, pode também estar associada a um transporte mais efetivo destas espécies no organismo, afetando o cérebro onde os danos de organomercuriais são potencializados pela inibição de enzimas ou bloqueando grupos tióis biologicamente ativos (TRÜMPLER; MEERMANN, 2014).

Apesar do exposto, ainda são poucos os estudos encontrados na literatura com o propósito de esclarecer a interação entre espécies derivadas de mercúrio com albuminas para avaliação da perda ou não de funcionalidade da proteína. Os trabalhos existentes, não mencionam a região preferencial (subdomínio) em que ocorre a interação, nem esclarecem o mecanismo de interação e as condições fisiológicas nos experimentos (LI et al., 2007; CHUNMEI et al., 2014; TRÜMPLER; MEERMANN, 2014).

Desta forma, neste trabalho, foi avaliada a interação entre BSA e TM simulando condições fisiológicas através de técnicas espectroscópicas como UV-vis, fluorescência molecular, DC e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H). Assim, verificou-se a magnitude da interação, região preferencial de ligação, parâmetros termodinâmicos e as forças que atuam no processo, além de possíveis mudanças estruturais na biomolécula.

2 JUSTIFICATIVA

A ampla utilização de TM como conservante e os possíveis riscos que este organomercurial traz a saúde humana e ao meio ambiente, como a liberação de uma neurotoxina (EtHg^+), fez com que a União Europeia proibisse sua utilização desde 2001. Entretanto, atualmente ainda é comercializado em países em desenvolvimento como o Brasil e também os Estados Unidos. Desta forma, faz-se necessário investigar a interação deste composto com a albumina do soro bovino, que é um modelo em relação a albumina do soro humano, proteína mais abundante do plasma humano, pois uma de suas principais funções é o transporte de diversas moléculas no organismo. Com isso, este estudo visa contribuir para a compreensão dos riscos que TM pode causar ao interagir com a proteína.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o mecanismo de interação entre BSA e TM por métodos espectroscópicos e determinar os principais parâmetros associados a este processo assim como avaliar a fibrilação da BSA frente ao TM.

3.2 Objetivos específicos

- a)* Empregar técnicas de fluorescência molecular para avaliar alterações estruturais da proteína e obter parâmetros como: constantes de ligação, dados termodinâmicos, estequiometria proteína-ligante, mecanismo de *quenching* e distâncias intermoleculares;
- b)* Explorar a técnica UV-vis visando avaliar o processo de interação intermolecular (proteína-ligante) e obter informações do mecanismo de interação;
- c)* Empregar a técnica de dicroísmo circular para inferir sobre possíveis mudanças na estrutura secundária da proteína após interação;
- d)* Avaliar os competidores da interação BSA-TM;
- e)* Propor um mecanismo de interação;
- f)* Aplicar a técnicas de RMN de ^1H para avaliar o deslocamento químico para a molécula de TM frente a albumina para obter informações do mecanismo de interação;
- g)* Avaliar a fibrilação da BSA após interação com TM.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e soluções

Albumina do soro bovino (BSA), timerosal (TM), Tris-HCl, NaCl, varfarina, ibuprofeno, diazepam, bilirrubina, ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato (ANS), ácido 5,5-bisditionitrobenzoico (DTNB), cloreto de etil-mercúrio (EtHgCl), *N*-etilmaleimida (NEM), ácido tiosalicílico (TSA), ácido 2,2 ditiobenzóico (ADTS), cisteína (Cis) e tioflavina T (TT) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Outros reagentes empregados nos ensaios foram de grau analítico com pureza acima de 98%. As soluções estoque de TM (1 mM) e de BSA (100 μ M) foram preparados em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4 \pm 0,1) com 100 mM de NaCl para ajuste da força iônica. Em todos os experimentos foi utilizada água ultrapura (18,2 M Ω cm⁻¹) para o preparo das soluções (Millipore, EUA).

4.2 Procedimentos

4.2.1 Fluorescência molecular

Os espectros de fluorescência no estado estacionário foram obtidos utilizando espectrofluorímetro modelo RF-5301PC (Shimadzu, Japão) com lâmpada de xenônio (150 W) como fonte de radiação. As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm. O slit utilizado em todos experimentos foi de 5 nm para excitação e emissão, respectivamente. Nas titulações espectrofluorimétricas a concentração de BSA foi fixada em 2 μ M, sendo adicionado incrementos de TM (0–80 μ M) com excitação em 280 nm e emissão em 342 nm. Na avaliação dos parâmetros termodinâmicos as temperaturas utilizadas foram 22, 30 e 38°C. A influência da força iônica no meio foi avaliada a partir da variação da concentração de NaCl (0–150 mM). Para a avaliação da fluorescência 3D as soluções da BSA (2 μ M) na ausência e presença de TM (50 μ M) foram excitadas na faixa de 220–340 nm sendo os espectros de emissão registrados entre 270 e 450 nm.

Para monitoramento dos resíduos de triptofano e tirosina, assim como, avaliação da polaridade do microambiente destes aminoácidos foi empregada fluorescência sincronizada. Esta técnica se baseia na variação simultânea dos dois monocromadores (excitação e emissão) mantendo-se uma diferença de comprimento de onda fixa ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$). Os resíduos de triptofano foram monitorados utilizando $\Delta\lambda = 60$ nm, enquanto tirosina igual a 15 nm (CHUNMEI et al., 2014).

Para avaliação do índice de hidrofobicidade da BSA na presença e ausência do TM empregou-se ANS (ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato) como sonda analítica mantendo-se

a concentração de BSA (2 μM) e TM (40 μM) fixas. A concentração de ANS foi variada (0–30 μM) empregando-se $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 471 \text{ nm}$. No ensaio de competição o sistema BSA (2 μM) e ANS (4 μM) foi titulado com TM (0–80 μM) utilizando $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 342 \text{ nm}$ (proteína) e 470 nm (BSA-ANS).

Para avaliação dos sítios de ligação preferenciais na BSA foram utilizados varfarina (sítio I), ibuprofeno e diazepam (sítio II) (HEMALATHA; MADHUMITHA, 2016; NI; ZHUB; KOKOTC, 2011). O subdomínio IB foi monitorado empregando bilirrubina (ZHAO et al., 2006). O ensaio de competição para avaliação dos sítios de ligação foram realizados empregando 2 e 4 μM de cada ligante, e mantendo-se constante a concentração da BSA (2 μM).

O efeito de competidores presentes no plasma nas condições fisiológicas foi avaliado frente ao processo de interação entre BSA e TM, para tanto, foi mantida a razão da concentração entre proteína e competidor nas condições de normalidade biológica. De forma geral, nas avaliações descritas, utilizou-se como parâmetro de avaliação a variação da constante de ligação (K_b) ou constante de Stern-Volmer (K_{SV}) entre BSA e TM em função da condição experimental avaliada.

4.2.2 Espectrometria de absorção molecular (Uv-vis)

As medições por UV-vis foram realizadas de 250 a 310 nm utilizando espectrofotômetro AJX-6100PC (Micronal, Brasil) de duplo feixe equipado com par de cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico. Os espectros foram obtidos em módulo de absorvância das soluções de BSA (3 μM), TM (12 μM) e mistura (BSA+TM).

4.2.3 Dicroísmo circular (DC)

As medições de DC foram registradas num espectropolarímetro Jasco (modelo J-815) e sistema de resfriamento tipo Peltier. Foi utilizada cubeta de quartzo de 0,1 mm de caminho óptico, sendo cada espectro a média de quatro scans a 50 nm min^{-1} . As medições foram realizadas na região do UV no intervalo 200–260 nm com largura de banda de 1 nm. A concentração da proteína foi de 2 μM sendo titulada com incrementos de TM (0, 2, 4 e 8 μM).

4.2.4 Ensaio de Ellman

Para quantificação espectrofotométrica do grupo tiol livre (Cis34) presente na BSA (60 μM) foi aplicado o ensaio de Ellman, baseado na reação entre DTNB (1 mM) e o grupo tiol levando a formação do cromóforo (TNB) em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) com $\lambda_{\text{max}} =$

412 nm (ELLMAN et al., 1961). A cisteína foi utilizada como referência para comparação dos sinais e construção da curva analítica. NEM (60 μM) foi utilizado como composto controle para bloqueio do grupo tiol da BSA. A influência de EtHgCl, ATS e TM (todos a 60 μM) quanto ao conteúdo total do grupo tiol livre na BSA foi avaliada.

4.2.5 Ressonância magnética Nuclear (RMN)

No estudo da interação entre BSA e TM por RMN ^1H foram obtidos espectros do TM (1 mM) na ausência e presença de BSA (10 a 40 μM). Além disto, foram realizados experimentos com ácido tiosalicílico (1 mM), cloreto de etil-mercúrio (1 mM), cisteína (1 mM) e as misturas TSA + EtHgCl e TM + Cis. Os espectros foram obtidos a partir de espectrômetro Bruker 400 MHz ($B_0 = 9,4 \text{ T}$), empregando sonda de detecção indireta de 5 nm. As soluções foram preparadas em tampão fosfato (10 mM, pH 7,4) utilizando $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (1:10) contendo 40 μM de trimetilsilipropionato de sódio (TMSP). Nos experimentos contendo a mistura TM e BSA a resolução quanto a multiplicidade dos sinais e variação do deslocamento químico (δ) foram utilizados como parâmetro de avaliação.

4.2.6 Avaliação da formação de amiloides

Para o ensaio de fibrilação da BSA (2,5 mg L^{-1}) na ausência e na presença de TM (100 μM) e EtHgCl (100 μM), foi empregado tioflavina T (TT, 20 μM) como sonda fluorescente para detecção da formação de amiloides. As soluções foram mantidas a 70°C durante 7 h, sendo retiradas alíquotas de 10 μL do sistema, adicionado a 990 μL da solução de TT, utilizando $\lambda_{\text{ex}} = 442 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 488 \text{ nm}$, conforme adaptação do procedimento de GUAN et al. (2014).

5 Resultados e discussão

5.1. Parâmetros de ligação e termodinâmicos

Para avaliar a interação da BSA em condições fisiológicas simuladas a proteína foi titulada com TM, sendo a variação do sinal de fluorescência da macromolécula monitorado em 342 nm. Neste sentido, a Figura 4a mostra que com de incrementos crescentes de TM houve supressão de fluorescência da BSA, sem deslocamento do máximo de emissão da proteína e que, o TM não apresenta fluorescência intrínseca nesta região. Este resultado demonstra que há interação entre a biomolécula e TM e que a diminuição do sinal se dá pela formação de um complexo não fluorescente entre BSA-TM.

A fim de se obter uma análise quantitativa, foram realizados tratamentos matemáticos para avaliar a interação do complexo supramolecular formado entre BSA-TM. A constante de Stern-Volmer (K_{SV}) indica a eficiência do *quencher* (ligante) em suprimir a fluorescência do fluoróforo (BSA) e pode ser obtida através da equação 1 (TENGA et al., 2011):

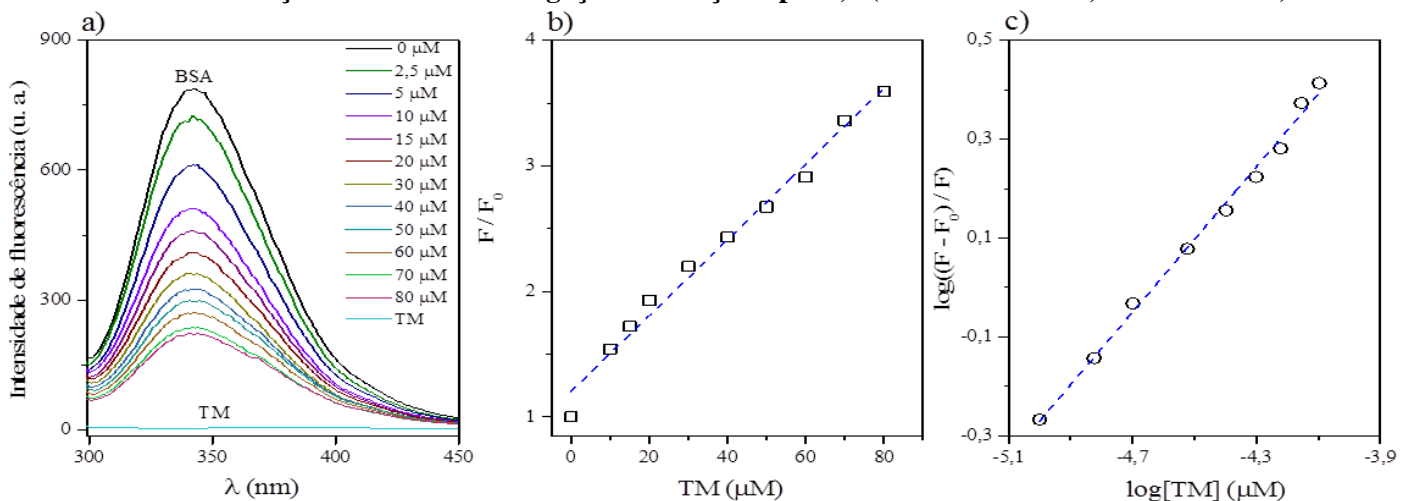
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} Q \quad \text{Equação (1)}$$

Sendo F_0 e F os sinais de fluorescência na ausência e presença do ligante, respectivamente. $[Q]$ é a concentração do *quencher* e K_{SV} é a constante de Stern-Volmer. A constante é obtida através do coeficiente angular da relação F_0/F versus $[Q]$, conforme indicado na Figura 4b.

O cálculo da constante de ligação (K_b) que revela a força da interação entre a macromolécula e o ligante, assim como, o número de sítios (n) de ligação entre BSA e TM, foi feito conforme a equação 2 e está apresentado na figura 4c (NI; WANG; KOKOT, 2010).

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = K_b + n \log Q \quad \text{Equação (2)}$$

Figura 4 - a) Espectro de fluorescência da BSA (2 μ M) com adição de incrementos de TM (0-80 μ M); b) Curva linear para cálculo de Stern-Volmer no processo de *quenching*; c) Curva para determinação da constante de ligação. Condições: pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM)



O valor de K_{sv} foi calculado para três temperaturas (22, 30 e 38°C) com variação de 2,96 a 3,09 L mol⁻¹ (Tabela 2) o que demonstra, de forma quantitativa, que há interação entre BSA e TM (WANG et al., 2011).

O mecanismo de *quenching* dominante no processo de interação macromolécula-ligante pôde ser estabelecido a partir do estudo da variação da constante de Stern-Volmer em função da temperatura. Podem ocorrer dois tipos de *quenching* preferenciais, estático e dinâmico. O *quenching* estático se caracteriza pela formação do complexo no estado fundamental com redução de K_{sv} com o aumento da temperatura devido a desestabilização do complexo no estado fundamental. No dinâmico ocorrem colisões entre o fluoróforo e o ligante com elevação de K_{sv} á medida que aumenta a temperatura proporcionando um maior número de choques no estado excitado sendo este governado pelo coeficiente de difusão do composto no meio (FAN et al., 2013).

A Tabela 2 mostra que a constante de Stern-Volmer diminui com o aumento da temperatura o que indica que o mecanismo ocorreu preferencialmente por *quenching* estático.

Tabela 2 – Parâmetros termodinâmicos e de ligação para a interação entre BSA e TM em diferentes temperaturas.

T (°C)	Parâmetros de ligação			Parâmetros termodinâmicos		
	K_{sv} (10 ⁴ L mol ⁻¹)	K_b (10 ³ L mol ⁻¹)	n	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
22 (295 K)	3,09 ± 0,03	4,13 ± 0,02	1,03			- 4,28
30 (303 K)	3,01 ± 0,04	3,24 ± 0,01	1,01	-16,10	+14,46	- 4,40
38 (311 K)	2,96 ± 0,02	2,95 ± 0,01	1,00			- 4,51

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

O valor da constante de ligação para a interação BSA-TM variou de 2,95 a 4,13x10³ L mol⁻¹ em função da variação de temperatura do sistema, e o número de sítios de ligação é próximo a 1 (Tabela 2) indicando que há um único sitio de ligação do TM com a BSA. Os valores de K_b obtidos para o TM foram maiores quando comparados com os estudos entre BSA e mercúrio inorgânico realizados por Chunmei e colaboradores (2014) com concentração de mercúrio [Hg(II)] = 0-5,2x10⁻⁴ mol L⁻¹ e constante de ligação 0,9x10³ L mol⁻¹. e Shen e colaboradores (2013) empregando [Hg(II)] = 0-20x10⁻⁴ mol L⁻¹ e obtendo constante de ligação 0,27x10³ L mol⁻¹, indicando maior afinidade da proteína pelo composto orgânico de mercúrio. Adicionalmente, Liu e colaboradores (2012) reportaram $K_b = 73,63$ L mol⁻¹ para interação entre íons Pb(II) com BSA, enquanto Zhao e colaboradores (2011) avaliaram interação entre Ag(I) e BSA obtendo $K_b = 4,88x10^3$ L mol⁻¹ (quando [Ag(I)] < 0,1 mM),

contudo ambos os trabalhos empregaram pH = 5,5, em detrimento da baixa solubilidade destes cátions em meio aquoso empregando pH 7,4, estando fora das condições fisiológicas.

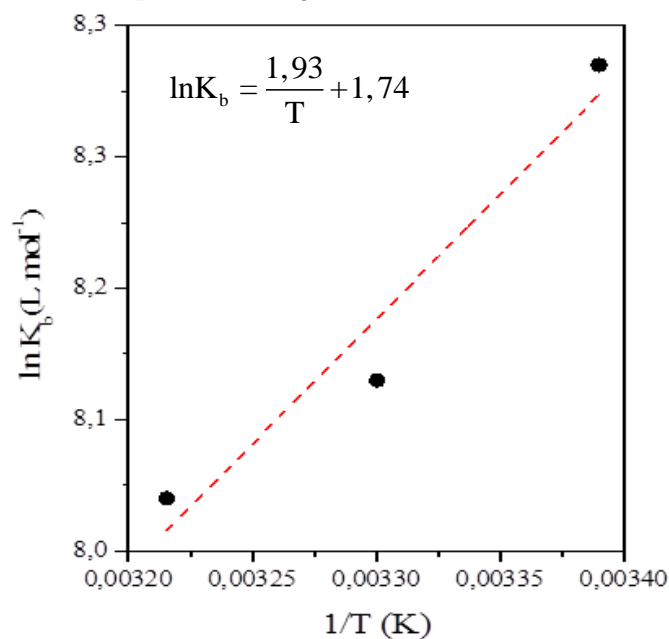
Os parâmetros termodinâmicos (Tabela 2) foram calculados com base na variação do valor K_b em função da temperatura, e com isso, pôde-se inferir as forças preferencias de interação entre BSA e TM. Com base na equação de vant' Hoff foram determinados os valores de ΔH e ΔS (TIAN et al., 2004):

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação (3)}$$

T é a temperatura em Kelvin (K) e R (8,314462 J mol⁻¹ K⁻¹), a constante universal dos gases. Estes parâmetros foram calculados a partir dos valores do coeficiente angular e linear do sistema $\ln K_b$ versus 1/T. O gráfico referente a linearização da equação de vant' Hoff é apresentado na Figura 5 O valor de ΔG foi obtido empregando a equação a seguir:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (4)}$$

Figura 5 - Curva de Van't Hoff para a interação BSA-TM.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

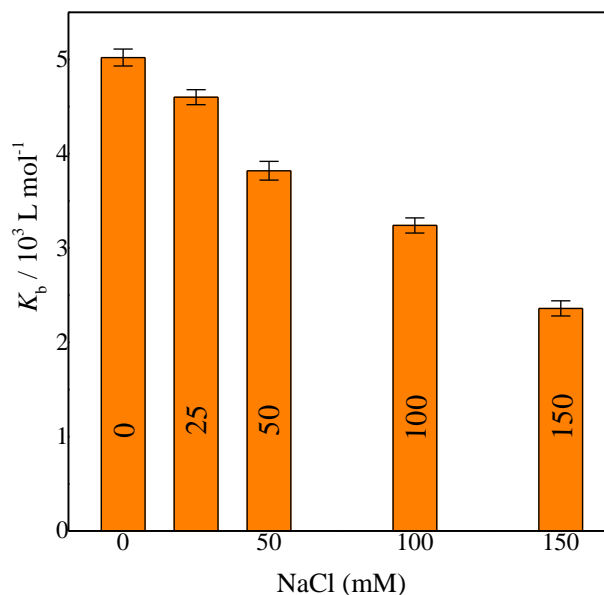
Segundo Ross e Subramanian (1981), $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ indica que forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio atuam predominantemente; $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ são resultados de interações hidrofóbicas; $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ indica que forças eletrostáticas governam a interação. Os valores calculados para estes parâmetros são apresentados na Tabela 1. Como $\Delta H = -16,10 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta S = +14,46 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, ou seja, $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ a interação entre BSA-TM é governada por forças eletrostáticas. Este resultado está de acordo com a carga negativa presente no oxigênio carboxílico da molécula de TM (Figura 1) em condições

fisiológicas (pH 7,4) pois o pK_a do grupo ácido carboxila é de 3,05, (THIMEROSAL, NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2001) assim, a molécula estará totalmente dissociada, e possivelmente ocorrerá atração eletrostática através dos resíduos de aminoácidos positivos presentes na BSA.

5.2 Avaliação da força iônica

O ensaio para avaliação da força iônica é útil para confirmar as interações eletrostáticas que atuam no sistema macromolécula-ligante devido a um possível desfavorecimento da interação entre as cargas com o aumento da força iônica do meio (LIANG; CHENG; HAN, 2008). Para averiguar este processo entre BSA e TM avaliou-se a variação de K_b em função da concentração de NaCl (0-150 mM) no meio. A Figura 6 mostra que com o aumento da força iônica houve uma diminuição linear da constante de ligação, com variação máxima de 53% em relação a condição na ausência de NaCl. Este resultado confirma a atração entre a carga negativa presente no TM e resíduos positivos de aminoácidos na cadeia da BSA. Resultado similar foi obtido por Li e colaboradores (2016) na avaliação da interação de três corantes alimentícios que apresentam carga (verde rápido FCF, corante azul V e ácido azul 1) com BSA.

Figura 6 - Efeito de NaCl (0-150 mM) na interação do complexo BSA-TM. Condições: pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM) a 30°C.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

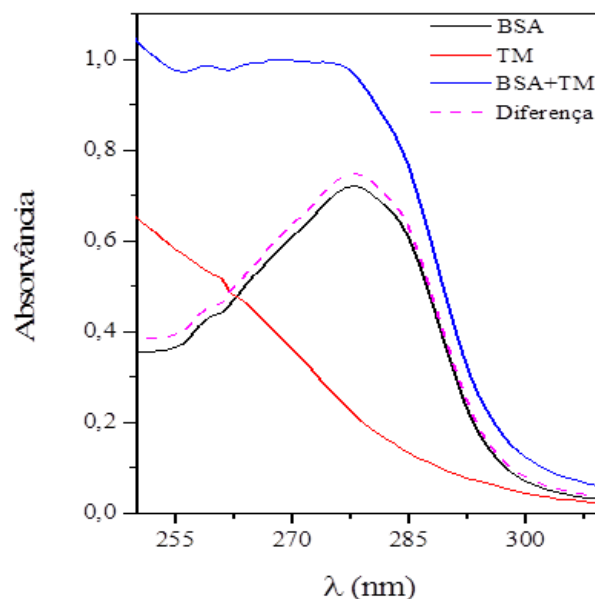
5.3 Avaliação da interação por UV-vis

A espectroscopia por UV-vis foi empregada para confirmar a formação do complexo BSA-ligante através do monitoramento de mudanças estruturais da proteína, assim como, confirmar o mecanismo de *quenching* associado ao processo de supressão de fluorescência (METI et al., 2015).

A BSA apresentou máximo de absorção em 278 nm (Figura 7) sendo os resíduos aromáticos de triptofano, tirosina e fenilalanina os principais responsáveis por esta absorção e pelas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ nesta região (LIU et al., 2016). Ao se adicionar TM a solução de BSA (BSA+TM), ocorreu efeito hiperacrômico seguido de um deslocamento hipsocrômico ($\Delta\lambda = 5$ nm) indicando interação entre BSA e TM. O espectro resultante da subtração dos espectros do sistema BSA+TM pelo ligante (TM) resultou em um espectro não sobreponível ao espectro da BSA (Figura 7), indicando que não houve efeito aditivo da lei de Beer, logo confirmando a formação do complexo supramolecular BSA-TM (SURYAWANSHI et al., 2016).

A confirmação da formação do complexo BSA-TM por UV-vis está associada a alterações no estado fundamental das espécies envolvidas no processo de interação, confirmando, o mecanismo por *quenching* estático relatado previamente pela avaliação por fluorescência molecular. O processo de *quenching* dinâmico seria provável caso não houvesse mudanças no espectro de absorção do complexo, pois este mecanismo proporciona mudanças apenas no estado excitado, enquanto o *quenching* estático está associado a formação de complexo no estado fundamental (TIAN et al., 2010).

Figura 7 - Espectros de absorção de BSA (3 μ M), TM (12 μ M), da mistura BSA+TM e a diferença dos espectros (BSA+TM) – TM na faixa de 250-310 nm. Condições: pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM) a 30°C.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

5.4 Avaliação de alterações conformacionais na estrutura da BSA

5.4.1 Fluorescência tridimensional

Alterações conformacionais na estrutura da proteína ao interagir com o TM podem ser identificadas por fluorescência tridimensional através de mudanças características das bandas de emissão relacionados à cadeia polipeptídica e dos resíduos de triptofano e tirosina (CHENG; LIU; JIANG, 2013). A Figura 8a apresenta o espectro de fluorescência em 3D para a BSA, onde se destacam três picos de emissão. O primeiro é referente ao espalhamento Rayleigh em que o comprimento de excitação é igual ao de emissão ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$), associado ao espalhamento inelástico de radiação. Os resíduos de triptofano e tirosina são responsáveis pela banda de emissão do pico 2 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 285/340$ nm). Já o pico 3 é referente a cadeia polipeptídica da proteína ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 238/335$ nm) que apresenta transição $\pi \rightarrow \pi^*$ devido a ligação RC=O-NHR (carbonila da ligação peptídica) característico da estrutura secundária da proteína (CHENG; LIU; JIANG, 2013; ARIGA et al., 2015). De acordo com a Figura 8b os picos 2 e 3 no espectro de emissão 3D do sistema BSA e TM, reduziram em 49,6 e 40,8% a intensidade de emissão, respectivamente, devido ao processo de interação, além disto o deslocamento Stokes dos picos 2 e 3 foi alterado quando TM foi adicionado (Tabela 3) indicando que pode ter ocorrido mudanças na polaridade da proteína assim como mudanças conformacionais (ZHANG; ZOU; LIU, 2012). Estes resultados indicam que houve mudanças na estrutura secundária e terciária da BSA causadas pela ligação do TM a BSA o que pode levar a danos ou mudanças funcionais na proteína. Resultados similares foram descritos por Wang e colaboradores (2016) na avaliação da interação entre picoplátin, fármaco utilizado no combate a diversos tipos de câncer, com HSA.

Figura 8 - Espectro de fluorescência tridimensional para BSA 2 μ M (a) com adição de TM (50 μ M) (b). Condições: pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM) a 30°C.

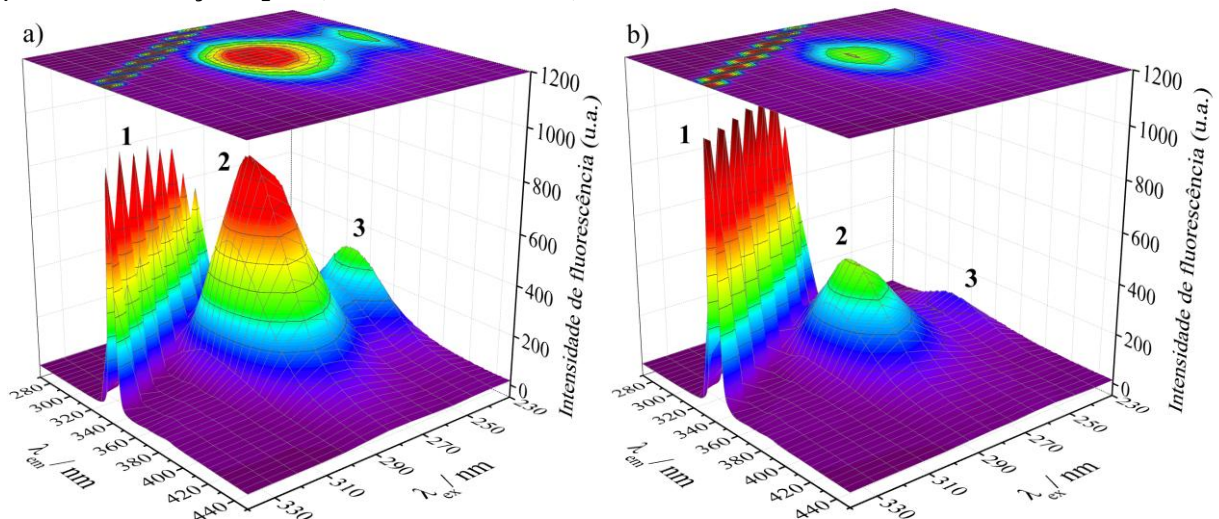


Tabela 3 – Espectro de fluorescência tridimensional para a interação BSA-TM.

Pico	BSA (2 μ M)			BSA (2 μ M) + TM (50 μ M)		
	Posição $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	Intensidade de Fluorescência	Posição $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	Intensidade de Fluorescência
1 (Espalhamento Rayleigh)	$\lambda_{ex}=\lambda_{em}$	0	922	$\lambda_{ex}=\lambda_{em}$	0	>1015
2 (Trp e Tir)	285/340	55	835 (100%)	285/340	60	414 (49,6%)
3 (Cadeia polipeptídica)	238/335	97	338 (100%)	238/338	100	135 (40,1%)

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

5.4.2 Dicroísmo circular (DC)

Alterações na estrutura secundária da proteína podem ser detectadas pela técnica de dicroísmo circular. O conteúdo de α -hélice presente na proteína apresenta bandas negativas em 208 e 222 nm, devido as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ da cadeia polipeptídica (ZHANG et al., 2013). Os valores expressos por DC são dados em termos da elipticidade molar média do resíduo (EMR), de acordo com a Equação 5 (CHAVES et al. 2016):

$$EMR = \frac{DC(\text{med})\text{observado}}{C_p \times n \times L \times 10} \text{ (deg cm}^2\text{dmol}^{-1}\text{)} \quad \text{Equação (5)}$$

C_p é a concentração molar da proteína, n é o número de resíduos de aminoácidos (583 para BSA) e L é comprimento do percurso (0,1 cm). A quantidade de α -hélice da BSA foi calculada utilizando as Equações 6 e 7 (CHAVES et al. 2016):

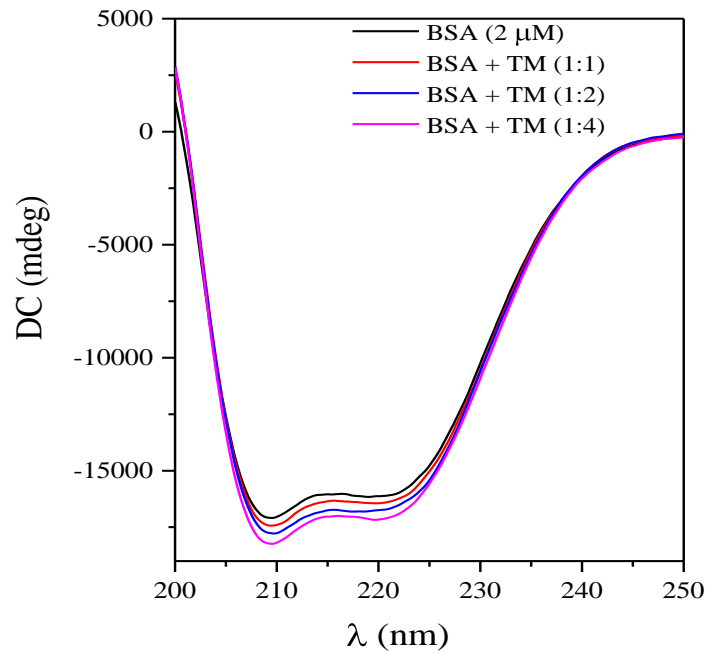
$$\alpha\text{-hélice(\%)} = \frac{-EMR_{208} - 4000}{33000 - 4000} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

$$\alpha\text{-hélice(\%)} = \frac{-EMR_{222} - 2340}{33000} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

EMR_{208} e EMR_{222} representam o valor de EMR a 208 e 222 nm, respectivamente. 4000 é a EMR da forma beta na conformação randômica a 208 nm e 33000 é o valor de EMR da α -hélice pura a 208 e 222 nm.

A Figura 9 mostra o perfil do espectro de DC da BSA em função do aumento da proporção de TM no meio. A proteína apresentou, em ambas as bandas, 208 e 222 nm, diminuição da intensidade com adição do ligante ao sistema. Na ausência de TM, o conteúdo de α -hélice calculado foi de 43,92 e 41,33% para 208 e 222 nm, respectivamente. Ao ser adicionados incrementos do ligante (1:1, 1:2 e 1:4) a percentagem de α -hélice aumentou para ambas as bandas, com 45,06, 46,00 e 47,75% para 208 nm e 42,10, 43,00 e 44,16% para 222 nm.

Figura 9 - Espectro de dicroísmo circular da BSA (2 μ M) na presença de TM (2 μ M, 4 μ M e 8 μ M). Condições: pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM) a 30°C.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Nestes experimentos não foi observado deslocamento dos mínimos de absorção. O aumento no conteúdo de α -hélice do sistema avaliado pode ser associado à interação eletrostática da carga negativa no TM interagindo com as cargas positivas presentes na superfície da BSA, obtendo-se uma estrutura mais estável da proteína, com aumento do conteúdo de α -hélice devido a interações dipolo-dipolo inter ou intra-molecular na BSA (SAHA; YAKOVLEV, 2010). Desta forma, o TM ao se ligar a BSA causa mudanças na estrutura secundária da proteína. Perfil similar foi observado por Chunmei e colaboradores (2014) na avaliação da interação entre BSA e Hg(II) com o aumento de teor de α -hélice na adição das primeiras alíquotas do ligante (0-20 μ M) na proporção 1:10 do maior excesso BSA-Hg(II). Li e colaboradores (2007), no estudo da interação entre HSA com Hg(II) e outras espécies de mercúrio (MeHg^+ , EtHg^+ e PhHg^+), também constataram mudanças na estrutura secundária da proteína após incubação por 12 h na proporção 1:10 (HSA-ligante), entretanto, foi observado aumento no conteúdo de folhas beta após a interação.

5.5 Avaliação de competidores no processo de interação BSA-TM

No plasma existem várias espécies que podem se ligar a albumina e assim, favorecer ou dificultar o transporte de substâncias no meio biológico. Foi avaliada a influência de 15 possíveis competidores que estão entre os mais abundantes, no plasma ou soro, (Ca(II),

Mg(II), Zn(II), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Se(VI), glicose, cisteína, ácidos mirístico, palmítico, esteárico, linoleico e oleico, além do ânion fosfato) no processo de interação BSA-TM (Tabela 4).

Tabela 4 - Espécies presentes no plasma e soro humano.

Espécie	Concentração no plasma/soro (mM)	Concentração adotada (mM)	Proporção [competidor]/[HSA]	Referência
HSA	0,53 – 0,83	0,70	-	
Glicose	3,88-5,50	4,90	7,0	
Ca(II)	2,15 – 2,50	2,45	3,5	
Mg(II)	0,63 – 1,00	0,70	1,0	Bishop; Fodey; Schoeff, 2005.
Fosfato	0,87 – 1,45	0,70	1,0	
Fe(II) *				
Fe(III) *	0,65 – 1,70	1,05	1,5	
Cisteína *	0,20 – 0,27	0,23	0,3	Turell et al., 2009.
Zn(II) **	0,013 – 0,014	0,35	0,5	
Se(IV) **	0,0016 – 0,0018	0,07	0,1	Kobayashi et al., 2006.
Cu(II) **	0,037 – 0,044	0,35	0,5	
Ácido mirístico	0,06 – 3,25	0,21	0,3	
Ácido oleico	1,28 – 3,21	2,80	4,0	Glaser et al. 2010; Almeida et al., 2002; Spahis et al., 2015; Abdelmagid et al., 2015.
Ácido linoleico	2,56 – 4,92	3,50	5,0	
Ácido palmítico	1,63 – 4,06	2,80	4,0	
Ácido esteárico	0,49 – 1,05	1,05	1,5	

*Concentração de ferro total.

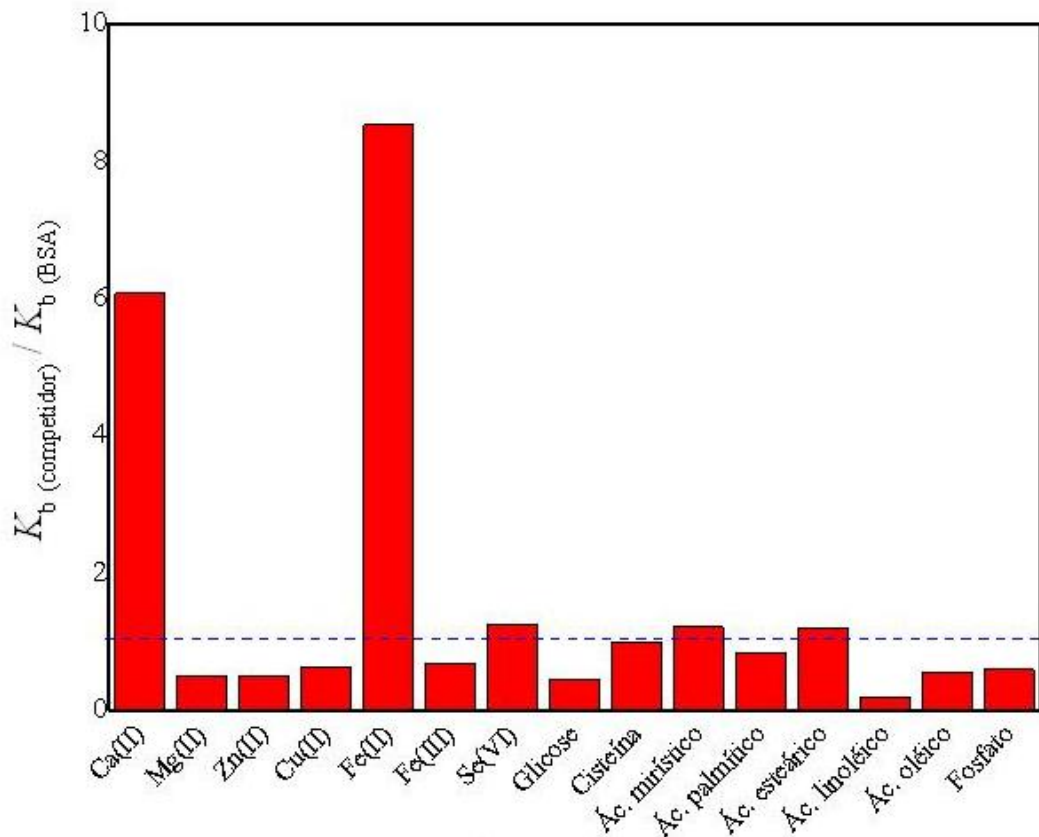
**Espécies com faixa de concentração menor que 0,07 mM a proporção adotada (competidor/HSA) foi de 0,5:1 ou 0,1:1.

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

A influência destes competidores pôde ser avaliada através da variação da constante de ligação na ausência destas espécies (K_b) e ao serem adicionadas ao sistema proteína-ligante (K_b'). Para tanto, a concentração utilizada dos competidores seguiu os valores indicados quanto normalidade fisiológica (Tabela 4). Assim, a razão entre as constantes da interação BSA-TM na presença e na ausência do competidor (K_b'/K_b) foi o parâmetro utilizado para esta avaliação.

A maioria dos competidores não influenciou no processo de interação simulando as condições fisiológicas, pois a razão das constantes foi próxima a unidade (Figura 10). Entretanto, Ca(II) e Fe(II) não seguiram esta tendência. Existe uma forte afinidade entre TM e Ca(II) em sistemas intracelulares o que pode estar relacionado com a capacidade deste íon em aumentar a constante de ligação com a proteína (GERICKE; DROOGMANS; NILIUS 1993). Além do mais, Ca(II) e Fe(II) podem estar agindo como moduladores positivos, provocando mudanças estruturais na biomolécula que contribuam para a interação com TM (BARNETT, et al., 2013).

Figura 10 – Efeito de competidores no K_b da interação BSA-TM. Condições: pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM) a 30°C.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

5.6 Avaliação da interação na presença de ANS

A fim de avaliar possíveis mudanças na hidrofobicidade da superfície da proteína a partir da interação TM-BSA foi empregado ANS (ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato) como uma sonda fluorescente hidrofóbica, carregada negativamente, que em soluções aquosas apresenta baixa fluorescência, contudo, ao se ligar a regiões apolares em proteínas ocorre aumento do sinal de fluorescência (SLAVIK, 1982). A ligação do ANS a BSA apresenta rendimento quântico (ϕ) de 0,12 e com isso, este sistema (ANS-BSA) pode ser utilizado para monitorar alteração no grau de hidrofobicidade da proteína em função do processo de interação devido a mudanças conformacionais e alteração na carga superficial (MÖLLER; DENICOLAT, 2002; MATULUS; LOVRIEN, 1988).

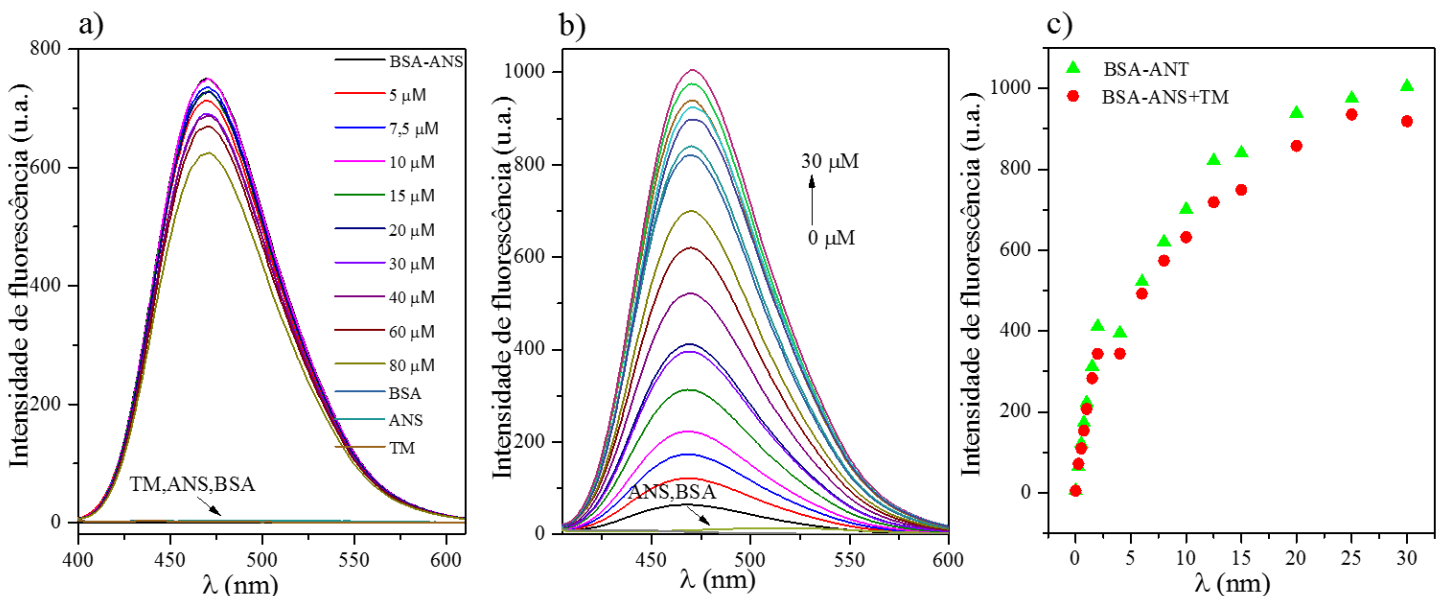
Desta forma, foi calculada a constante de dissociação aparente (K_d) do complexo ANS-BSA na ausência e presença de TM. Para tanto, se utilizou a relação linear $F = C_{ANS}B$ entre o sinal de fluorescência (F) e a concentração de ANS (C_{ANS} , 0-2 μ M), sendo B o coeficiente de proporcionalidade. Para obtenção da quantidade de ANS ligado a BSA foi

empregado a relação $[ANS_{\text{ligado}}] = F/B$. A quantidade de ANS livre foi obtida a partir de $[ANS_{\text{livre}}] = [ANS_{\text{total}}] - [ANS_{\text{ligado}}]$. O valor de K_d foi calculado através do inverso do coeficiente angular da relação F vs $F/[ANS]_{\text{livre}}$. A partir da saturação da BSA com ANS foi obtida a intensidade de fluorescência máxima (F_{max}) que está relacionada ao número de sítios hidrofóbicos na superfície da proteína. Assim, o índice de hidrofobicidade na superfície da BSA (HSP) foi calculado na ausência e presença do ligante, aplicando a Equação 8 (RANJBAR et al., 2013).

$$HSP = \frac{F_{\text{max}}}{BSA K_d} \quad \text{Equação (8)}$$

Verificou-se que com aumento da concentração de TM (0-80 μM) houve redução máxima de 16,9% do sinal de fluorescência referente ao complexo ANS-BSA, indicando que o TM não desloca de forma efetiva a sonda das regiões hidrofóbicas da proteína (Figura 11a). Visando calcular o HSP do sistema, a BSA foi titulada com ANS ocorrendo saturação a partir da adição de 30 μM da sonda, como evidenciado na Figura 11b. Pela comparação dos sistemas pôde-se observar que a fluorescência na presença do TM foi menor quando comparado a condição contendo apenas a proteína (Figura 11c). A partir destes dados calculou-se os parâmetros K_d e HSP apresentado na Tabela 4.

Figura – 11 Espectro de fluorescência do complexo ANS-BSA com adição de TM. ANS (2 μM), BSA (2 μM), TM (0-80 μM); b) Adição de ANS (0-30,0 μM) ao sistema BSA-TM, BSA (2 μM), TM (40 μM); c) Ligação ANS a BSA (2 μM) na ausência (\blacktriangle) e presença (\bullet) de TM (40 μM). Condições: pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM) a 30°C.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

O valor de K_d aumentou na presença de TM indicando que a magnitude da ligação ANS-BSA é menor quando o ligante está presente, em função da redução da quantidade de

regiões hidrofóbicas (Tabela 5). O valor de HSP diminuiu 14% para o sistema contendo o TM, indicando que houve decréscimo da hidrofobicidade da superfície da BSA decorrente do processo de interação proteína e TM. Este resultado pode ser explicado devido a carga negativa presente na molécula de TM no pH avaliado, propiciando aumento de carga na superfície da BSA, conduzindo a diminuição das regiões hidrofóbicas da proteína. De forma similar, Ranjbar e colaboradores (2013) avaliaram a interação da HSA com isoimperatorina, droga utilizada no tratamento contra Alzheimer e alguns tipos de câncer, onde foi verificado aumento no valor de K_d e diminuição no valor de HSP após interação.

Tabela 5- Parâmetros de hidrofobicidade na superfície da BSA na presença e ausência de TM.

Parâmetros	Sistema	
	BSA	BSA + TM
K_d	4,19 ± 0,01	4,36 ± 0,01
$F_{max}/[BSA]$	140,91	126,10
HSP	33,63 ± 4,19	28,92 ± 4,22

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

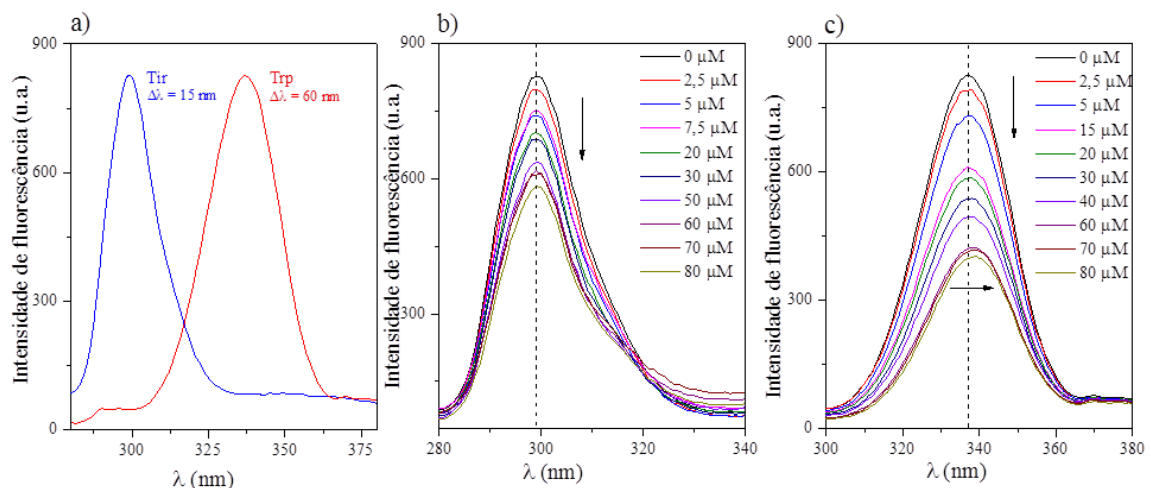
5.7 Fluorescência sincronizada

Através da fluorescência sincronizada é possível monitorar o processo de interação com os resíduos de triptofano e tirosina, separadamente (Figura 12a). Para tanto, mantém-se constante o $\Delta\lambda$ em função do comprimento de onda de excitação (λ_{ex}), sendo $\Delta\lambda = 60$ nm para monitoramento de forma seletiva dos resíduos de triptofano, e de forma análoga, quando se utiliza $\Delta\lambda = 15$ nm, o resíduo de tirosina é monitorado. Além disto, este ensaio é capaz de identificar mudanças de polaridade no microambiente destes resíduos de aminoácidos em função do processo de interação (YUAN; WELJIE; VOGEL, 1998; CONGDON; MUTH; SPLITTGERBER, 1993).

A Figura 12b-c mostra o espectro de fluorescência dos resíduos de triptofano e tirosina, na interação com TM com máximo de emissão em 337 e 299 nm, respectivamente. Com a adição de TM, a intensidade de fluorescência da BSA diminuiu, porém, não houve mudanças no máximo de emissão quando monitorou-se a tirosina (Figura 12b). Entretanto, um deslocamento de 2 nm, no máximo de emissão, para maiores comprimentos de onda foi observado para o triptofano seguido de redução do sinal de fluorescência ao interagir com TM (Figura 12c), indicando que o microambiente próximo a este aminoácido se torna mais polar e mais acessível ao solvente (água) (HEA, et al., 2016). Além disso, com base na Tabela 6 o valor de K_{sv} para o triptofano ($1,36 \pm 0,08 \times 10^4$ L mol⁻¹) é maior em relação a tirosina ($0,46 \pm 0,03 \times 10^4$ L mol⁻¹). Em função do exposto, conclui-se que o TM está mais próximo da região que contém o resíduo de Trp durante a interação com a proteína. A BSA possui dois

resíduos de triptofano, um localizado no sítio I (Trp212) e o outro no subdomínio IB (Trp134). Apesar deste resultado indicar a proximidade do resíduo de triptofano no processo de interação, não se pode inferir qual dos resíduos de triptofano (Trp212 ou Trp134) teve o microambiente alterado de forma mais significativa. Resultado similar foi obtido por Chunmei (2014) e Shen (2013) com seus respectivos colaboradores, no estudo de interação entre BSA e Hg(II). Entretanto, nesses trabalhos não foi determinado qual região da proteína ocorre interação com os íons Hg(II). Desta forma, para o TM é pertinente avaliar os sítios preferenciais de interação do TM na estrutura da macromolécula.

Figura 12 – a) Espectro de emissão dos resíduos de tirosina ($\Delta\lambda = 15$ nm) e triptofano ($\Delta\lambda = 60$ nm) na interação BSA-TM. Fluorescência sincronizada para o resíduo de tirosina (b) e o resíduo de triptofano (c) com adição de incrementos de TM (0-80 μ M).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Tabela 6 - Fluorescência sincronizada para a interação BSA-TM.

$\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$ (nm)	K_{sv} (10^4 L mol $^{-1}$)	r	$\Delta\lambda$ (nm)
15	0,46±0,03	0,9819	0
60	1,36±0,08	0,9867	+2

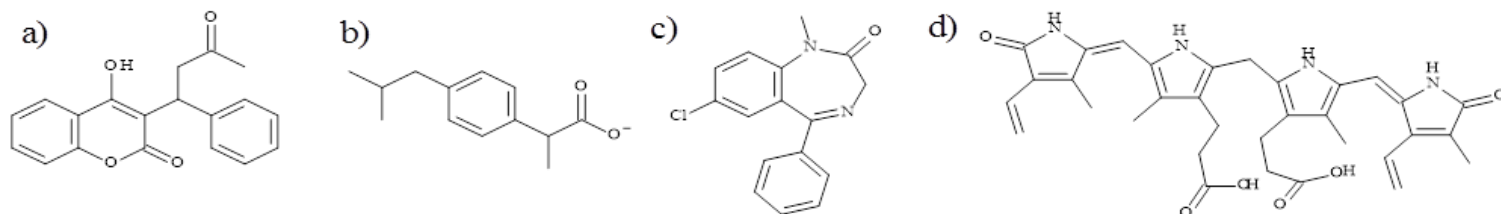
Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

5.8. Sítio preferencial de ligação

Na BSA existem duas regiões preferenciais para a ligação de pequenas moléculas sendo denominados de sítios I e II. Varfarina, ibuprofeno e diazepam (Figura 13) são marcadores preferenciais para estas regiões, em que varfarina se liga ao sítio I, enquanto ibuprofeno e diazepam ao sítio II (SUDLOW; BIRKETT; WADE, 1976; TENGA et al., 2011). Desta forma, ensaios na presença destes marcadores promovem uma competição pelo sítio de ligação na estrutura da proteína. Um desfavorecimento na interação do ligante de interesse na presença do marcador é um indício que este interage na mesma região que o marcador. Assim, considerando a razão das constantes na presença (K_b') e na ausência (K_b) destes marcadores é um parâmetro para identificar o sítio de ligação do TM a BSA. Caso esta

razão seja menor que a unidade, indica que existe competição para o sítio de ligação. Todos os experimentos foram realizados com duas proporções distintas de marcador e BSA.

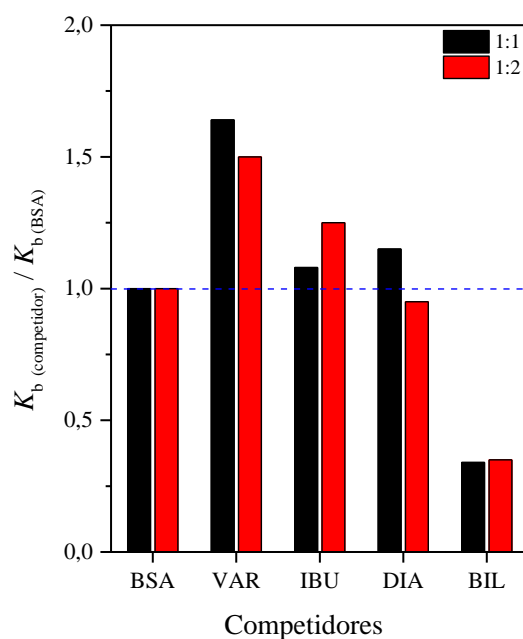
Figura 13 - Estrutura química dos marcadores de sítio varfarina (a), ibuprofeno(b), diazepam (c) e bilirrubina (d).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

A Figura 14 mostra que os marcadores utilizados não provocaram diminuição na constante de ligação, indicando que TM não migra para nenhum dos sítios avaliados (sítio I e II). Entretanto, o resultado por fluorescência sincronizada mostrou que o microambiente do resíduo de triptofano sofre mais influência do processo de interação em relação ao resíduo de tirosina. Considerando o fato de a BSA possuir dois resíduos de triptofano, um no sítio I (Trp 212) e outro no subdomínio IB (Trp 134), e que este resíduo do sítio I não foi alterado, pois o ligante não deslocou a varfarina (sítio I), logo é provável que o resíduo de triptofano (Trp 134) no subdomínio IB seja o responsável pelas alterações constatadas no ensaio de fluorescência sincronizada.

Figura 14 – Avaliação do sítio de ligação utilizando os marcadores varfarina, ibuprofeno, diazepam e bilirrubina, todos a 2 e 4 μM na interação da BSA (2 μM) com TM (0-80 μM) monitorando variação de K_b .



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Nesta região do subdomínio IB, está presente o único resíduo de cisteína livre (Cis 34) da BSA e, sabendo-se que existe uma forte afinidade de compostos mercurados por resíduos

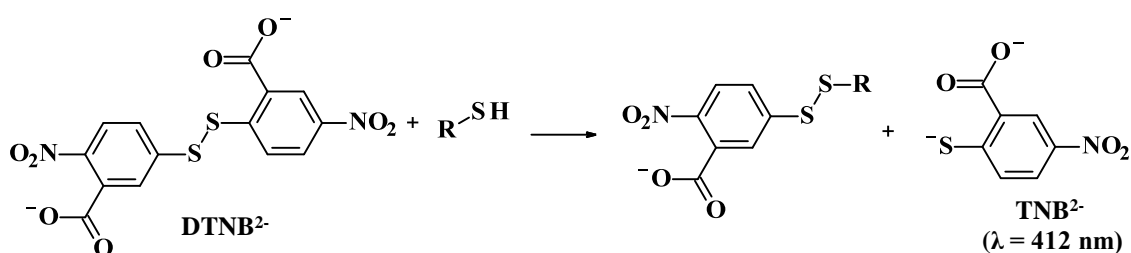
de aminoácidos contendo enxofre, como a cisteína, possivelmente TM estaria migrando para esta região e interagindo com o resíduo de cisteína livre (TRÜMPLER et al., 2009). A fim de averiguar esta hipótese, foi utilizado bilirubina como marcador para o subdomínio IB (KRUPP, et al., 2008). Zunszain e colaboradores (2008) verificaram que a bilirubina liga-se seletivamente ao subdomínio IB através de estudos de cristalografia. Contudo, este ligante ainda não foi utilizado como marcador de sítio de ligação ou região preferencial de interação da proteína, sendo este trabalho pioneiro neste aspecto. Assim, ao adicionar bilirubina ao sistema a constante de ligação diminui levando a diminuição da razão das constantes. Este resultado indica que TM migra para a região do subdomínio IB, diferentemente dos sítios preferenciais e tradicionais de ligação, I e II. Diversos estudos mostram que há formação de um aduto entre espécies mercuradas com resíduos de tióis de importância biológica presentes em proteínas. Para corroborar esta proposta, Krupp e colaboradores (2008), utilizando ESI-ion-trap MS, identificou que o metilmercúrio e Hg(II) liga-se ao resíduo de cisteína formando um aduto. Desta forma, é pertinente considerar que TM pode interagir com a cisteína livre (Cis 34) no subdomínio IB da BSA. Assim, a fim de avaliar se ocorre a formação de um aduto após a clivagem da ligação S-HgEt do TM na presença da proteína, o mecanismo de interação do TM com a BSA foi investigado.

5.9 Mecanismo de interação

5.9.1. Ensaio de Ellman

Para tentar elucidar o mecanismo de interação entre a BSA e o TM, foi utilizado o ensaio de Ellman a qual é baseado na reação entre DTNB e o grupo tiol livre gerando como produto colorido o TNB (Figura 15), de coloração amarela ($\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$). A quantidade de cisteína livre (Cis34) calculada para BSA foi de 47% empregando cisteína como padrão, corroborando com o trabalho de Reeves e colaboradores (2013). Todos os sistemas avaliados foram mantidos na proporção molar de 1:1.

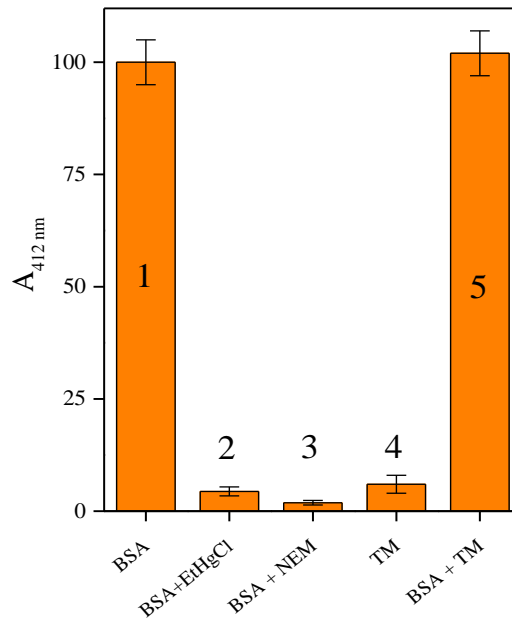
Figura 15 – Reação de Ellman.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

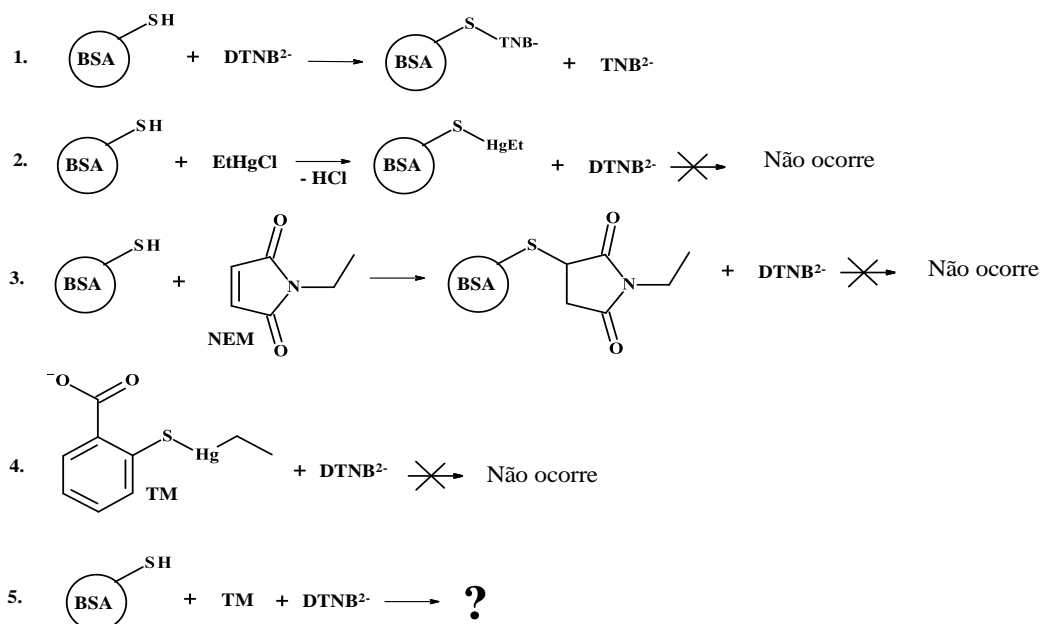
Quando se incubou as misturas BSA + NEM e BSA + EtHg⁺ ocorreu redução significativa dos sinais (> 90%) (Figura 16) quando comparado ao sistema contendo apenas BSA, indicando que tanto NEM quanto EtHg⁺ se ligaram seletivamente ao resíduo de cisteína livre (Cis34) da proteína, bloqueando-o, e assim impedindo que a reação com DTNB ocorresse. O TM livre não apresentou sinal significativo (Figura 16) para o ensaio de Ellman, indicando que o grupo tiol não está livre. As reações destes sistemas estão representadas na Figura 17.

Figura 16 – Absorvância das soluções: BSA, BSA+EtHgCl, BSA+NEM, TM e BSA+TM. Todos a 60 μM.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

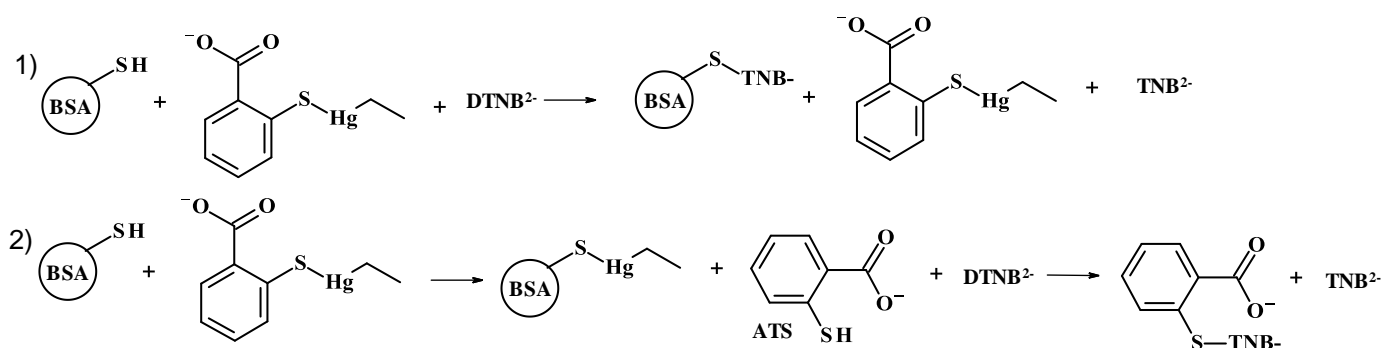
Figura 17 – Reações de BSA e TM empregando DTNB.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Entretanto, observou-se que o sistema BSA + TM apresentou sinal de absorção similar ao da proteína livre (Figura 16), desta forma, foram consideradas duas hipóteses representadas na Figura 18: (1) o DTNB reage apenas com o resíduo de cisteína livre da BSA e gera TNB no meio, não havendo migração do EtHg^+ do TM para a Cis34 da proteína. Assim, a interação TM e BSA ocorre com a manutenção da estrutura original do ligante. Na hipótese (2) considera-se que ocorreria reação entre BSA e TM, com clivagem da ligação S-Hg do TM, e formação de um aduto BSA-HgEt liberando ATS. Este ATS gerado reagiria com DTNB e levaria a formação de TNB no meio, responsável pelo sinal em 412 nm.

Figura 18 – Hipóteses para o mecanismo de interação.

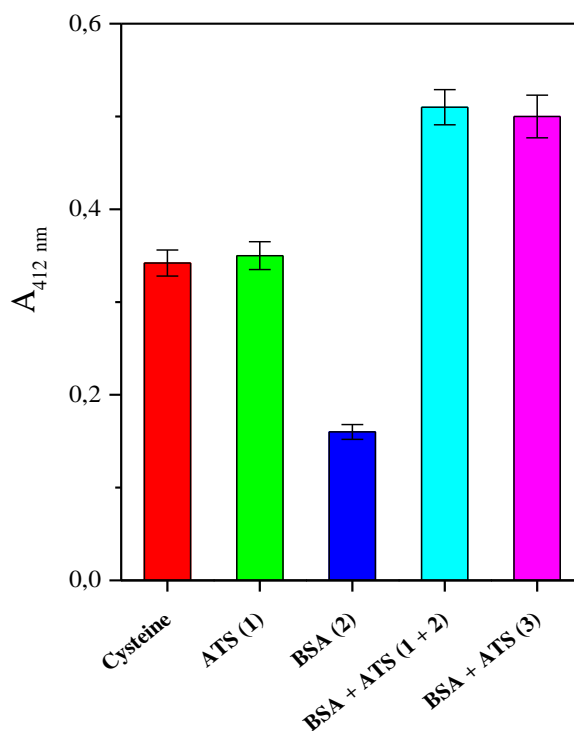


Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Para averiguar qual das hipóteses seria mais satisfatória, foram considerados outros sistemas (Figura 19). Observou-se que o sinal de absorção de soluções a mesma concentração de cisteína e ATS foram similares ao reagir com DTNB, indicando que DTNB reage com ATS na mesma proporção que com a cisteína. O valor de absorvância para a solução de BSA foi aproximadamente metade dos sinais relativos a cisteína e ATS (Figura 19). Isto está coerente e se deve ao fato da BSA apresentar apenas 47% do resíduo de cisteína livre. Por fim, verificou-se que o somatório dos sinais das soluções isolada da BSA e ATS foi igual ao sinal da mistura BSA+ATS (Figura 19).

Isto se deve ao fato que DTNB reage tanto com BSA quanto ATS. Desta forma, sugere-se que a BSA reaja inicialmente com TM levando a formação de um aduto entre a proteína e o EtHg^+ (BSA-HgEt), e por consequência, libere o ATS. Em seguida, ocorre a interação supramolecular entre o aduto BSA-HgEt e o ATS. Assim, a hipótese (2) mostrou-se mais adequado para representar o processo de interação entre BSA e TM simulando condições fisiológicas.

Figura 19 – Absorvância das soluções de: cisteína, ATS, BSA, e a soma das absorções de BSA+ATS e a absorção da mistura BSA+ATS. Todos a 60 μM.

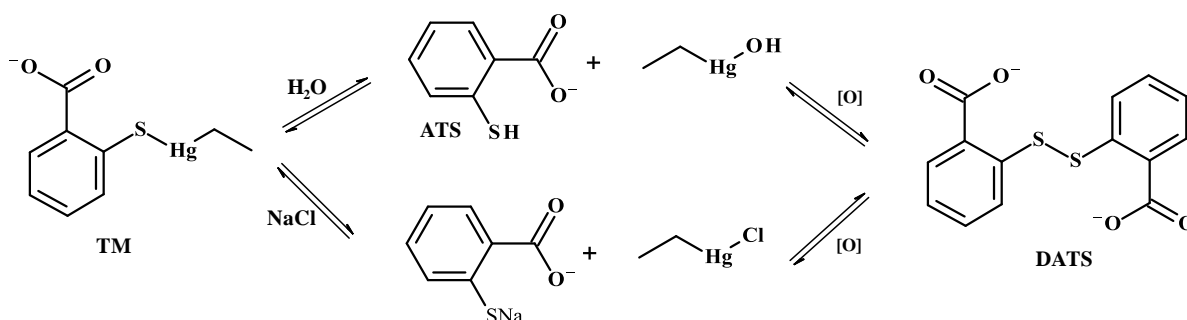


Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

5.9.2 Titulação espectrofluorimétrica com os produtos de degradação do TM

Os possíveis produtos de degradação de TM (Figura 20) foram utilizados para titulação da BSA por fluorescência no estado estacionário de forma análoga a titulação com TM (Figura 21).

Figura 20 – Produtos de degradação do TM.

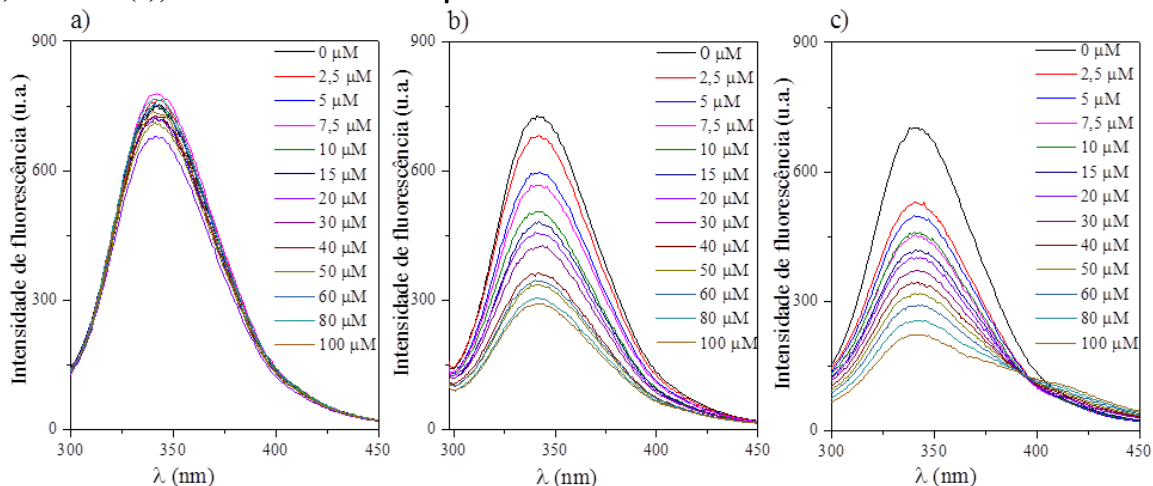


Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

A Figura 21a mostra que EtHgCl não proporciona supressão de fluorescência significativa frente a BSA, possivelmente por estar ligada ao resíduo de cisteína livre. Já o ATS e DATS (Figuras 21b e c) apresentaram espectros similares ao do TM com valores de K_b

$0,35 \pm 0,01$ e $0,47 \pm 0,01 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$, respectivamente, sendo mais próximos ao valor da interação BSA-TM ($3,24 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ a 30°C).

Figura 21 - Titulação espectrofluorimétrica da BSA (2 μM) com incrementos de EtHg⁺ (a), ATS (b) e DATS (c), todos variando 0-100 μM .



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Pelo ensaio com marcadores de sítio de ligação (varfarina e diazepam) foi verificado que tanto ATS quanto DTAS, interagem preferencialmente no sítio I (Tabela 7). Este resultado reforça a hipótese que o TM migra para o subdomínio IB, onde ocorre a transferência do EtHg⁺ para o resíduo de cisteína livre e, em sequência o ATS gerado interage por forças eletrostáticas com a BSA na mesma região levando a redução do sinal de fluorescência referente ao Trp134.

Tabela 7 – Marcadores de sítio de ligação na avaliação da interação entre BSA-ATS e BSA-DATS.

Sistema	Varfarina 2 μM (sítio I)	Diazepam 2 μM (sítio II)	Bilirrubina 2 μM (subdomínio IB)
	K_b'/K_b	K_b'/K_b	K_b'/K_b
BSA-ATS	0,60	1,35	0,95
BSA-DATS	0,30	1,17	1,05

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

5.9.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

O mecanismo de interação entre o TM e a BSA foi investigado empregando RMN ¹H. Por meio da comparação dos espectros de RMN de ¹H dos diferentes sistemas (Figura 21a-d) pôde-se concluir que:

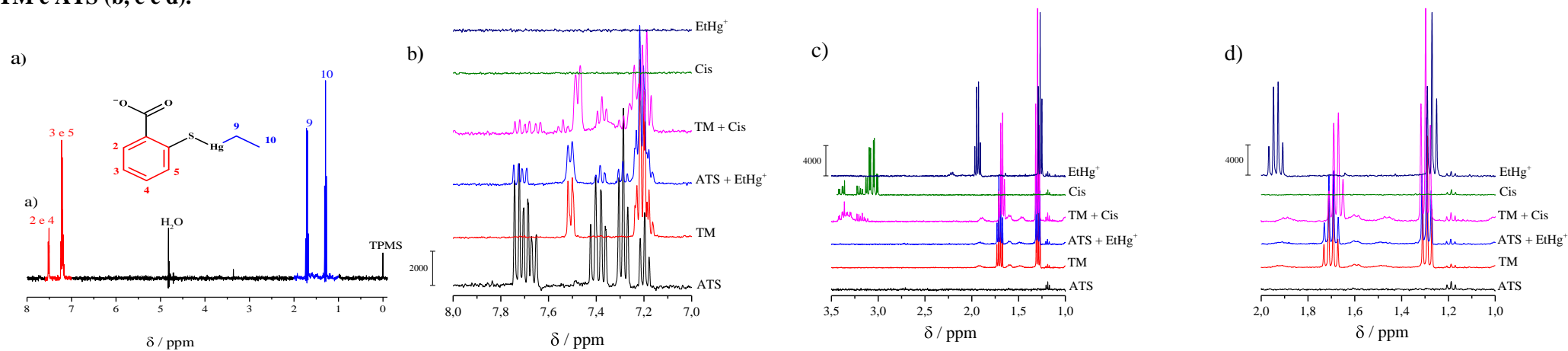
1) TM foi estável em solução simulando o meio fisiológico (Figura 21a), visto que não sofreu degradação formando ATS e EtHgCl com o tempo (foi avaliado até 15 dias), esta afirmação se baseia no deslocamento químico do metileno (1,70 ppm) ligado ao mercúrio ser idêntico ao mesmo sinal no TM (1,70 ppm);

- 2) Mistura de ATS + EtHgCl (Figura 21b-d) levou a formação preferencial de TM livre, indicando que o ATS na presença de EtHgCl prefere ficar na forma de aduto, ou seja, TM, esta afirmação se baseia no deslocamento químico do metileno (1,70 ppm) ligado ao mercúrio ser idêntico ao mesmo sinal no TM (1,70 ppm);
- 3) Mistura TM + Cis mostra que há liberação de ATS no meio e consequente formação de Cis-HgEt, esta afirmação se baseia no deslocamento químico do metileno (1,68 ppm) ligado ao mercúrio que sofre deslocamento para campo mais alto, indicando formação do aduto Cis-HgEt. Além disso, há o aparecimento de sinais de H aromáticos (7,69 e 7,39 ppm) referentes a formação de ATS no meio (Figura 21b-d);
- 4) O espectro do cloreto de etil-mercúrio (EtHgCl) mostra claramente que este prefere estar na forma de aduto na presença do ATS, visto que no EtHgCl o deslocamento químico do metileno está em 1,93 ppm, enquanto que no TM está em 1,69 ppm e no aduto Cis-HgEt está em 1,68 ppm (Figura 21c).

Desta forma, estes resultados corroboram com a hipótese 2, mostrando que o mecanismo de interação acontece em uma única etapa, com formação de um aduto BSA(Cis)-EtHg, liberando ATS livre, o qual interage na região do subdomínio IB por meio dos aminoácidos carregados positivamente (Lys-131, Lys-159 e His-18) da proteína modificada (BOLEL et al., 2013). Assim, realizou-se avaliação dos deslocamentos nos sinais de hidrogênio do TM após interação com BSA nas proporções 100:1, 50:1 e 25:1 (TM:BSA). Este sistema indica a ocorrência de interação proteína-ligante, contudo, sem sinais referentes ao ATS (Figura 23).

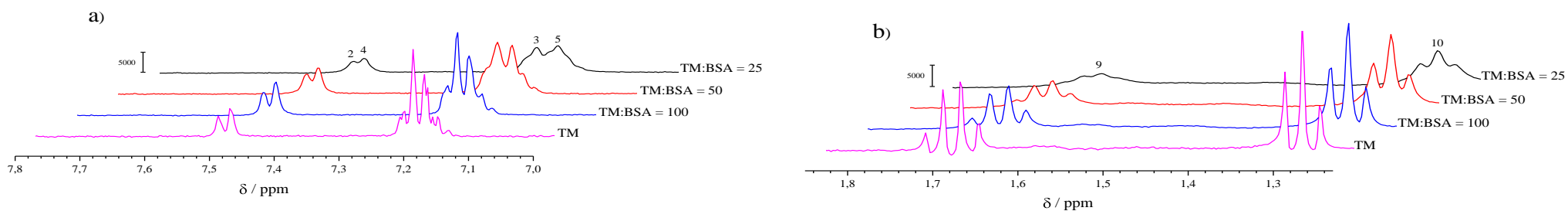
Uma vez que o ATS é liberado e interage com a proteína (BSA-HgEt), os sinais do ATS livre não podem ser mensurados visto a relaxação da proteína é muito rápida devido à sua alta massa molecular. A análise espectral das misturas de TM com quantidades crescentes de BSA (Figura 23) mostra que a interação da BSA e o TM (em excesso) se dá por meio dos H-2, H-3 e H-4, sendo estes hidrogênios que sofreram as maiores variações de deslocamento químico (δ), sendo -0,018, -0,014 e -0,015 ppm, respectivamente (Tabela 8) na presença da macromolécula.

Figura 22 - Espectro de RMN¹H de TM (1 mM) monitorado durante 15 dias (a) e espectro das soluções de EtHg⁺, cisteína, TM+cisteína, ATS+EtHg⁺, TM e ATS (b, c e d).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Figura 23 – Espectro de RMN de TM (1 mM) na presença de BSA nas proporções 100:1, 50:1 e 25:1.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Tabela 8 - Deslocamento químico do espectro de TM na ausência e na presença de diferentes proporções de BSA

Hidrogênio	δ / ppm				$\Delta\delta^1$
	TM	Proporção TM:BSA			
		100	50	25	
2	7,518	7,513	7,510	7,500	-0,018
3	7,199	7,195	7,192	7,185	-0,014
4	7,500	7,493	7,490	7,485	-0,015
5	7,218	7,212	7,215	7,218	0,000
9	1,703	1,695	1,692	1,687	-0,016
10	1,291	1,286	1,286	1,280	-0,011

¹ $\Delta\delta$ foi calculado baseado na diferença entre $\delta(\text{TM:BSA} = 25)$ e $\delta(\text{TM})$.

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

5.10 Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência (FRET)

O FRET é um processo mecânico-quântico que se baseia na transferência de energia de um doador (fluoróforo) em estado eletrônico excitado para um receptor (cromóforo) através de interações dipolo-dipolo, sem emissão de fótons (SAHOO, 2011). De acordo com a teoria de Förster, a eficiência de transferência, no processo de interação, permite inferir sobre a distância entre o doador e o receptor e, para tanto, é necessário que haja sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência do fluoróforo com o de absorção (UV-vis) do cromóforo. Neste processo, a distância entre o doador e receptor deve estar entre 2-8 nm para que o processo seja eficiente, e por fim, deve ocorrer uma orientação adequada do dipolo de transição entre doador e receptor (GLOSH; RATHI; ARORA, 2016). A eficiência de transferência energia (E) para o sistema BSA-HgEt foi calculada utilizando equação 9: (WANG et al., 2011).

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6} \quad \text{Equação (9)}$$

F e F_0 são os sinais normalizados de fluorescência na ausência e presença do receptor, respectivamente, R_0 é a distância crítica de Förster em que 50% da energia emitida é transferida para o receptor e r é a distância do receptor para o resíduo de triptofano presente na proteína. R_0 foi calculado utilizando a equação 10 (WANG et al., 2011).

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 n^4 \Phi J \quad \text{Equação (10)}$$

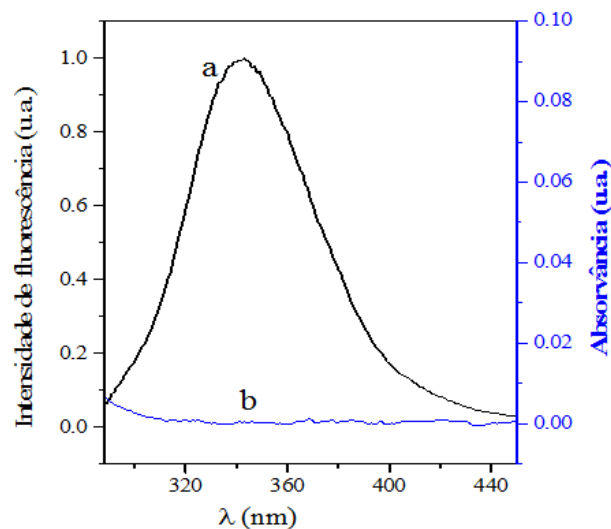
K^2 é o fator de orientação que está diretamente relacionado com a geometria do dipolo entre o doador e o receptor ($K^2 = 2/3$, para orientação aleatória em solução), n é o índice de refração do meio (1,336), Φ é o rendimento quântico da proteína ($\Phi = 0,15$ para BSA). J corresponde a área referente à sobreposição espectral entre o espectro de emissão do doador e de absorção do receptor, calculado utilizando a equação 11 (WANG et al., 2011):

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F(\lambda) d\lambda} \quad \text{Equação (11)}$$

λ é o comprimento de onda correspondente ao espectro de fluorescência da solução de BSA e o espectro de absorção da solução de TM. $F(\lambda)$ e $\epsilon(\lambda)$ são as intensidades de fluorescência da solução de BSA e o coeficiente de absorção molar da solução de TM, respectivamente. A Figura 24 mostra a sobreposição dos espectros de fluorescência da solução de BSA e de absorção por UV-vis de TM utilizando para calcular a distância entre doador e receptor.

Utilizando as equações 8-10 pôde-se obter os valores $J = 1,80 \times 10^{-16} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, $R_0 = 1,23 \text{ nm}$, $E = 0,044$ (4,4%) e $r_0 = 2,06 \text{ nm}$. Através do mecanismo de interação, foi visto que a molécula de TM é clivada e ATS é o responsável pela interação e diminuição da fluorescência. Assim, 2,06 nm é a distância entre ATS e o complexo BSA-EtHg. Desta forma, a transferência de energia da BSA-EtHg para ATS ocorre com elevada probabilidade (HE et al., 2005).

Figura 24 - Sobreposição espectral da emissão de fluorescência de BSA (curva a), com absorção de TM (curva b).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

5.11. Avaliação da formação de amiloides

A formação de fibrilas amiloides insolúveis, ricas em folhas beta com morfologia fibrilar, em tecidos e órgãos, está diretamente relacionada ao desenvolvimento de pelo menos 25 doenças conformacionais como diabetes tipo II, Alzheimer e Parkinson (ZHANG; ZOU; LIU, 2012; WANG et al., 2016). Algumas moléculas são estudadas a fim de retardar este processo, denominadas moléculas anti-agregantes, como compostos fenólicos (curcumina, quercetina, ácido tânico), agentes tensoativos, aspirina, nicotina, entre outros. Entretanto, não existe cura para esta patologia (ZHANG et al., 2013). De forma contrária, algumas espécies

podem acelerar a fibrilação ao interagir com a biomolécula, como Cu(II), Pb(II) e nanotubos de carbono (PANDEY; GHOSH; DASGUPTA, 2010; GUAN; ZHANG; WANG, 2014; MAZAHERI et al., 2015).

Espécies de mercúrio como MeHg^+ , EtHg^+ , $\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$ apresentam elevada toxicidade ao ser humano e são acumulados e metabolizados preferencialmente no cérebro, onde são biotransformadas em mercúrio inorgânico (ROONEY, 2014). Estas espécies podem contribuir diretamente no processo de fibrilação proteica. Neste sentido, para avaliar o efeito da possível toxicidade do TM em meio biológico, a cinética de agregação proteica foi investigada, sendo utilizado o EtHg^+ como referência para comparação. A tioflavina T (TT) foi empregada como sonda fluorogênica para monitorar a formação de amiloides (NILSON, 2004). O perfil espectral obtido para o sistema TM+BSA em processo de fibrilação é apresentado na Figura 25a, indicando que TT apresenta baixa fluorescência livre, mas após adição das fibrilas ocorre um aumento significativo do sinal analítico de fluorescência, estabilizando após 2,5 h.

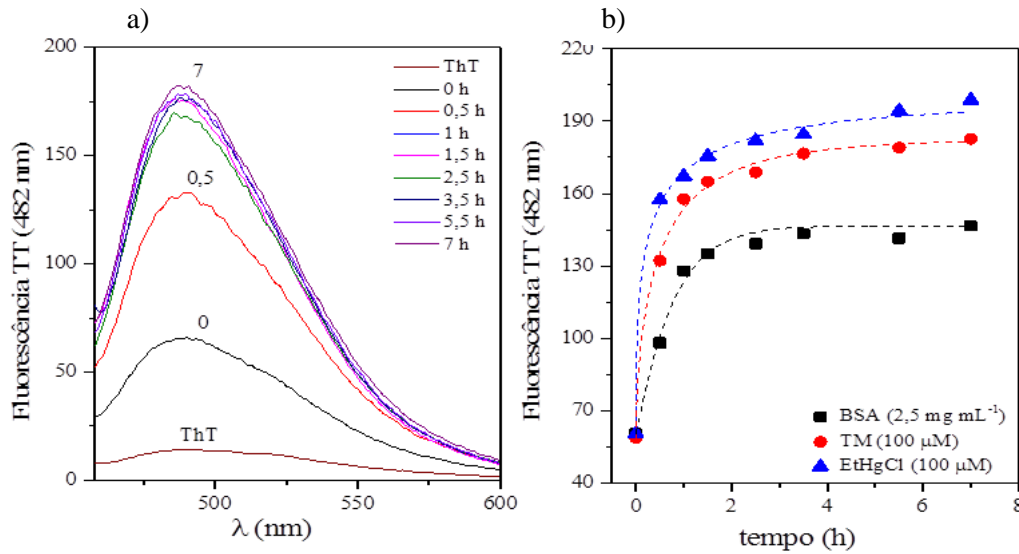
A Equação 12 foi utilizada para calcular os parâmetros da cinética de formação das fibrilas proteicas (utilizando BSA como modelo) na ausência e presença de TM e EtHg^+ (GUAN et al. 2014).

$$F = F^\infty + \Delta F \exp - [k_{sp} t]^n \quad \text{Equação (12)}$$

Sendo F , a intensidade de fluorescência de TT no tempo t , ΔF^∞ a intensidade de fluorescência máxima, ΔF a amplitude dos sinais de fluorescência medidos e k_{sp} é constante relativa à taxa de formação espontânea de fibrilas.

O efeito do TM e EtHg^+ para indução de fibrilas proteicas em função do tempo é mostrado na Fig. 25b. A presença de TM e EtHg^+ ao sistema contendo BSA proporcionam um aumento de k_{sp} de 42,3 e 122,3%, respectivamente, quando comparado ao valor da BSA na ausência dos ligantes (Tabela 9). Estas espécies de mercúrio favorecem a taxa de fibrilação da BSA, podem provocar repulsões eletrostáticas intramolecular, favorecendo a formação das fibrilas (JUARÉZ; TABOADA; MOSQUERA, 2009). Além disto, apresentaram $n < 1$ indicando que a cinética pode estar associada a múltiplos mecanismos na formação do amiloide (JUARÉZ; TABOADA; MOSQUERA, 2009). Por fim, é possível perceber a contribuição do TM e seu produto de degradação (EtHg^+) no processo de fibrilação proteica, sendo que seus efeitos tóxicos podem estar relacionados a doenças conformacionais ou processos bioquímicos associados a agregação de proteínas.

Figura 25 - a) Espectro de fluorescência da tioflavina T (20 μM) para a fibrilação da BSA (2,5 mg L^{-1}) na presença de TM (100 μM); b) Cinética de fibrilação para a BSA (2,5 mg L^{-1} , ■) na presença e ausência de TM (●) e EtHgCl (▲) ambos a 100 μM .



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos do processo de fibrilação da BSA

Sistema	ΔF	K_{sp} (h^{-1})	n
BSA (2,5 mg mL^{-1})	82	$1,30 \pm 0,10$	$1,07 \pm 0,16$
BSA + TM (100 μM)	124	$1,85 \pm 0,15$	$0,60 \pm 0,05$
BSA + EtHg ⁺ (100 μM)	138	$2,89 \pm 0,43$	$0,40 \pm 0,04$

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

6 CONCLUSÃO

A interação entre BSA e TM, simulando condições fisiológicas, revelou que o processo acontece por *quenching* estático com formação de um complexo não fluorescente. O valor de K_b foi de $3,24(\pm 0,01) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ (30°C) com interação, preferencialmente eletrostática de forma espontânea. TM causa mudanças estruturais na BSA proporcionando aumento no conteúdo de α -hélice na BSA além de diminuir sua hidrofobicidade superficial. Ca(II) e Fe(II) favorecem a interação BSA-TM. TM interage no subdomínio IB da BSA, considerando que mecanismo de interação acontece pela formação de um aduto BSA-HgEt através da ligação da cisteína livre (Cis34) com o átomo de mercúrio, ocorrendo liberação de ATS. A distância do ATS para o resíduo de triptofano (Trp134) do aduto BSA-HgEt foi de 2,06 nm. Por fim, verificou-se que TM e EtHg⁺ induzem a aceleração da fibrilação da BSA em 42 e 122% em relação ao sistema modelo, indicando que TM causa danos a estrutura da proteína o que pode comprometer suas funções.

REFERÊNCIAS

- ABDELMAGID, S.A. et al. Comprehensive profiling of plasma fatty Acid concentrations in young healthy canadian adults. **Plos One**, v.10, p. 1-16, Fev., 2015.
- ALLISON, B. et al. Computational design of protein-small molecule interfaces. **Journal of structural biology**, v.185, p.193–202, Fev., 2014.
- ALMEIDA, I.T. et al. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. **Clinical Nutrition**, v. 21, p. 219-233, Jun., 2002.
- ARIGA, G.G. et al. Study of fluorescence interaction and conformational changes of bovine serum albumin with histamine H₁-receptor–drug epinastine hydrochloride by spectroscopic and time-resolved fluorescence methods. **Biopolymers**, v. 103, p. 646–657, Jul., 2015.
- BARNETT, J.P. et al. Allosteric modulation of zinc speciation by fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 5456–5464, Mai., 2013.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1767, p.1073–1101, Jun., 2007.
- BISHOP, M.L.; FODEY, E.P.; SCHOEFF, L.E. **Clinical Chemistry: principles, procedures, correlations**. 5.ed. Filadelfia. Lippincott Williams E Wilkins, 2005.
- BOLEL, P. et al. Modulation of accessibility of subdomain IB in the pH-dependent interaction of bovine serum albumin with cochineal red a: a combined view from spectroscopy and docking simulations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 4606-4613, Abr., 2013.
- CARTER, D.C.; HO, J.X. Structure of Serum Albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 153-203, 1994.
- CHAVES, O.A. et al. A Study of the interaction between trans-dehydrocrotonin, a bioactive natural 19-nor-clerodane, and serum Albumin. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.27, p. 1858-1865, Mar., 2016.
- CHEN, D. et al. Interaction and sonodynamic damage activity of acridine red (AD-R) to bovine serum albumin (BSA). **Journal of Luminescence**, v. 160, p. 245-253, Dez., 2015.
- CHENG, Z.; LIU, R.; JIANG, X. Spectroscopic studies on the interaction between tetrandrine and two serum albumins by chemometrics methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 92–105, Jun., 2013.
- CHUNMEI, D. et al. Study of the interaction between mercury (II) and bovine serum albumin by spectroscopic methods. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 37, p. 870–877, Jan., 2014.
- CONGDON, R.W.; MUTH, G.W.; SPLITTGERBER, A.G. The binding interaction of coomassie blue with proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 213, p. 407-413, Mai., 1993.

COX, M.M.; DOUDNA, J.A.; O'DONNELL, M. **Biologia molecular: princípios e técnicas**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

DONG, C.; MA, S.; LIU, Y. Studies of the interaction between demeclocycline and human serum albumin by multi-spectroscopic and molecular docking methods. **Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v.103, n.15, p.79–186, Fev., 2013.

DÓREA, J.G. Low-dose Thimerosal in pediatric vaccines: Adverse effects in perspective. **Environmental Research**, v. 152, p. 280-293, Out., 2017.

DÓREA, J.G. et al. Speciation of methyl- and ethyl-mercury in hair of breastfed infants acutely exposed to thimerosal-containing vaccines. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 1563-1566, Mai., 2011.

DORRAJI, M.S.S.; AZAR, V.P.; RASOULIFARD, M.H. Interaction between deferiprone and human serum albumin: Multi-spectroscopic, electrochemical and molecular docking methods. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, p. 9–17, Ago., 2014.

DU, X. et al. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 144-178, Jan., 2016.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, Nov., 1961.

FAN, Y. et al. Interaction of an amino-functionalized ionic liquid with enzymes: A fluorescence spectroscopy study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 105, p. 297–303, Dez., 2013.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, v. 29, p. 137-142, Set., 2006.

FIGUEIREDO, I.M. MARSAIOLI, A.J. Mapeamento das interações proteína-ligante através de técnicas de RMN de ¹H utilizando detecção do ligante. **Química Nova**, v. 7, p. 1597-1605, Ago., 2007.

FU, L. et al. Characterization of the interactions of human serum albumin (HSA), gatifloxacin, and metronidazole using spectroscopic and electrochemical methods. **Journal of Luminescence**, v.149 p. 208–214, Jan., 2014.

GARCIA, M. H. et al. New ruthenium(II) mixed metallocene derived complexes: Synthesis, characterization by X-ray diffraction and evaluation on DNA interaction by atomic force microscopy. **Inorganica Chimica Acta**, v. 363, p. 3765–3775, Jun., 2010.

GEIER, D. A. et al. Thimerosal: clinical, epidemiologic and biochemical studies. **Clinica Chimica Acta**, v. 444, p. 212-220, Fev., 2015.

GEIER, D. A., et al. A longitudinal cohort study of the relationship between thimerosal-containing hepatitis B vaccination and specific delays in development in the United States: Assessment of attributable risk and lifetime care costs. **Journal of Epidemiology**, v. 6, p. 105-118, Mar., 2016.

GEIER, D.A. et al. A two-phase study evaluating the relationship between thimerosal-containing vaccine administration and the risk for an autism spectrum disorder diagnosis in the United States. **Translational Neurodegeneration**, v. 2, p. 1-12, Dez., 2013.

GEIER, D.A.; KERN, J. K.; GEIER, M.R. Increased risk for an atypical autism diagnosis following Thimerosal-containing vaccine exposure in the United States: A prospective longitudinal case-control study in the Vaccine Safety Datalink. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.42, p.18–24, Mar., 2017.

GELAMO, E.L.; TABACK, M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 56, p. 2255-2271, Mai., 2000.

GERICKE, M.; DROOGMANS, G.; NILIUS, B. Thimerosal induced changes of intracellular calcium in human endothelial cells. **Cell Calcium**, v. 14, p. 201-207, Mar.,1993.

GLASER, C.; DEMMELMAIR, H.; KOLETZKO, B. High-throughput analysis of total plasma fatty acid composition with direct *in situ* transesterification. **Plos One**, v. 5, p. 1-6, Ago., 2010.

GLOSH, K.; RATHI, S.; ARORA, D. Fluorescence spectral studies on interaction of fluorescent probes with Bovine Serum Albumin (BSA). **Journal of Luminescence**, v. 175, p. 135–140, Jan., 2016.

GOLDMAN, G. Comparison of VAERS fetal-loss reports during three consecutive influenza seasons: Was there a synergistic fetal toxicity associated with the two-vaccine 2009/2010 season?. **Human and Experiment. Toxicology**, v.32, p. 464-475, Mai., 2013.

GONZALES-HORTA, A.; HERNANDES, B. G.; CHAVEZ-MONTEZ, A. Fluorescence as a Tool to Study Lipid-Protein Interactions: The Case of α -Synuclein. **Open Journal of Biophysics**, v. 3, p. 112-119, Fev., 2013.

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, p. 1400-1458, Mar., 2008.

GUAN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y. New insight into the binding interaction of hydroxylated carbon nanotubes with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 124, p. 556–563, Jan., 2014.

GUO, Y. et al. Counting sulfhydryls and disulfide bonds in peptides and proteins using mercurial ions as an MS-tag. **American Society for Mass Spectrometry**, v. 19, p. 1108-1113, Mai., 2008.

HARIS, P. Can infrared spectroscopy provide information on protein–protein interactions?. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, p. 940-946, Mai., 2010.

HE, W. et al. Effect of chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1837–1845, Nov., 2005.

- HEA, L. et al. Studies on the interaction between promethazine and human serum albumin in the presence of flavonoids by spectroscopic and molecular modeling techniques. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 820–829, Jun., 2016.
- HELD, et al. Mechanisms of Protein-Ligand Association and Its Modulation by Protein Mutations. **Biophysical Journal**, v.100, n.3, p.701-719, Fev., 2011.
- HELLMAN, L. M.; FRIED, G. M. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions. **National Institute of Health**, v. 8, p. 1849-1861, Out., 2009.
- HELMERHORST, E. et al. Real-time and Label-free Bio-sensing of Molecular Interactions by Surface Plasmon Resonance: A Laboratory Medicine Perspective. **Clinical Biochemistry Review**, v. 33, p. 161-173, Nov., 2012.
- HEMALATHA, K.; MADHUMITHA, G. Study of binding interaction between anthelmintic 2, 3-dihydroquinazolin-4-ones with bovine serum albumin by spectroscopic methods. **Journal of Luminescence**, v.178, p. 163–171, Mai., 2016.
- JANGIR, D. K. et al. Assessment of amsacrine binding with DNA using UV–visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Índia, v. 114, p.38–43, Mai., 2012.
- JAUMOT, J.; GARGALLO, R. Experimental Methods for Studying the Interactions between G-Quadruplex Structures and Ligands. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 1900-1916, 2012.
- JUARÉZ, J.; TABOADA, P.; MOSQUERA, V. Existence of different structural intermediates on the fibrillation pathway of human serum albumin. **Biophysical Journal**, v. 96, p. 2353-2370, Mar., 2009.
- KANDAGAL, P.B., et al. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach. **Journal of pharmaceutical and biomedical Analysis**, v.41, p.393–399, Maio, 2006.
- KENGNE-MOMO, R.P. et al. Protein Interactions Investigated by the Raman Spectroscopy for Biosensor Applications. **International Journal of Spectroscopy**, v. 2012, p. 1-7, Fev., 2012.
- KOBAYASHI, K. et al. Rapid and direct determination of selenium, copper, and zinc in blood plasma by flow injection–inductively coupled plasma–mass spectrometry. **Biological Trace Element Research**, v. 115, p. 87-93, Jun., 2006.
- KRUPP, E.M. et al. Investigation into mercury bound to biothiols: structural identification using ESI–ion-trap MS and introduction of a method for their HPLC separation with simultaneous detection by ICP-MS and ESI-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, p. 1753–1764, Fev., 2008.
- LEE, S. et al. Thimerosal induces oxidative stress in HeLa S epithelial cells. **Environmental Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 99, p. 25–34, abr., 2015.

LI, T. et al. Comparison of interactions between three food colorants and BSA. **Food Chemistry**, v. 194, p. 740-748, Ago., 2016.

LI, Y., et al. Human serum albumin-mercurial species interactions, journal proteome research. **Journal proteome research**, v.6, p. 2277-2286, Mai., 2007.

LIANG, J.; CHENG, Y.; HAN, H. Study on the interaction between bovine serum albumin and CdTe quantum dots with spectroscopic techniques. **Journal of Molecular Structure**, v. 892, p. 116–120, Mai., 2008.

LIU, X. et al. Comprehensive spectroscopic probing the interaction and conformation impairment of bovine serum albumin (BSA) by herbicide butachlor. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 162, p. 332–339, Jul., 2016.

LIU, Y. et al. Spectroscopic identification of interactions of Pb^{2+} with bovine serum albumin. **Journal of Fluorescence**, v. 22, p. 239–245, Ago., 2012.

LODISH, H. et al. **Biologia celular e molecular**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MADRAKIAN, T. et al. Spectroscopic and molecular docking techniques study of the interaction between oxymetholone and human serum albumin. **Journal of luminescence**, v.155, p. 218–225, Nov., 2014.

MAJOREKA, K.A. et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. **Molecular Immunology**, v. 52, p. 174-182, Mai. 2012.

MATULUS, D.; LOVRIEN, R. 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. **Biophysical Journal**, v. 74, p. 422-429, Jan. 1988.

MAZAHERI, M. et al. Curcumin Mitigates the Fibrillation of Human Serum Albumin and Diminishes the Formation of Reactive Oxygen Species. **Protein & Peptide Letters**, v. 22, p. 348-353, Abr., 2015.

MCLAUGHLIN, C. K.; HAMBLIN, G. D.; HAMBLIN, H. F. Supramolecular DNA assembly. **Chemical Society Review**, v. 40, p. 5647-5656, Set., 2016.

METI, M.D. et al. Chimatadar, multi-spectroscopic investigation of the binding interaction of fosfomicin with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, p. 249–255, Jan., 2015.

MÖLLER, M.; DENICOLAT, A. Study of protein-ligand binding by fluorescence. **Biochemistry and molecular biology education**, v. 30, p. 309-312, Set., 2002.

MORAES, C.S. et al. **Métodos experimentais no estudo de proteínas**. Rio de Janeiro: Instituto Osvaldo Cruz, 2013.

MUNISHKINA, L.A.; FINK, A. L. Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 1862-1885, Ago., 2007.

NATESAN, S. et al. Enoch, mode of encapsulation of linezolid by α -cyclodextrin and its role in bovine serum albumin binding. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 589–597, Set., 2015.

NI, Y.; WANG, S.; KOKOT, S. Spectrometric study of the interaction between alpinetin and bovine serum albumin using chemometrics approaches. **Analytica Chimica Acta**, v. 663, p. 139–146, Jan., 2010.

NI, Y.; ZHUB, R.; KOKOT, S. Competitive binding of small molecules with biopolymers: a fluorescence spectroscopy and chemometrics study of the interaction of aspirin and ibuprofen with BSA. **Analyst**, v. 136, p. 4794-4801, Agos., 2011.

NILSON, M.R. Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*. **Methods**, v. 34, p. 151–160, Jun., 2004.

PACE, C. N.; SCHOLTZ, J. M.; GRIMSLEY, G. R. Forces stabilizing proteins. **FEBS Letters**, v. 588, p. 2177–2184, Mai., 2014.

PANDEY, N.K.; GHOSH, S.; DASGUPTA, S. Fibrillation in human Serum albumin is enhanced in the presence of copper(II). **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 10228–10233, Jul., 2010.

PELLECCHIA, M. Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Techniques for Probing Intermolecular Interactions. **Chemistry and Biology**, vol. 12, p. 961–971, Set., 2005.

PIETERS, B. J. G. et al. Natural supramolecular protein assemblies. **Chemical Society Review**, v. 45, p. 24-39, Fev., 2015.

RANJBAR, S. et al. Studies of the interaction between isoimperatorin and human serum albumin by multispectroscopic method: identification of possible binding site of the compound using esterase activity of the protein. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-13, Set., 2013.

REEVES, B.D. et al. Selective trapping of SNO-BSA and GSNO by benzenesulfinic acid sodium salt: mechanistic study of thiosulfonate formation and feasibility as a protein S-nitrosothiol detection strategy. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 5707–5710, Ago., 2013.

REHMAN, S.U. et al. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.576, p.49-60, Mai., 2015.

ROONEY, J.P.K. The retention time of inorganic mercury in the brain — a systematic review of the evidence. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 274, p. 425–435, Dez., 2014.

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

- SAHA, A.; YAKOVLEV, V.V. Structural changes of human serum albumin in response to a low concentration of heavy ions. **Journal Biophotonics**, v. 3, p. 670-677, Out., 2010.
- SAHOO, H. Förster resonance energy transfer – A spectroscopic nanoruler: Principle and applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 12, p. 20–30, Mai., 2011.
- SALENTIN, S. et al. Polypharmacology rescored: Protein-ligand interaction profiles for remote binding site similarity assessment. **Progress in biophysics and molecular biology**, v.116, p.174-186, Nov.-Dez., 2014.
- SHEN, F.; HE, Y.; ZHOU, Y. Study of interaction of mercuric chloride with bovine serum albumin by multi-spectroscopic method. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, p. 5925-5929, abr., 2013.
- SILIGARDI, G. et al. Ligand- and drug-binding studies of membrane proteins revealed through circular dichroism spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1838, p.34–42, Jun., 2014.
- SILVA, Marina Magalhães. **Interação entre compostos biologicamente ativos e ctdna (calf thymus): uma abordagem espectroscópica**. 2016. Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.
- SLAVIK, J. Anilino-naphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 694, p. 1-25, Set., 1982.
- SMITH, P.E. Equilibrium Dialysis Data and the Relationships between Preferential Interaction Parameters for Biological Systems in Terms of Kirkwood–Buff Integrals. **Journal Physical Chemistry B**, v, 6, p. 2862–2868, 2006, Jan. 2006.
- SOTOMAYOR, M.D.P.T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, p. 1755-1774, Nov., 2008.
- SPAHIS, S. et al. Plasma fatty acid composition in french-canadian children with non-alcoholic fatty liver disease: Effect of n-3 PUFA supplementation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 99, p. 25–34, Abr., 2005.
- SRIDHARAN, R. et al. Fluorescent approaches for understanding interactions of ligands with G protein coupled receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1838, p. 15-33, Set., 2014.
- SUDLOW, G.; BIRKETT, D.J.; WADE, D.N. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular Pharmacology**, v. 12, p. 1052-1061, Jun., 1976.
- SUDLOW, G.; BIRKETT, D.J.; WADE, D.N. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular Pharmacology**, v. 11, p. 824-832, Jan., 1975.

SULKOWSKA, A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 614, p. 227-232, Jan., 2002.

SUN, W. et al. Voltammetric Studies on the Interaction of Orange G with Proteins. Analytical Applications. **Journal of the Brazilian chemical society**, v. 17, p. 510-517, Mar., 2006.

SURYAWANSHI, V.D. et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 56-63, Jun., 2016.

TENGA, Y. et al. The interaction between 4-aminoantipyrine and bovine serum albumin: Multiple spectroscopic and molecular docking investigations. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 574-581, Mar., 2011.

Thimerosal, National Toxicology Program, disponível em:
<https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/thimerosal_508>, acesso em 02 de agosto de 2016.

TIAN, F. et al. Synthesis of a novel hydrazone derivative and biophysical studies of its interactions with bovine serum albumin by spectroscopic, electrochemical, and molecular docking methods. **Journal of physical chemistry B**, v. 114, p. 14842-14853, Nov., 2010.

TINBERG, C. E. et al. Computational design of ligand-binding proteins with high affinity and selectivity. **Nature**, v. 501, p. 212-216, Set., 2013.

TONG, J.; WANG, Y.; LU, Y. *In vitro* evaluation of inorganic and methyl mercury mediated cytotoxic effect on neural cells derived from different animal species. **Journal of Environmental Sciences**, v. 41, p. 138-145, Abr, 2016.

TRÜMPLER, S. et al. Interaction of thimerosal with proteins-ethylmercury adduct formation of human serum albumin and b-lactoglobulin A. **Metallomics**, v. 87, p. 87-91, Nov., 2009.

TRÜMPLER, S. et al., *In vitro* study of thimerosal reactions in human whole blood and plasma surrogate samples. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, p. 125-130, Jan. 2014.

TURELL, L. et al. Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 305-311, Fev., 2009.

VELDHUIS, G. et al. Evaluation of the Flow-Dialysis Technique for Analysis of Protein-Ligand Interactions: An Experimental and a Monte Carlo Study. **Biophysical Journal**, v. 86, p. 1959-1968, Abr., 2004.

WANG, Y. et al. Exploring the interaction between picoplantin and human serum albumin: The effects on protein structure and activity. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 162, p. 611-618, Jul., 2016.

WANG, Y.; NI, Y. New insight into protein-nanomaterial interaction with UV-visible spectroscopy and chemometrics: human serum albumin and silver nanoparticles. **Analyst**, v. 139, p. 416-424, Out., 2014.

WANG, Y.; YONG, Y.; ERIE, D.A. **Biophysical Approaches for the study of complex reversible systems**. Maryland: Ed. P. Shuck, 2007.

WANG, Z. et al. Spectroscopic analyses on interaction of amantadine-salicylaldehyde, amantadine-5-chloro-salicylaldehyde and amantadine-o-vanillin schiff-bases with bovine serum albumin (BSA). **Spectrochimica Acta Part A**, v. 83, p. 511–517, Ago., 2011.

WU, G. et al. Interaction between Lipid Monolayers and Poloxamer 188: An X-Ray Reflectivity and Diffraction Study. **Biophysical Journal**, v. 89, p. 3159-3173, Nov., 2005.

YAN, Y. MARRIOT, G. Analysis of protein interactions using fluorescence Technologies. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 635-640, 2003.

YANG, G.X.; LI, X.; SNYDER, M. Investigating metabolite–protein interactions: An overview of available techniques. **Methods**, v. 57, p. 459-466, Ago., 2012.

YE, E. et al. Supramolecular soft biomaterials for biomedical applications. **Materials today**, v. 17, p. 194-202, Mai., 2014.

YEPSE, O. et al. Photocatalytic degradation of thimerosal in human vaccine's residues and mercury speciation of degradation by-products. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 41-47, Fev., 2015.

YOUNG, H.A.; GEIER, D.A.; GEIER, M.R. Thimerosal exposure in infants and neurodevelopmental disorders: An assessment of computerized medical records in the Vaccine Safety Datalink, **Journal of the Neurological Sciences**, v. 271, p. 110-118, Abr., 2008.

YUAN, T.; WELJIE, A.M.; VOGEL, H.J. Tryptophan fluorescence quenching by methionine and selenomethionine residues of calmodulin: orientation of peptide and protein binding. **Biochemistry**, v. 37, p. 3187-3195, Fev., 1998.

ZHANG, H.; ZOU, Y.; LIU, E. Biophysical influence of isocarbophos on bovine serum albumin: Spectroscopic probing. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 92, p. 283– 288, Fev., 2012.

ZHANG, J. et al. Study of the interaction between 5-sulfosalicylic acid and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. **Journal of Luminescence**, v. 134, p. 747–753, Jun., 2013.

ZHAO, B., et al. Spectroscopic studies of the interaction between hypocrellin B and human serum albumin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 2428–2432, Nov., 2006.

ZHAO, X. et al. The interaction between Ag⁺ and bovine serum albumin: A spectroscopic investigation. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 892–897, Nov., 2011.

ZUNSZAIN, P.A. et al. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IX α . **Journal of Molecular Biology**, v. 381, p. 394-406, Jun., 2008.