

UFAL

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

ESTUDOS BIOFÍSICOS DA INTERAÇÃO DO TÍMEROSAL, UM COMPOSTO ORGÂNICO DE MERCÚRIO, COM A CATALASE

AMANDA LUISE ALVES NASCIMENTO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

AMANDA LUISE ALVES NASCIMENTO

**ESTUDOS BIOFÍSICOS DA INTERAÇÃO DO TÍMEROSAL, UM
COMPOSTO ORGÂNICO DE MERCÚRIO, COM A CATALASE**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), para defesa de mestrado.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Maceió – AL
2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Lívia Silva dos Santos – CRB-4 – 1670

N244e Nascimento, Amanda Luise Alves.

Estudos biofísicos da interação do timerosal, um composto orgânico de mercúrio, com a catalase / Amanda Luise Alves Nascimento. – 2021.
87 f. : il.

Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia, Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 70-87

1. Enzima catalase. 2. mercúrio. 3. Timerosal. 4. Toxicidade – Timerosal. I. Título.

CDU: 544.1



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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação da mestranda intitulada: “*Estudos biofísicos da interação do timerosal, um composto orgânico de mercúrio, com a catalase*”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 28 de janeiro de 2021, às 09h, por meio de videoconferência.

Comissão Examinadora:

Dr. HEBERTY DI TARSO FERNANDES FACUNDO, UFCA

Examinador(a) Externo(a) à Instituição

Dr. JANAINA HEBERLE BORTOLUZZI, UFAL

Examinador(a) Interno(a)

Dr. JOSUÉ CARINHANHA CALDAS SANTOS, UFAL

Presidente (Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para concluir mais essa etapa. À minha família por acreditar em mim e por ser meu combustível diário, principalmente minha mãe Solange Alves e minha irmã Fernanda Alves, eu amo vocês incondicionalmente.

Agradeço à CAPES, CNPq, UFAL, IQB e PPGQB por todo investimento e condições ofertadas para realização desse projeto. Ao meu Orientador Josué Carinhanha por toda oportunidade de aprendizagem e desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao LINQA, representado em especial por algumas pessoas que foram fundamentais nessa etapa. E a todos os meus amigos, desde os amigos da infância, ensino médio, graduação, os que moram comigo e os conquistados ao longo da vida, sou muito grata por todos vocês e por todo apoio ofertado, especialmente Marina de Magalhães e Moisés de Carvalho.

RESUMO

A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante que atua no sistema de defesa, protegendo as células de efeitos tóxicos. A interação dessa enzima com qualquer espécie química externa poderá influenciar em sua atividade catalítica *in vivo*, trazendo como consequência diferentes efeitos, como, o estresse oxidativo. Dentre essas espécies destaca-se o mercúrio, cuja toxicidade humana varia de acordo com a forma química, a dose e a exposição, estando associado a uma série de doenças, inclusive no sistema nervoso central e funções psíquicas. Sendo assim, o presente trabalho buscou avaliar a interação entre a CAT e o timerosal (TM), um composto orgânico de mercúrio usado como conservante principalmente em vacinas, visando investigar possíveis alterações nessa enzima e, por conseguinte, mudanças no desempenho das suas funções fisiológicas. Este estudo foi monitorado por técnicas espectroscópicas avaliando diferentes parâmetros e ensaios *in vivo*. O processo de interação foi monitorado em função do decaimento da fluorescência intrínseca da catalase após a adição de TM ao meio, devido à formação do complexo supramolecular não fluorescente, com o tipo de *quenching* estático. O processo de interação foi espontâneo ($\Delta G < 0$) e as forças de interações preferenciais são as forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio ($\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$), havendo uma parcela de forças eletrostáticas envolvidas. A estequiometria do complexo formado foi 1:1 ($n \sim 1$), sendo que os valores de K_b indicam uma força de interação da ordem de 10^4 . Mudanças estruturais, de hidrofobicidade e ao redor dos resíduos de triptofano e tirosina da proteína foram evidenciadas por fluorescência 3D, ensaio com ANS e por fluorescência sincronizada respectivamente, indicando que houve alterações na estrutura secundária, preferencialmente nos resíduos de Triptofano. A influência de diferentes espécies, algumas presentes no plasma, durante a interação também foi avaliada. Bem como a influência de alterações oriundas da interação com o TM na atividade da CAT, por meio de estudos enzimáticos, verificando uma redução de cerca de 85% na ação dessa enzima, indicando influencia do TM na decomposição de H_2O_2 , concordante com o valor de IC_{50} (14,75 μM), pelo mecanismo de inibição mista, sendo um inibidor mais efetivo que o Hg(II). E de acordo com os ensaios *in vivo* o TM provoca alta letalidade em *drosophilas*, alterando o atividade da CAT nos machos dessa espécie e pode ser considerado teratogênico devido as alterações provocadas no *Zebrafish*. Logo esses resultados podem auxiliar na compreensão de possíveis efeitos relacionados à desordem causadas pelo timerosal em sistemas biológicos, em particular os efeitos quando associados a catalase.

Palavras-chave: Timerosal, catalase, mercúrio, interação proteína-ligante.

ABSTRACT

Catalase (CAT) is an antioxidant enzyme that acts in the defense system, protecting cells from toxic effects. The interaction of this enzyme with any external chemical species may influence its catalytic activity *in vivo*, bringing about different effects, such as oxidative stress. Among these species, mercury stands out, whose human toxicity varies according to chemical form, dose and exposure, being associated with a series of diseases, including in the central nervous system and psychic functions. Thus, the present study sought to evaluate the interaction between CAT and thimerosal (TM), an organic mercury compound used as a preservative mainly in vaccines, aiming to investigate possible changes in this enzyme and, therefore, changes in the performance of its physiological functions. This study was monitored by spectroscopic techniques evaluating different parameters and *in vivo* tests. The interaction process was monitored due to the decay of the intrinsic fluorescence of the catalase after the addition of TM to the medium, due to the formation of the non-fluorescent supramolecular complex, with the type of static quenching. The interaction process was spontaneous ($\Delta G < 0$) and the preferred interaction forces are the Van der Waals forces and hydrogen bonds ($\Delta H < 0$ and $\Delta S < 0$), with a portion of electrostatic forces involved. The stoichiometry of the complex formed was 1: 1 ($n \sim 1$), with K_b values indicating an interaction force of the order of 10^4 . Structural, hydrophobicity changes and around the tryptophan and tyrosine residues of the protein were evidenced by 3D fluorescence, ANS assay and synchronized fluorescence respectively, indicating that there were changes in the secondary structure, preferably in the tryptophan residues. The influence of different species, some present in the plasma, during the interaction was also evaluated. As well as the influence of changes arising from the interaction with TM on CAT activity, through enzymatic studies, verifying a reduction of about 85% in the action of this enzyme, indicating the influence of TM on the decomposition of H_2O_2 , in agreement with the value of IC_{50} ($14.75 \mu M$), due to the mixed inhibition mechanism, being a more effective inhibitor than $Hg(II)$. And according to *in vivo* tests, TM causes high lethality in *Drosophila*, altering the activity of CAT in males of this species and can be considered teratogenic due to the changes caused in Zebrafish. Therefore, these results can assist in the understanding of possible effects related to the disorder caused by thimerosal in biological systems, in particular the effects when associated with catalase.

Keywords: Thimerosal, catalase, mercury, protein-ligand interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura tridimensional da catalase bovina.....	15
Figura 2.	Esquema do desenvolvimento das moscas do tipo <i>Drosophila melanogaster</i> da fase embrionária até a adulta.....	26
Figura 3.	a) Curva de titulação da CAT (1 μ M) com TM (0 – 180 μ M); b) Linearização da curva em função da equação 1 (K_{SV} e K_q); c) Linearização da curva em função da equação 2 (K_b e n). Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	36
Figura 4.	Espectros obtidos no UV-vis. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	39
Figura 5.	Avaliação do efeito da força iônica na interação CAT-TM. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	42
Figura 6.	Espectros de contorno de fluorescência tridimensional da CAT, a) Na ausência de TM, b) Na presença de TM. [Cat]= 3 μ M, [TM]= 100 μ M. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	43
Figura 7.	Titulação empregando fluorescência sincronizada para os resíduos de: a) Tirosina e b) Triptofano, com adição de incrementos de TM (0 -1 80 μ M). Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	45
Figura 8.	Espectro de fluorescência do sistema CAT-ANS em diferentes concentrações de TM (0-180 μ M). Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	46
Figura 9.	Espectros de dicroísmo circular da CAT em diferentes concentrações de TM. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	48
Figura 10.	Raio hidrodinâmico da CAT. a) na presença TM (20 μ M); b) CAT in <i>natura</i> . Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	50
Figura 11.	Espectros de absorção de UV-vis da CAT na ausência e presença de TM. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	51
Figura 12.	Espectro de RMN 1 H do TM na presença de diferentes proporções de CAT. Expansão das diferentes regiões (a e b). Condições: 30°C e pH = 7,4 (Fosfato 10 mM).....	55
Figura 13.	Efeito de diferentes concentrações de TM na decomposição de H ₂ O ₂ pela CAT. a) Cinética de decomposição do peróxido; b) Atividade relativa. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	56
Figura 14.	Efeito das diferentes espécies de Hg na decomposição de H ₂ O ₂ pela CAT. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl)	57
Figura 15.	Gráfico Lineweaver-Burk para catalase. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	58
Figura 16.	Gráficos de avaliação da letalidade larval, pupal e de atrasos no desenvolvimento monitorados durante 13 dias consecutivos. a) Gráfico de pupação por dia; b) Pupação total; c) Mortalidade larval; d) Controle de adultos emergentes.....	63
Figura 17.	Resultados prévios da atividade da catalase em <i>Drosophilas</i> sob 48 h de exposição. a) Na fase larval; b) Machos na fase adulta.....	64
Figura 18.	Visão geral dos efeitos cumulativos do timerosal em embriões e larvas de peixe-zebra após 96 h de exposição. Sem efeito: características morfológicas semelhantes aos organismos de controle; Efeito não letal: presença de endpoints subletais; Mortalidade: presença de desfechos de letalidade.....	65

- Figura 19.** Efeitos letais e não letais observados em embriões e larvas de ZF após exposição a concentrações crescentes de TM. (a), (b) e (c) Organismos controle com desenvolvimento normal após 24, 72 e 96 h expostos apenas ao meio E3; (d) embrião coagulado com 24 h de idade exposto a 0,05 μM de TM; (e) embrião de 24 h com malformação ocular e otólita (em e om, respectivamente) exposto a 0,2 μM ; (f) embrião de 72 h com edema pericárdico (ep) exposto a 0,05 μM ; e (g) embrião de 96 h com atraso de incubação exposto a 0,1 μM 66
- Figura 20.** Atividades de GST, AChE e LDH (valor médio \pm desvio padrão) em larvas de ZF após 96 h de exposição ao TM. a, b, c Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (ANOVA seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05$)..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais informações, vantagens e desvantagens associadas às estratégias utilizadas nesse estudo para avaliação da interação proteína-ligante	22
Tabela 2.	Parâmetros de ligação e termodinâmicos referentes ao processo de interação entre CAT e TM simulando condições fisiológicas.....	38
Tabela 3.	Informações associadas aos espectros de fluorescência 3D da CAT livre e complexada	44
Tabela 4.	Alterações na estrutura secundária da CAT na ausência e presença de diferentes concentrações de TM.....	49
Tabela 5.	Parâmetros de FRET obtidos da sobreposição espectral entre o doador e receptor em diferentes proporções, onde $K^2 = 2/3$, $n = 1,36$ e $\Phi = 0,15$. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	53
Tabela 6.	Avaliação da influência de diferentes espécies na constante de ligação do complexo. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).....	54
Tabela 7.	Comparação da interação de diferentes ligantes com a catalase simulando condições fisiológicas	60

LISTA DE ABREVIATURA e SIGLAS

3D – Tridimensional

A – Absorvância

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

BSA – Bovine Serum Albumin

°C – Graus Celsius

CAT – Catalase

Cis – Cisteína

F – Fluorescência

F₀ – Fluorescência na ausência do ligante

FRET – Transferência de energia por ressonância de fluorescência

GSTs – Glutadionas transferases

HPV – Vírus do papiloma humano

HSA – Human Serum Albumin

K_b – Constante de ligação

K_{SV} – Constante de Stern-Volmer

MHz – Megahertz

M – Molar

NHANES – National Health and Nutrition Examination Survey

n – Número de sítios de ligação

nm – Nanômetros

pH – Potencial hidrogeniônico

pKa – Constante de dissociação

RMN 1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

T – Temperatura

Tir – Tirosina

TM – Timerosal

TMSP- Trimetilsililpropionato de sódio

Trp – Triptofano

UV– Ultravioleta

UV–vis – Ultravioleta-visível

VSD – Vaccine Safety Datalink

Δδ – Deslocamento químico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
1.1	Aspectos físico-químicos e toxicológicos relacionados ao timerosal. ..	10
1.2	Funções, estrutura e interações das proteínas: Um enfoque supramolecular	12
1.2.1	Catalase.....	14
1.3	Interação entre espécies de mercúrio com proteínas e sua relevância na saúde humana	16
1.4	Técnicas espectroscópicas empregadas nos estudos biofísicos de interação macromolécula-ligante	19
1.4.1	Espectroscopia de fluorescência molecular.....	19
1.4.2	Espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-vis).....	20
1.4.3	Dicroísmo circular (DC)	20
1.4.4	Dispersão dinâmica de luz (DLS)	21
1.4.5	1.4.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)	21
1.5	Ensaio <i>in vivo</i> para avaliação de toxicidade	24
1.5.1	Modelo empregando <i>Danio rerio</i> (<i>zebrafish</i>)	24
1.5.2	Modelo empregando <i>Drosophila melanogaster</i>	
2.	JUSTIFICATIVA	27
2.1	Importância para a sociedade	27
3.	OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4.	EXPERIMENTAL	29
4.1	Reagentes e soluções	29
4.2	Procedimentos	29
4.2.1	Espectroscopia de fluorescência molecular para os estudos de interação CAT e TM	29
4.2.2.1	<i>Estudos de interação CAT e TM</i>	30
4.2.2.2	<i>Inibição enzimática da CAT induzida pelo TM</i>	30
4.2.3	Dicroísmo circular (DC)	31
4.2.4	Análise de dispersão dinâmica de luz (DLS)	31
4.2.5	Ressonância Magnética Nuclear (RMN 1H)	31
4.2.6	Ensaio de toxicidade <i>in vivo</i>	32
4.2.6.1	<i>Modelo empregando Zebrafish (ZF)</i>	32

4.2.6.2	Modelo empregando <i>Drosophila melanogaster</i>	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	Parâmetros de ligação e mecanismo de interação	35
5.2	Alterações conformacionais	42
5.2.1	Fluorescência tridimensional na avaliação do processo de interação CAT-TM	43
5.2.2	Fluorescência sincronizada na avaliação do processo de interação CAT-TM	44
5.2.3	Avaliação da hidrofobicidade superficial da CAT	46
5.2.4	Dicroísmo circular da CAT no processo de interação com TM	47
5.2.5	A Análise de dispersão dinâmica da luz (DLS) da CAT no processo de interação com TM	49
5.2.6	Espectroscopia de absorção no UV-vis	50
5.3	Transferência de energia por ressonância de Förster (FRET)	52
5.4	Avaliação de diferentes espécies no processo de interação	53
5.5	Ressonância magnética nuclear (RMN)	54
5.6	Estudos cinéticos de inibição da CAT frente ao TM	56
5.7	Estudos preliminares de toxicidade do TM in vivo	62
5.7.1	Modelo empregando <i>Drosophila melanogaster</i>	62
5.7.2	Modelo empregando ZF	65
6.	CONCLUSÕES	68
6.1	PERSPECTIVAS	69
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

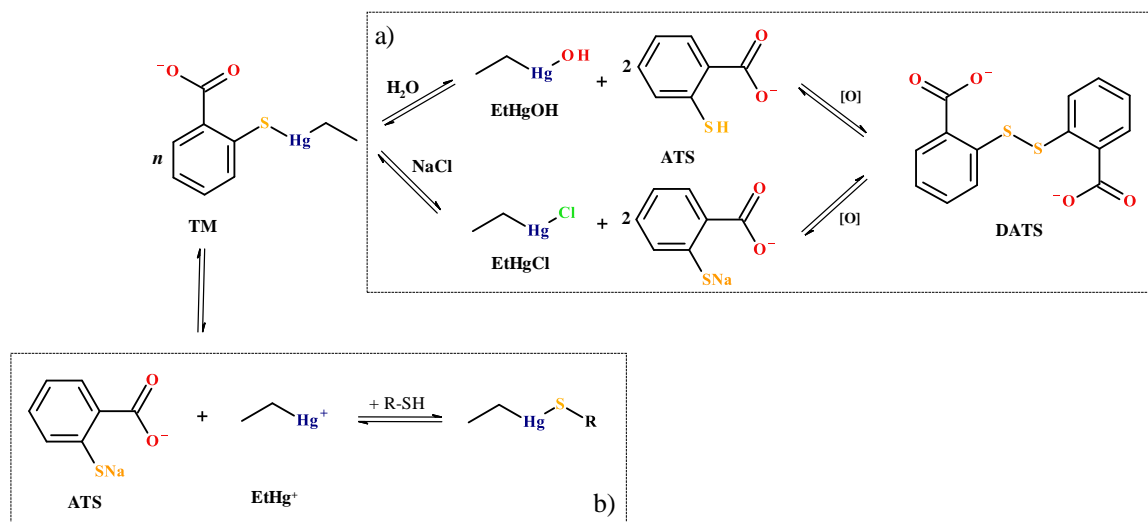
1.1 Aspectos físico-químicos e toxicológicos relacionados ao timerosal

O timerosal (TM, etil(2-mercaptopbenzoato-(2-)-O,S) mercurato de sódio) é um composto orgânico que contém 49,55% de mercúrio em massa, podendo ser decomposto em soluções salinas aquosas levando a formação de hidróxido de etilmercúrio e cloreto de etilmercúrio, além de compostos derivados do ácido tiosalicílico, como o seu produto de oxidação, o ácido ditiosalicílico (DATS) (Esquema 1a). Compostos de mercúrio (Hg) tais como o cloreto de mercúrio (HgCl_2), são empregados como desinfetantes, uma vez que são úteis para matar bactérias e outros microrganismos (GEIER et al., 2015; BAKER, 2008). Desenvolvido em 1927 pela Eli Lilly & Company (EUA), o TM continua sendo a forma química mais utilizada de mercúrio orgânico, que por sua vez é empregado como conservante em cosméticos, produtos farmacêuticos e produtos biológicos como vacinas, devido as suas propriedades antifúngicas e bactericidas (GEIER et al., 2013; DÓREA, 2011).

Em meio biológico o TM libera o ácido tiosalicílico (ATS) e o etilmercúrio (EtHg^+) (Esquema 1b), o qual é uma neurotoxina que apresenta forte afinidade por enxofre reduzido (grupos tióis) presente em biomoléculas, assim uma vez no organismo espécies de mercúrio se ligam as enzimas, proteínas, DNA, membranas, entre outras, e alteram as funções desenvolvidas por estas, além disso, quando presentes nos tecidos tendem a ser bioacumuladas, principalmente no cérebro (STROHMIDEL; SPERLING; KARST, 2018). Decorrente a esse fato todas as espécies de Hg são tóxicas para a fisiologia humana, no entanto, as formas orgânicas são as que apresentam maiores riscos à saúde (KERN et al., 2013).

Assim, em virtude da utilização deste conservante nos frascos multidoses de algumas vacinas, tais como Hepatite B, H1N1, tríplice viral e gripe sazonal, quase todos os humanos imunizados com estas são expostos ao seu metabólito, etilmercúrio (EtHg^+), que possui toxicidade *in vitro* comparável à da espécie mais tóxica de mercúrio, o metilmercúrio (MeHg^+), no entanto com menor tempo de permanência no sangue, que não implica necessariamente na redução do fator de risco (DÓREA, 2017b).

Esquema 1. Estrutura e reações do timerosal. a) Decomposição do TM em soluções salinas aquosas com formação de ácido tiosalicílico (ATS), hidróxido de etilmercúrio, cloreto de etilmercúrio e ácido ditiosalicílico (DATS); b) Equilíbrio do TM em meio aquoso levando a formação de ATS e EtHg^+ e subsequente reação do EtHg^+ com grupos tióis livres.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

Neste sentido, questionamentos foram levantados ao longo dos anos em relação à utilização, segurança e toxicidade do TM, devido à quantidade de vacinas que o continham em sua composição, inclusive as vacinas utilizadas em crianças e gestantes, sendo as crianças o grupo mais exposto principalmente nos seus primeiros 6 meses de vida (DÓREA, 2017a). A União Europeia e alguns países baniram as vacinas contendo o TM devido às suspeitas de seus efeitos neurotóxicos (GEIER; KERN; GEIER, 2018), além de alguns efeitos biológicos sobre a respiração mitocondrial e função de algumas células e problemas referentes ao seu potencial antibacteriano e antimicrobiano (DÓREA; FARINA; ROCHA, 2013; STAMOGIANNOS et al., 2016).

No entanto este conservante continua sendo utilizado nos países menos desenvolvidos, pois permite o uso de frascos multidoses, que reduzem o custo e demanda das vacinas (ORENSTEIN et al., 2013), que são a principal intervenção na prevenção, controle e erradicação de doenças infecciosas (DÓREA, 2018). Durante os períodos iniciais do desenvolvimento humano, o cérebro é o órgão mais vulnerável aos efeitos toxicológicos, uma vez que a sensibilidade cerebral precoce pode resultar em diferentes efeitos neurológicos causados pelas espécies de mercúrio (MARQUES et al., 2016).

Kern e colaboradores (2013) fizeram um levantamento sobre a possível relação entre o desenvolvimento do autismo e o uso de vacinas contendo o TM. Neste estudo

foi observado que as crianças que eram diagnosticadas com o transtorno do espectro do autismo (TEA) apresentavam uma química de sulfatação anormal, baixa disponibilidade de tiol e restrição na reserva de glutatona (GSH), desta forma a capacidade de desintoxicação por sistemas redox era reduzida, aumentando a vulnerabilidade do cérebro as espécies de mercúrio. Estudos mais recentes realizado por Geier et al. (2017), evidenciaram uma relação significativa entre distúrbios de emoções específicas em crianças e adolescentes e exposição ao TM, por meio de um controle de informações do banco de Vaccine Safety Datalink (VSD). Em outro estudo desenvolvido pelo mesmo grupo no ano seguinte Geier et al. (2018) foi evidenciado a relação entre a exposição infantil à vacina contra a hepatite B e o aumento nos transtornos de déficit de atenção/hiperatividade, por meio da análise do banco de dados do National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES).

Ainda assim, em muitos países, o TM continua sendo considerado seguro nas quantidades empregadas nas vacinas (25 a 50 µg por dose) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) trata o EtHg⁺ como uma espécie que não oferece riscos à saúde, assegurando que diferentemente do metilmercúrio, ele é decomposto rapidamente pelo organismo e não se acumula. Contudo, conforme os relatos literários isso pode ser considerado um problema de saúde pública nos programas de imunização (LEE et al., 2018; GEIER et al., 2013; DÓREA, 2018).

Desta forma, estudos avaliando os efeitos deletérios associados às espécies de mercúrio na saúde humana têm sido frequentemente realizados, empregando diferentes sistemas modelos, como reportado por Chen e colaboradores (2019) que avaliaram os efeitos sobre a antigenicidade e imunogenicidade das partículas semelhantes a do vírus do papiloma humano (HPV) na presença de timerosal utilizando como modelos ratos para os ensaios *in vivo* e proteínas para os *in vitro*. As proteínas, bem como outras biomoléculas são frequentemente utilizadas como sistema modelo para auxiliar na compreensão do funcionamento do organismo, visto que estas desempenham funções vitais em diferentes processos biológicos.

1.2 Funções, estrutura e interações das proteínas: Um enfoque supramolecular

As proteínas são as macromoléculas biológicas mais importantes uma vez que estão envolvidas em todos os processos fundamentais a vida (PIETERS et al., 2016). Desempenham distintas funções, desde a transcrição e tradução à ação catalítica, regulação, imunoproteção, transporte, integridade estrutural, armazenamento, entre

outras que são cruciais para o funcionamento do organismo (AUSLÄNDER; AUSLÄNDER; FUSSENEGGER, 2017). A estrutura das proteínas é constituída por uma sequência primária de aminoácidos que determina em grande parte a estrutura tridimensional terciária. No entanto, a maioria das proteínas caracterizadas são organizadas em estruturas quaternárias, formando conjuntos homo-oligoméricos ou hetero-oligoméricos, isto é, proteínas produzidas por cadeias polipeptídicas iguais ou diferentes, respectivamente (OVCHINNIKOV et al., 2015; NELSON; COX, 2014).

Algumas proteínas atuam como enzimas, as quais são as responsáveis por catalisar a maioria das reações biológicas, acelerando a velocidade destas, sem alterá-las, sendo, portanto, fundamentais para qualquer processo bioquímico, visto que muitos deles não ocorreriam com velocidade útil sem a ação catalítica (NELSON; COX, 2014). As enzimas auxiliam nesses processos fornecendo uma região altamente específica ao substrato, denominada sítio ativo, tornando mais energeticamente favorável a reação. A atividade catalítica das enzimas está relacionada à sua conformação proteica nativa, e pode ser comprometida caso haja um processo de alteração conformacional, desnaturação ou dissociação em seus aminoácidos constituintes (COPELAND, 2004).

Essencialmente, as proteínas, assim como as demais estruturas biológicas, são comumente constituídas de aglomerados formados por moléculas e íons metálicos unidos por interações não-covalentes fracas, que são de extrema importância para compreender os processos biológicos (DU et al., 2016). Tais interações são estudadas pela Química Supramolecular, que foi definida por Jean Marie Lehn como “a química além da molécula”, auxiliando na compreensão além das ligações covalentes. Esse ramo interdisciplinar abrange sistemas formados entre moléculas mantidas por meio de interações não-covalentes sendo essas do tipo: eletrostáticas, hidrofóbicas, ligações dissulfeto (pontes de sulfeto), forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Assim, devido à capacidade dessas espécies supramoleculares se recombinarem reversivelmente devido ao caráter dinâmico dessas interações, é de grande utilidade conceitos como reconhecimento molecular e conceitos de automontagem (LEHN, 2007; RESNATI et al., 2015).

Sendo assim, o mecanismo de ligação/interação dessas macromoléculas com compostos biologicamente ativos é de grande relevância para a compreensão da biodisponibilidade e metabolismo desses compostos no sistema circulatório, decorrente da formação de complexos estáveis resultantes da afinidade entre a macromolécula e a espécie avaliada (ZAMAN et al., 2017). Em recente estudo, Shamsi e colaboradores

(2020) avaliaram a influência da interação do tartarato de Rivastigmina, um medicamento utilizado em pacientes com Alzheimer, empregando a albumina sérica bovina (BSA) estruturalmente similar a albumina sérica humana (HSA), que é uma das principais proteínas do soro envolvidas no transporte de drogas. Neste estudo eles observaram a formação de um complexo estável que auxilia na compreensão das propriedades desse fármaco frente à macromolécula, bem como as alterações conformacionais sofridas pela mesma.

Destaca-se que muitas das moléculas bioativas exercem seu efeito biológico por meio das interações enzimáticas, como citado por Nile e colaboradores (2018) em um estudo onde ele avaliou os principais fatores que podem interferir nas respostas de algumas moléculas bioativas. Logo, as enzimas tornam-se importantes ferramentas para entender como seu funcionamento está associado a ação de compostos bioativos assim como, na ocorrência de algumas patologias, visto que uma deficiência, ausência total ou até mesmo excesso de atividade enzimática, pode ocasionar condições anormais ao organismo (MANACH et al., 2017).

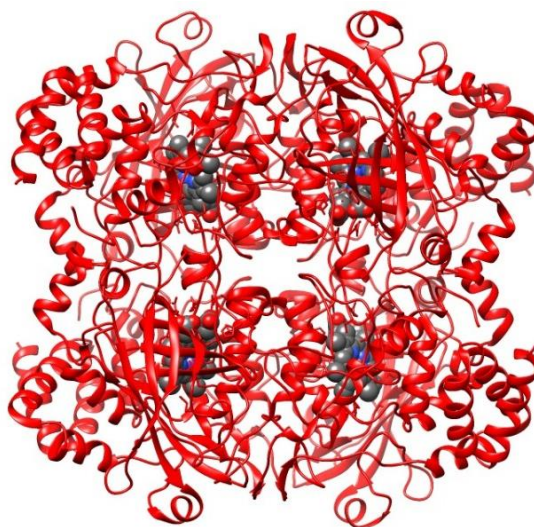
A relevância de estudos como esses decorrem do fato de que as propriedades farmacológicas e farmacocinéticas dos compostos bioativos dependem da sua interação com essas macromoléculas, que por desempenharem funções vitais são empregadas como sistema modelo para entender o funcionamento do organismo, bem como elucidar a relação com os riscos à saúde humana, auxiliando no diagnóstico de doenças (BRIGUGLIO et al., 2018; NILE et al., 2018). Pois, essas biomoléculas interagirem com diferentes espécies formando complexos supramoleculares, os quais possuem uma estrutura mais ordenada que a dos seus componentes originais, mantidos por meio das interações intermoleculares entre o ligante e o sítio de ligação da enzima, por exemplo (TUOVEROV; KUZNETSOVA; UVERSKY, 2010), podendo auxiliar na compreensão dos efeitos causados em sistemas biológicos por essas substâncias externas.

1.2.1 Catalase

A catalase (CAT), representada na Fig. 1, é uma enzima antioxidante de grande relevância que atua no sistema de defesa, é altamente ativa e encontrada em quase todos os organismos vivos (ZAMAN et al., 2017). Sua estrutura consiste em um tetrâmero (M = 240.000 Da) que contém quatro subunidades idênticas. Cada subunidade é composta

por mais de 500 aminoácidos, além da presença de um anel de porfirínico heme no sítio ativo (HAO et al., 2015).

Figura 1. Estrutura tridimensional da catalase bovina.



Fonte: elaborado por Camila Nunes (PPGQB, UFAL) de acordo com PDB 1TGU, 2020.

Existem relatos recentes de que a CAT é um importante indicador em uma variedade de estados patológicos como diabetes, vitiligo, doenças do trato urinário, neurodegenerativas, cardiovasculares, envelhecimento e câncer, muito desses originados pelo estresse oxidativo (NANDI et al., 2019).

Em geral, o estresse oxidativo é consequência do desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, em virtude da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio ou déficit na velocidade de remoção dessas (BURTON; JAUNIAUX, 2011). As formas mais conhecidas e estudadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem gerar o radical hidroxila (HO^{\bullet}), o qual é altamente reativo e apesar de desempenhar funções fundamentais em processos biológicos, apresenta efeitos deletérios sobre os componentes celulares (BARBOSA et al., 2010). Essa condição conduz à oxidação de biomoléculas ocasionando perda das suas funções biológicas como também desequilíbrio homeostático, resultando no dano oxidativo potencial contra células e tecidos (RIBEIRO et al., 2015).

A atividade da CAT é observada principalmente no fígado, eritrócitos e rim, sendo detectada também no tecido conjuntivo, pâncreas e soro, sendo a principal responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio molecular e água ($2H_2O_{2(l)} \rightarrow O_{2(g)} + 2H_2O_{(l)}$), protegendo as células de efeitos tóxicos,

como por exemplo, o estresse oxidativo, quando se observa elevadas concentrações de H_2O_2 , que é essencial para a sinalização celular normal, no entanto em quantidades excessivas pode ocasionar em danos oxidativos a diferentes biomoléculas (WANG; CAO; MENG, 2015; KUMAR et al., 2016).

O acúmulo de H_2O_2 nos tecidos *in vivo* pode resultar da diminuição da atividade catalítica da CAT (WANG et al., 2017), que deriva principalmente da influência de diferentes espécies presentes no organismo que podem alterar o desempenho das suas funções, sendo nomeadas inibidores quando essa interferência ocasiona redução na atividade enzimática (ZHANG et al., 2015). Um inibidor pode interagir com uma enzima e diminuir sua atividade de maneiras distintas, dentre elas a inibição competitiva, não competitiva e mista. Na inibição competitiva, o inibidor e o substrato competem pelo mesmo sítio ativo. Na inibição não competitiva, o inibidor se liga apenas ao complexo enzima-substrato e impede a conversão em produto. No último caso, o inibidor se liga tanto a enzima como ao complexo (NAIK; CHIMATADAR; NANDIBEWOOR, 2010; YANG et al., 2013).

Em estudos recentes avaliou-se o comportamento da CAT por meio de análises espectroscópicas frente a diferentes compostos bioativos, observando os três tipos de inibição citados anteriormente, como o trabalho reportado por Moradi e colaboradores (2015) onde foi observado que o deferasirox (quelante de íons ferro) usado no tratamento da sobrecarga transfusional de ferro, inibia competitivamente a atividade da CAT. A inibição não competitiva foi relatada por Rashtbari e colaboradores (2017b), na interação entre a CAT e o resveratrol, que apresenta diferentes efeitos benéficos, como exemplo a inibição do crescimento e a proliferação de células cancerígenas. Enquanto Yekta et al., (2017) relatou a inibição mista no complexo formado entre a enzima e a pioglitazona que é um medicamento utilizado no tratamento de diabetes. Todos esses estudos observam alterações tanto na estrutura quanto na atividade da CAT.

O estudo dos efeitos colaterais de compostos bioativos e espécies externas sobre enzimas é uma questão importante para monitorar as alterações conformacionais e funcionais. Desta forma, a catalase é um alvo biológico relevante para diferentes estudos, pois como relatado, muitas doenças estão relacionadas ao seu mau funcionamento e regulação (GÖNENÇA et al., 2012). Dentre essas espécies destaca-se o mercúrio, cuja toxicidade varia de acordo com a forma química (espécie), dose e grau de exposição, uma vez que, uma série de doenças, inclusive transtornos do sistema nervoso central, podem estar associadas à essa exposição a este metal (PIRES, 2018).

1.3 Interação entre espécies de mercúrio com proteínas e sua relevância na saúde humana

Estudos avaliando a interação e reação das diferentes espécies de mercúrio com biomoléculas vêm se intensificando cada vez mais, visto que dentre os metais tóxicos não radioativos, o mercúrio é o que apresenta maiores níveis toxicológicos considerando seus efeitos em células fetais e neuronais humanas (KERN et al., 2013). Li e colaboradores (2018a) realizaram um estudo recente baseando-se na cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, onde caracterizou 38 proteínas de ligação a mercúrio em células de neuroblastoma humano. Li et al. (2018b) avaliaram possíveis proteínas alvo para ligação e transporte de mercúrio no plasma por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, as proteínas foram caracterizadas por eletroforese acoplada à espectrometria de massa indutivamente acoplada.

Hogeback e colaboradores (2016) avaliaram a interação de diferentes espécies de mercúrio com anidrase carbônica humana por meio de experimentos de incubação em condições fisiológicas, além do enriquecimento do sangue humano com metilmercúrio após a hemólise, empregando análises cromatográficas e espectrometria de massa. Observou-se a formação de adutos entre a hemoglobina e as espécies de Hg, além da caracterização da ligação do mercúrio com a enzima avaliada. Posteriormente Ahmad e colaboradores (2019) analisaram o efeito do HgCl_2 nos eritrócitos humanos *in vitro*, evidenciando alteração dos níveis de oxidação proteica e oxidação do ferro da hemoglobina, gerando a metahemoglobina, a qual é inativa no transporte de oxigênio, inferindo que o HgCl_2 induz ao estresse oxidativo e nitrosativo, oxida a hemoglobina, além de prejudicar o sistema de defesa antioxidante e alterar as vias metabólicas nos eritrócitos humanos. Toyama e colaboradores (2020) por sua vez verificaram que a proteína homeobox B13, encontrada em genes envolvidos na regulação de padrões de desenvolvimento físico, está relacionada ao aperfeiçoamento da toxicidade do metilmercúrio, confirmado em células-tronco neuronais de camundongos. Estudos como esses são importantes para esclarecer os mecanismos de toxicidade do mercúrio.

Embora os efeitos das diferentes espécies de mercúrio tenham sido muito estudados, pouco se sabe sobre os efeitos do TM em sistemas biológicos. Trumpler e colaboradores (2009) avaliaram as reações do TM com os tióis livres das proteínas β -lactoglobulina A (β -LGA) e albumina sérica humana (HSA) por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, onde observaram, formação de adutos de EtHg^+ com as respectivas proteínas e que cerca de 80% do EtHg^+ pode estar sendo

transportado para os glóbulos vermelhos. Em estudo mais recente Trumpler et al. (2014) identificou desta vez a formação de adutos de EtHg⁺ com glutatona e cisteína, analisando o plasma sanguíneo humano enriquecido com TM, apresentando também a distribuição de diferentes espécies de mercúrio entre frações do sangue total humano. Zieminska e colaboradores (2010) por sua vez examinaram se a presença de diferentes proteínas e aminoácidos influenciavam nas alterações neurotoxicológicas induzidas por TM, demonstrando que o meio contendo soro ou albumina sérica, assim como, substâncias de baixo peso molecular contendo grupos tióis livres, apresentam capacidade protetora relativa aos neurônios quanto a toxicidade desse composto de Hg.

Recentemente Pantaleão et al. (2017) elucidou com ensaios *in vivo* realizados em ratos o efeito do TM no metabolismo periférico dos hormônios tireoidianos, com foco no sistema nervoso central, onde observou que alguns destes hormônios avaliados foram alterados devido à presença deste composto de mercúrio. Adicionalmente, Bianchini e colaboradores (2019) empregaram a mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) como modelo *in vivo* para investigar os mecanismos da neurotoxicidade causados pela exposição ao TM, monitorando os níveis de dopamina, que sofreram alterações na presença da espécie de mercúrio. Além disso, outros diversos parâmetros foram investigados para avaliar o efeito do TM e demais espécies de mercúrio quanto a alterações bioquímicas e fisiológicas associadas à sua exposição.

No entanto há uma escassez de relatos que avaliem os efeitos sofridos pelas biomoléculas após interagirem com essas espécies, podendo acarretar na redução ou perda da sua funcionalidade. Desta forma, em estudo recente Santos e colaboradores (2018) confirmaram a existência de alterações conformacionais na BSA durante o processo de interação com o TM mediante o uso de técnicas espectroscópicas, onde foi verificado que ocorre reação entre o TM e um resíduo de cisteína com consequente formação de aduto e liberação do ácido tiosalicílico. Além disso, a toxicidade desse composto em sistemas biológicos foi confirmada por meio de um aumento na cinética da fibrilação proteica. Silva e colaboradores (2020) por sua vez, avaliaram a existência de reação entre o TM e a hemoglobina, que é a principal componente dos glóbulos vermelhos, e de acordo com os dados obtidos foi observado uma redução na capacidade da proteína se ligar ao O₂, provocando uma possível redução da sua funcionalidade.

Diante do exposto fica evidente a necessidade de mais estudos que avaliem as possíveis alterações sofridas pelas macromoléculas biológicas em decorrência do processo de interação/reação com espécies de mercúrio, uma vez que, as funções

biológicas no organismo podem ser comprometidas, ocasionando em efeitos deletérios à saúde humana. A interação entre (bio)macromoléculas e pequenas moléculas como compostos com atividade biológica, tem atraído o interesse da comunidade científica, devido sua presença em praticamente todos os processos nos organismos vivos. De modo geral, muitas pesquisas foram centradas em duas questões principais sobre proteínas: quais são os fatores que interferem na organização da estrutura e qual consequência disto na atividade biológica (BECKER et al., 2018; NAIK; CHIMATADAR; NANDIBEWOR, 2010; LI et al., 2011).

Desta forma, buscando avaliar os diferentes processos de interações que ocorrem no complexo macromolécula-ligante utilizam-se diferentes técnicas. Existem muitas técnicas que possibilitam monitorar a interação entre as espécies (MOCZ & ROSS, 2013). O presente estudo selecionou diferentes técnicas espectroscópicas, capazes de avaliar qualitativamente e quantitativamente o processo de interação macromolécula-ligante (SIRAJUDDIN et al., 2013) as quais são: a espectroscopia de fluorescência molecular, espectroscopia de absorção no UV-vis, dicroísmo circular, dispersão dinâmica de luz e ressonância magnética nuclear.

1.4 Técnicas espectroscópicas empregadas nos estudos biofísicos de interação macromolécula-ligante

1.4.1 Espectroscopia de fluorescência molecular

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica que se destaca devido ao seu custo-benefício, quantidade de amostras processadas e de informações fornecidas, entre outras vantagens. É amplamente utilizada para o estudo da reatividade de sistemas químicos e biológicos, uma vez que possui uma elevada sensibilidade, seletividade e ampla faixa de concentração linear (Rashtbari et al., 2017). O fenômeno de fluorescência decorre do processo em que o elétron de uma molécula que absorveu energia é excitado para um nível energeticamente mais alto e ao retornar para o estado fundamental, a energia absorvida é liberada em um comprimento de onda diferente do utilizado no processo de excitação. Desta forma, os comprimentos de onda de excitação e emissão nos quais esse fenômeno ocorre são característicos de estruturas moleculares específicas. Compostos orgânicos que absorvem energia são denominados cromóforos, enquanto os que (re)emitem são fluoróforos (FELLMAN; HOOD; SPENCER, 2010).

Essas medidas podem fornecer informações da ligação de diferentes moléculas, principalmente proteínas, no que se refere a mecanismos, modos e constantes de

ligação, como também distâncias intermoleculares, entre outros. A fluorescência intrínseca das proteínas, decorrente principalmente dos resíduos de aminoácidos presentes, pode fornecer subsídios referentes à sua estrutura e dinâmica molecular, sendo utilizada para estudar seu comportamento frente às reações/interações com moléculas pequenas (HE et al., 2014; LU et al., 2010).

1.4.2 Espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-vis)

A técnica de espectroscopia de absorção de UV-vis é utilizada para explorar as mudanças estruturais da proteína e investigar a formação do complexo proteína-ligante no estado estacionário, devido a sua eficácia e simplicidade (HE et al., 2014). Alterações na região UV distante (10 a 200 nm) e proximidades correspondem respectivamente à estrutura secundária e terciária. Nas proteínas, vários grupos cromóforos dão origem às bandas de absorção, dentre eles os aminoácidos aromáticos, como triptofano, tirosina e fenilalanina, que contribuem para bandas na faixa de 255 a 300 nm, sendo possível obter diferentes parâmetros por meio do perfil e intensidade dos espectros (CHATURVEDI et al., 2015; JING; BOWSER, 2011).

1.4.3 Dicroísmo circular (DC)

A espectroscopia de DC é uma ferramenta biofísica bem estabelecida para o estudo da definição das estruturas e alterações conformacionais das proteínas. Assim, comparando os espectros de uma proteína de interesse com proteínas de estruturas conhecidas, pode-se estimar a estrutura secundária da mesma (MILES; WALLACE, 2016). O sinal obtido no DC está relacionado aos cromóforos que em um ambiente assimétrico interagem com a luz polarizada. No caso das proteínas, os principais cromóforos são as ligações peptídicas, que absorvem a luz polarizada na região do comprimento de onda (λ) do ultravioleta distante (UV) entre 190 e 240 nm. Desta forma, a análise dos espectros nessa região pode fornecer dados referentes à estrutura secundária da proteína como α -hélice e folhas- β , por exemplo, pois a orientação do esqueleto polipeptídico influencia as transições ópticas das ligações peptídicas, produzindo espectros característicos na região avaliada (LOUIS-JEUNE; ANDRADE-NAVARRO; PEREZ-IRATXETA, 2012).

1.4.4 Dispersão dinâmica de luz (DLS)

As análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS) tornaram-se muito úteis na caracterização de biomoléculas, por meio da detecção de agregados em soluções macromoleculares e determinação do tamanho de biomoléculas hidratados, como proteínas e ácidos nucleicos livres e complexados (LORBER et al., 2012). Essa técnica avalia o movimento browniano e o comportamento de difusão das macromoléculas em solução, obtendo o coeficiente de difusão e, a partir dele os raios hidrodinâmicos, que dependem do tamanho e forma das macromoléculas (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016).

1.4.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica analítica muito eficiente na elucidação estrutural de moléculas pequenas e macromoléculas, fornecendo amplas informações como: mapeamento de epítomos, dados estruturais e interações proteína-ligante em resolução atômica entre outras (BHARTI; ROY, 2012). Há muitas abordagens por RMN que podem ser utilizadas para avaliar as interações entre ligantes e proteínas. Podem-se destacar duas metodologias principais: monitoramento de proteínas ou de ligantes. No primeiro obtêm-se um espectro de proteínas e o ligante é titulado, dando informações sobre os resíduos na proteína, que estão envolvidos na interação direta com o ligante. No método de observação do ligante, que foi o utilizado neste estudo, é adquirido um espectro do ligante adicionando a proteína, sendo desta forma possível avaliar as mudanças no epítomo do ligante durante o processo de interação, com base nos valores de deslocamento químico obtidos mediante o monitoramento dos núcleos, principalmente de ^1H e ^{13}C (BECKER et al., 2018).

Por fim, a Tabela 1 apresenta uma compilação de informações que podem ser obtidas mediante a utilização das técnicas descritas previamente para avaliação da interação proteína-ligante, além de algumas vantagens e limitações.

Tabela 1. Principais informações, vantagens e limitações associadas as estratégias utilizadas nesse estudo para avaliação da interação proteína-ligante (P-L).

Estratégias	Espécie monitorada			Parâmetros avaliados	Vantagens	Desvantagens	Referências
	P	L	P-L				
Fluorescência molecular	X		X	Mecanismo de <i>quenching</i> ; Constante de ligação; Número de sítios de ligação; Parâmetros termodinâmicos; Distâncias intermoleculares; Modo de ligação; Alterações conformacionais; Sítios preferencial de interação.	Elevada sensibilidade; Larga faixa linear; Medidas qualitativas e quantitativas; Alta seletividade.	Número limitado de compostos que fluorescem; Fotodecomposição; Efeito de filtro.	SOARES et al., 2019; ALANAZI; ABDELHAMEED, 2016; ZHENG et al., 2017; CHAVES et al., 2017; WANI et al., 2017; WANI et al., 2018; ZEINABAD et al., 2016.
UV-vis	X		X	Mecanismo de <i>quenching</i> ; Avaliação sobre formação de complexo; Constante de ligação; Parâmetros termodinâmicos; Alterações conformacionais.	Aplicação extensiva a muitos compostos e/ou elementos; Análise rápida e barata; Pode revelar a presença de contaminantes	Baixa seletividade; Dispersão e difusão de luz; Efeito de filtro; Deve seguir a Lei de Beer.	ZHANG et al., 2017; ALANAZI; ABDELHAMEED, 2016; LOMBARDO et al., 2017; ROY; SENGUPTA; GUIN, 2018; ALANAZI et al., 2019; LIU et al., 2018
Dicroísmo circular	X		X	Identifica distorções na estrutura da molécula; Conformação do composto; Modo de ligação; Estabilidade.	Avalia uma ampla gama de interações; Rapidez na análise; Sensibilidade única à assimetria na estrutura da amostra.	Apenas informações qualitativas; Requer grande quantidade de amostra; Não fornece uma única estrutura da molécula.	KESSENBROCK; GROTH, 2017; NEVÍDALOVÁ; MICHALCOVÁ; GLATZ, 2018; CORRÊA; RAMOS, 2009; CHAVES et al., 2017; MARTIN, Stephen R.; SCHILSTRA, 2008
Dispersão dinâmica de luz	X		X	Distribuição do tamanho do agregado; Avalia a existência de monômeros; Formação e estabilidade do complexo;	Técnica rápida e não invasiva; Requer pouca quantidade de amostra;	Soluções devem estar altamente diluídas; Sensível a temperatura e viscosidade do solvente.	STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016; PRATHIBHA et al., 2019; BHIRDE et al., 2018; KENRICK; SOME, 2018; LORBER et al., 2012;

				Estequiometria de ligação; Parâmetros termodinâmicos; Constante de dissociação			ARZENŠEK; PODGORNIK; KUZMAN, 2010
Ressonância magnética nuclear	X	X		Constante de ligação; Modo de ligação; Parâmetros termodinâmicos.	Fornecer a composição química; Análise em nível atômico; Não possui interferência ótica; Análises in vivo.	Limitação no tamanho da amostra para análise; Alto tempo de análise; Baixa sensibilidade;	GRZESIEK. et al., 2005; KRISHNAN, 2019; GREÑO et al., 2019; SÁEZ-FERRE et al., 2018; BHARTI; ROY, 2012; BECKER et al., 2018
Docking molecular	X		X	Formação do complexo; Parâmetros de ligação; Sítio e orientação da ligação;	Simula interações ligante-receptor; Compreensão dos mecanismos de ação;	Excesso de falsos positivos e/ou falsos negativos; Não leva em consideração íons ligados covalentemente ou inibidores;	GHASEMI; ABDOLMALEKI; SHIRI, 2017; AGRAWAL et al., 2019; HERNÁNDEZ-SANTOYO et al., 2013; AAMIR et al., 2018; RASOOL et al., 2018; MUSYOKA et al., 2016.

Legenda: Proteína (P), ligante (L) complexo proteína-ligante (P-L).

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

1.5 Ensaio *in vivo* para avaliação de toxicidade

Buscando ainda avaliar o comportamento das macromoléculas e da sua atividade biológica nos organismos vivos, parte da pesquisa depende da utilização de modelos animais, que auxiliam na compreensão dos mecanismos de funcionamento do corpo humano ou em sistema de maior complexidade (VAN DER WORP et al., 2010; WANGLER; HU; SHULMAN, 2017.).

Os sistemas modelo de mamíferos permaneceram na frente dos estudos de toxicidade devido a sua proximidade com os humanos, que possibilita a prevenção dos efeitos adversos de produtos químicos e seus mecanismos de ação no organismo. Contudo, esses sistemas possuem certas limitações, dentre elas, precisam de um grande espaço para criadouro, ninhada de tamanho pequeno, ciclo de vida mais longo para finalizar um experimento. Neste contexto, sistemas *in vitro* e modelos de animais alternativos que possuem semelhanças com organismos superiores vem sendo utilizados (TIWARI et al., 2011; FREIRES et al., 2017.). Nesse estudo dois modelos emergentes foram empregados: o uso do Danio rerio (*zebrafish*) e a *Drosophila melanogaster* (mosca de fruta) a fim de obter dados preliminares sobre a toxicidade do TM *in vivo*.

1.5.1 Modelo empregando Danio rerio (*zebrafish*)

Nos últimos anos, um novo vertebrado destacou-se no cenário científico: o *zebrafish* (ZF), como um excelente sistema modelo para estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e para desvendar o mecanismo de diversas doenças humanas bem como testar novos agentes terapêuticos (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012). Trata-se de um pequeno teleosteo, da espécie Danio rerio, tropical de água doce, tendo como principais justificativas para seu uso atributos práticos e econômicos, que compreendem baixo custo de manutenção, maior fecundidade, assim, conferindo potencial aplicação em técnicas de médio e alto desempenho, como avaliação de novos fármacos e testes toxicológicos. Além disto, seu genoma sequenciado indica elevada homologia com os mamíferos (KOENIG; KAN; SHIH, 2016).

O ZF era usado na década de 1930 como um modelo clássico de desenvolvimento embriológico. Os estudos iniciais basearam-se na combinação da clareza ótica dos embriões e larvas, que possibilitava visualizar eventos biológicos celulares *in vivo* e o fácil manuseio

embriológico que permitia realizar várias observações importantes. Durante as décadas de 1980 e 1990, o desenvolvimento de técnicas genéticas, como, mutagênese, transgênese, abordagens de mapeamento, entre outras estabeleceu o uso do ZF como um modelo dominante na biologia do desenvolvimento (LIESCHKE; CURRIE, 2007).

Atualmente, a preferência tem sido dada ao uso de embriões e larvas em vez do ZF adulto, seja por razões éticas, econômicas ou biológicas. O rápido desenvolvimento embrionário, o tamanho da larva e a elevada disponibilidade de indivíduos permitem que estudos de alto desempenho rastreiem a toxicidade em um organismo inteiro, fornecendo uma visão mais panorâmica dos efeitos tóxicos, o que seria possível apenas em culturas de células. Além disso, os embriões são translúcidos e se desenvolvem fora do organismo materno, permitindo que alterações morfológicas sejam observadas desde as primeiras horas após a fecundação (BAMBINO; CHU, 2016; KOENIG; KAN; SHIH, 2016; IBRAHIM; RICHARDSON, 2017).

Nesse sentido, os embriões de ZF destacam-se como um modelo de sistema vertebrado altamente eficaz em estudos de toxicidade. Além das vantagens inerentes às suas características morfológicas, uma alta similaridade do seu genoma com o humano confere uma conservação especial dos processos envolvidos nas respostas tóxicas (HOWE et al., 2013).

1.5.2 Modelo empregando *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster* trata-se de outro modelo animal eficaz em estudos toxicológicos, principalmente para investigar a neurotoxicidade associada a diferentes substâncias químicas, devido à alta sensibilidade desse animal a substâncias tóxicas, acessibilidade ao seu sistema nervoso central, além das vastas semelhanças entre os sistemas de neurotransmissores de insetos e mamíferos (BIANCHINI et al., 2019).

Drosophila é o organismo modelo invertebrado mais próximo do humano, devido a semelhança/conservação da sequência genética. Esse modelo não mamífero possui várias vantagens sobre outros sistemas: ciclo de vida curto (Fig.2), fácil cultivo e propagação, facilidade de manutenção, alcança a fase adulta em um curto espaço de tempo, inúmeras ferramentas moleculares disponíveis e facilidade de manipulação experimental. Tais características elucidaram as *drosophilas* como um modelo clássico para estudos de

genética e desenvolvimento, portando um grande número de estudos científicos e muitos dados sobre sua anatomia e seu genoma (MULCAHY et al., 2011; NIEHOFF et al., 2015). Devido sua homologia funcional de 65-70% com humanos, juntamente com genética e biologia do desenvolvimento bem fundamentadas, são consideradas um excelente sistema de modelo genético *in vivo* para estudos de toxicidade (TIWARI et al., 2011).

Figura 2. Esquema do desenvolvimento das moscas do tipo *Drosophila melanogaster* da fase embrionária até a adulta.



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Além dessas vantagens, os experimentos envolvendo as *D. melanogaster* são realizados mais facilmente por razões práticas e éticas, permitindo assim um maior número de experimentos e melhores conclusões estatísticas, surgindo neste contexto, como um dos modelos poderosos para pesquisa toxicológica (NIEHOFF et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

A utilização de vacinas e cosméticos contendo o timerosal como conservante, expõe a população diferentes níveis dessa espécie e seus metabolitos, podendo ocasionar danos irreparáveis à saúde. Desta forma, tendo em vista as funções desempenhadas pela catalase no organismo, relacionado ao combate de possíveis doenças, e ao risco da exposição contínua as espécies de mercúrio, este estudo busca avaliar se há influência nas funções desempenhadas por essa enzima após interação com o timerosal, visando investigar os principais aspectos relacionados a esse processo.

2.1 Importância para a sociedade

Este estudo visa mostrar possíveis efeitos deletérios associados ao uso do timerosal como conservante em vacinas e cosméticos, a fim de apresentar resultados que auxiliem na melhoria de atenção à saúde quanto à utilização deste, uma vez que o mesmo tem sido o alvo de estudos relacionados ao desenvolvimento de doenças neurológicas, principalmente em crianças nos primeiros anos de vida.

3. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o mecanismo de interação e inibição da catalase pelo timerosal, um composto orgânico de mercúrio, a partir de estudos biofísicos simulando condições fisiológicas.

3.2 Objetivos específicos

- a) Empregar técnicas de fluorescência molecular e UV-vis para avaliar parâmetros de ligação e mecanismo de interação, obtendo: constantes de ligação, dados termodinâmicos, estequiometria proteína-ligante, tipo de *quenching*;
- b) Verificar possíveis alterações na conformação e na estrutura secundária da catalase decorrente do processo de interação com timerosal explorando fluorescência 3D, fluorescência sincronizada, UV-vis, dicroísmo circular e análise de dispersão dinâmica de luz;
- c) Monitorar alterações na superfície da proteína devido ao processo de interação empregando a sonda ANS por fluorescência molecular;
- d) Avaliar as distâncias intermoleculares por transferência de energia por ressonância de Förster (FRET)
- e) Avaliar possíveis espécies que podem atuar como competidores e inibidores clássicos no processo de interação catalase-timerosal;
- f) Monitorar o possível epítopo do TM durante o processo de interação com a CAT por RMN de ^1H ;
- g) Avaliar a influência do timerosal na atividade catalítica da catalase em relação a decomposição de peróxido de hidrogênio e determinar o tipo de inibição;
- h) Realizar estudos preliminares *in vivo* com ZF e *Drosophila melanogaster*, afim de observar os efeitos toxicológicos do TM nesses organismos modelos.

4. EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e soluções

A catalase (CAT), timerosal (TM), Tris- HCl, ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato (ANS) foram obtidos da Sigma- Aldrich (EUA) e o NaCl (Vetec). Os demais reagentes como H₂O₂, CaCl₂, MgCl₂·6H₂O, ZnCl₂, FeSO₄·7H₂O, FeCl₃, CuSO₄·5H₂O, AgNO₃, KCN, Na₃PO₄·12H₂O, NaN₃, brucina, glicose, hidroxilamina e quercetina também são de alto grau analítico de pureza (> 95%). A solução estoque de CAT (4 μM), assim como as soluções de trabalho, foram preparadas em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4 ± 0,1) contendo NaCl 100 mM. A solução de TM (1,24 mM) e as demais soluções utilizadas nos experimentos foram preparadas em água ultrapura (18,2 MΩ cm⁻¹, Gehaka, Master System MS 2000, Brasil).

4.2 Procedimentos

4.2.1 Espectroscopia de fluorescência molecular para os estudos de interação CAT e TM

Todos os experimentos empregando fluorescência molecular no estado estacionário foram realizados no espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão). Para obtenção dos espectros de emissão as soluções foram excitadas em 280 nm e os espectros registrados no intervalo de 280 a 500 nm empregando abertura de fenda (*slit*) de 3 nm para excitação e, 5 nm para emissão. A titulação espectrofluorimétrica e todos os experimentos foram realizados com soluções de CAT 1 μM em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4 ± 0,1) contendo NaCl 100 mM para ajuste da força iônica. Na titulação, empregaram-se concentrações de TM de 0 - 180 μM. Para determinação dos parâmetros termodinâmicos as titulações foram realizadas em 22, 30 e 38°C. Os espectros de fluorescência 3D foram obtidos a partir de CAT (3 μM) na ausência e na presença de TM (100 μM), sendo que as soluções foram excitadas no intervalo de 220-450 nm e a emissão registrada de 240-500 nm. Para os estudos por fluorescência sincronizada as amostras foram excitadas em 265 e 220 nm e a emissão registrada na faixa de 280-600 nm obtendo-se um Δλ = 15 e 60 nm, respectivamente (XU et al., 2014). Utilizou-se a sonda ANS (ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato), a fim de avaliar a hidrofobicidade da superfície da catalase, mantendo-se fixa a

concentração da proteína (1 μM) e do ANS (1 μM), com adições subsequentes de TM (0, 40, 100 e 180 μM). As medidas foram realizadas sob as seguintes condições: $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$, com *slit* de excitação e emissão 5 e 10 nm, respectivamente (SANTOS et al., 2018). Buscando avaliar as distâncias intermoleculares proteína-ligante realizou-se o ensaio de transferência de energia por ressonância de Förster (FRET) utilizou-se CAT a 2,5 e 5 μM e, mantendo as proporções do ligante em 1:1 e 1:4, respectivamente (DANTAS et al., 2017). Para avaliar a influência de diferentes compostos na interação da CAT (1 μM) com o TM (0 - 180 μM), as seguintes espécies foram avaliadas: Ca(II), Mg(II), Zn(II), Fe(II), Fe(III), Cu(II), Ag(I), cianeto, fosfato, azida, brucina, glicose, hidroxilamina e quercetina todos com concentração final 1 μM (MA; DENG; CHEN, 2017; RASHTBARI et al., 2017a; HAO et al., 2015).

4.2.2 Espectrometria de absorção molecular no UV-vis

4.2.2.1 Estudos de interação CAT e TM

Foram registrados espectros na região do UV-vis usando absorvância como modo de medida para soluções de CAT (1 μM), enquanto que para o TM as soluções empregadas foram nas concentrações de 10 e 60 μM . Todas as medições na região do UV-vis empregaram espectrofotômetro feixe duplo Micronal (modelo AJX 6100, Brasil), no intervalo de 200 a 500 nm (SANTOS et al., 2018).

4.2.2.2 Inibição enzimática da CAT induzida pelo TM

No ensaio de inibição da atividade enzimática da CAT referente a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), empregou-se as seguintes soluções: H_2O_2 (0,18 M), CAT (0,1 μM) e TM (10, 25, 50, 75 e 100 μM) em meio tamponado com Tris-HCl 50 mM (pH $7,4 \pm 0,1$) com NaCl 100 mM para ajuste de força iônica. As medições desse estudo cinético foram realizadas em 240 nm, no modo cinético de 10 em 10 s, até 2 min (XU et al., 2014).

Para avaliar o tipo de inibição, utilizou-se o substrato (H_2O_2) entre 0,005 e 0,025 M, em duas concentrações de TM 25 e 50 μM . Com base nos valores da absorvância

determinados em 3 min de reação, o gráfico de Lineweaver-Burk ($1/A_{240}^{\text{H}_2\text{O}_2}$ vs $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$) foi construído e determinou-se o tipo de inibição (YEKTA et al., 2018).

4.2.3 Dicroísmo circular (DC)

Alterações conformacionais da CAT durante a interação com TM foram monitoradas por espectroscopia de dicroísmo circular (CD). As medições para o monitoramento da variação da estrutura secundária da proteína foram registradas em espectropolarímetro Jasco (modelo J-815, Japão) no intervalo de 200 a 260 nm com largura de banda de 1,0 nm. Neste experimento a CAT (2 μM) foi titulada com TM (0, 2, 4 e 8 μM) a 22°C. As análises foram monitoradas por um espectropolarímetro Jasco (modelo J-815, Japão) equipado com sistema de resfriamento do tipo Peltier, empregando cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 mm, os espectros foram obtidos através da média de quatro experimentos com velocidade a 50 nm min^{-1} (HAO et al., 2015).

4.2.4 Análise de dispersão dinâmica de luz (DLS)

Esse estudo foi realizado a fim de avaliar alterações no raio hidrodinâmico da CAT (2 μM) na presença do TM em diferentes concentrações (2, 10 e 20 μM). As amostras foram previamente filtradas (0,22 μm) e transferidas para uma cubeta de 1,5 mL. Para monitorar esse ensaio empregou-se o equipamento Microtrack ZETA (EUA, 5 mW solid state diode lasers 780 nm) com o *software* programado para realizar a média de 30 *scans*, com duração de 15 segundos cada (VIKULINA et al., 2018).

4.2.5. Ressonância magnética nuclear (RMN)

O estudo da interação por meio da espectroscopia de RMN ^1H foi realizado empregando como parâmetro a variação dos deslocamentos químicos (δ) do TM (0,25 mM) na ausência e na presença de diferentes concentrações de CAT (2,5 - 50 μM). Os sistemas foram avaliados mantendo-se a massa do ligante e variando a massa da enzima, com adição de 10 μL de TMSP 2,5 mM como padrão interno e, por fim, completadas com tampão fosfato 10 mM em água deuterada (D_2O , 99,9%) para um volume final de 600 μL . As medidas foram registradas um espectrômetro de RMN Bruker 600 ($B_0 = 9,4 \text{ T}$), operando a 600,09 MHz para ^1H e equipado com sondas de 5,0 mm para detecção indireta, realizado no

Laboratório de pesquisa em Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear no Instituto de Química e Biotecnologia (IQB).

4.2.6. Ensaios de toxicidade *in vivo*

4.2.6.1 Modelo empregando Zebrafish (ZF)

Os embriões de ZF foram fornecidos pelo Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa, Brasil). ZF adultos (cepa selvagem) foram mantidos a 26 ± 1 °C sob fotoperíodo de 14:10 h (claro: escuro). A qualidade da água foi mantida por filtração com carvão ativado, condutividade em 750 ± 50 μ S e oxigênio dissolvido acima de 95% de saturação.

Para obter embriões, uma armadilha de ovos foi colocada durante a noite em um tanque contendo espécimes masculinos e femininos (proporção de 1: 1) um dia antes do teste. Uma hora após o início do ciclo de luz, os ovos foram coletados com uma pipeta Pasteur e enxaguados com meio E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl₂ 0,33 mM e MgSO₄ 0,33 mM) para seleção subsequente de embriões usando um estereomicroscópio (80× ampliação). Ovos fertilizados viáveis foram selecionados para ensaios de toxicidade embrionária. Todos os experimentos realizados com o peixe-zebra neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba (4460140920).

O teste de toxicidade aguda de embriões de peixes (FET) foi realizado com TM de acordo com a diretriz número 236 da OCDE (OECD, 2013), com pequenas modificações. Embriões de peixe-zebra com até 3 hpf (horas após a fertilização) de idade foram expostos a cinco concentrações crescentes de TM (0,0125, 0,025, 0,05, 0,1 e 0,2 μ M). Para cada concentração testada foi preparada uma placa de 96 poços contendo 20 ovos fertilizados (1 embrião por poço) expostos à amostra teste e 4 embriões foram expostos apenas ao meio E3 (controles internos). Uma placa adicional contendo embriões expostos ao meio E3 também foi testada. A exposição foi realizada por 96 h, e os embriões foram analisados a cada 24 h para os pontos finais apicais: coagulação do ovo; falta de formação de somito; falta de desprendimento do botão da cauda do saco vitelino e falta de batimento cardíaco. Na presença de qualquer um desses parâmetros, o embrião / larva foi considerado morto. O

número de mortes foi usado para calcular a CL_{50} (concentração letal mediana). As observações foram realizadas em estereomicroscópio (aumento 80×) e fotografadas (Zeiss). Após 96 h, as larvas sobreviventes foram sacrificadas com eugenol e devidamente descartadas.

O teste FET foi repetido para TM nas mesmas condições descritas acima, mas neste momento os embriões foram expostos a três concentrações abaixo da CL_{50} determinada anteriormente. No final do período de exposição (96 h), as larvas foram rapidamente congeladas na proporção de 1 larva por 50 μ L de tampão de fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 e, em seguida, colocadas em um freezer a $-20^{\circ}C$ até o momento de análise. Grupos de larvas de cada uma das três concentrações testadas e um grupo de controle negativo (exposto apenas ao meio E3) foram macerados. Os homogenatos foram centrifugados a $10.000\times g$, por 10 min a $4^{\circ}C$, e os sobrenadantes resultantes foram usados para medição do conteúdo de proteína solúvel e atividade enzimática.

A quantificação das proteínas solúveis foi determinada pelo método colorimétrico desenvolvido por Bradford (1976). Inicialmente, foi construída uma curva padrão com albumina de soro bovino, e a absorbância das amostras foi lida no comprimento de onda de 595 nm utilizando o leitor de microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Oy, Finlândia). As medidas foram efetuadas em quadruplicada ($n = 4$).

4.2.6.2 Modelo empregando *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster tipo selvagem foram alimentadas com meio instantâneo de *Drosophila* (água, fubá, açúcar, fermento e metil-hidroxibenzoato) que foi misturado com diferentes concentrações de TM (1 - 100 μ M). As larvas foram transferidas para os frascos contendo o alimento enriquecido, onde para cada concentração preparou-se 4 repetições com 30 larvas, sendo o experimento acompanhado durante 15 dias, monitorando a pulpação e formação de adultos.

Buscando avaliar alterações na atividade da CAT presente nas *Drosophilas* realizou-se a coleta de adultos entre 2-4 dias de idade e larvas no início do estágio L3, para exposição ao TM (1 - 200 μ M) durante 48 h. Estes ensaios seguiram a metodologia adotada por Galeone et al. (2012), com algumas modificações.

As moscas foram separadas em sexos, pesadas e homogeneizadas (1:10 p/v) com homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, contendo EDTA 0,5 mM. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 13.000 g e os sobrenadantes resultantes foram usados para as análises, mesmo procedimento para as larvas (LUSHCHAK et al., 2011).

A atividade da catalase foi registrada como uma taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio a 240 nm, usando $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinção de H_2O_2 . Uma alíquota de 250 μl desse homogenato foi então misturada com 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% (concentração final) e centrifugada por 5 min a 13.000 g, após essa etapa as atividades foram medidas a 25°C e expressas por miligrama de proteína solúvel no sobrenadante (LUSHCHAK et al., 2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Parâmetros de ligação e mecanismo de interação

Informações sobre a ligação de pequenas moléculas à proteína, como constantes de ligação, mecanismo de interação, número de sítios de ligação entre outras, podem ser fornecidas por estudos de espectroscopia de fluorescência molecular (LU et al., 2010). A fluorescência das proteínas é proveniente principalmente dos resíduos de aminoácidos do triptofano (Trp) e tirosina (Tyr), que possibilita a realização de estudos espectroscópicos referentes ao processo de interação (HU; DA, 2014). A catalase possui fluorescência intrínseca com máximo de emissão em 338 nm devido à presença dos aminoácidos aromáticos, principalmente Tir e Trp. Neste sentido é possível monitorar avaliar o processo de interação devido as alterações no sinal analítico após processo de interação com pequenas moléculas, como o timerosal. Os espectros de emissão de fluorescência (Fig. 3A) foram obtidos mantendo-se constante a concentração da CAT em função do aumento das concentrações do timerosal.

Para os estudos empregando fluorescência molecular, utilizou-se a equação de Stern-Volmer associada a capacidade de supressão de fluorescência da proteína (fluoróforo) na presença do timerosal (ligante):

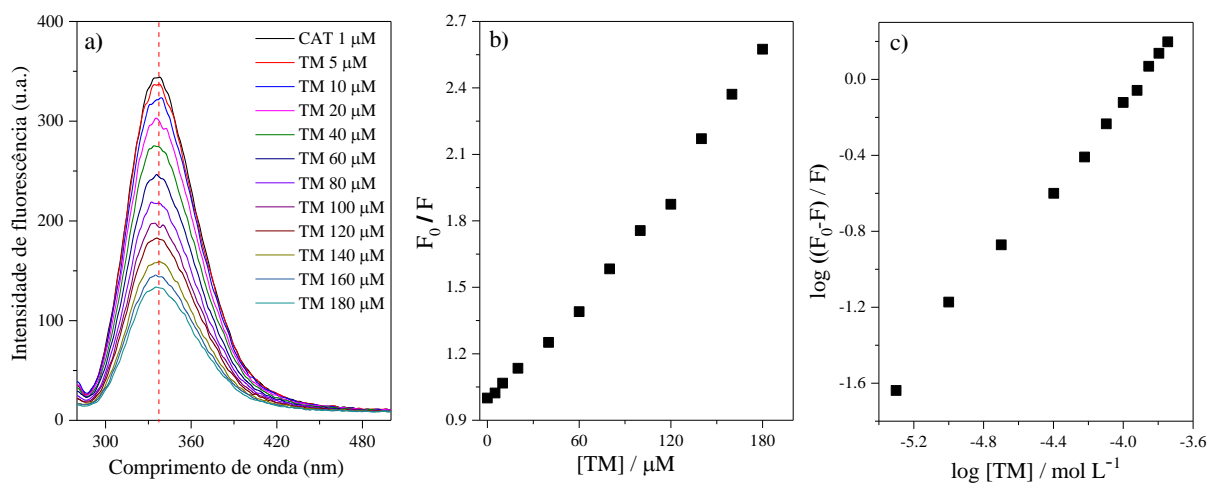
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad \text{equação (1)}$$

onde F_0 e F representam a fluorescência na ausência e presença do TM, respectivamente; K_q é a constante difusional de extinção bimolecular, τ_0 é o tempo de vida médio da fluorescência intrínseca na ausência do *quencher* (10^{-8} s), $[Q]$ a concentração molar do ligante (TM) e K_{SV} a constante de *quenching* de Stern-Volmer (ZHANG et al., 2015). Quando moléculas pequenas se ligam em determinadas regiões de uma macromolécula e ocorre saturação deste ambiente químico, parâmetros como constantes de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) podem ser determinados pela equação 2:

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

Assim, com base na linearização das equações (1) e (2) pode-se determinar os parâmetros de ligação K_{SV} , K_q (Fig. 3B), K_b e n (Fig. 3C).

Figura 3. a) Curva de titulação da CAT (1 μM) com TM (0 – 180 μM); b) Linearização da curva em função da equação 1 (K_{SV} e K_q); c) Linearização da curva em função da equação 2 (K_b e n). Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).



Fonte: elaborado pela autora, 2020

Após a adição de TM ao sistema contendo CAT, houve decaimento no sinal analítico da proteína, indicando a ocorrência da interação entre essas espécies. Esse decaimento pode estar associado a uma variedade de interações (inter)moleculares, dentre elas a desativação do estado excitado ou a formação de um complexo supramolecular não fluorescente (ACHARYA; SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2013; LYRA et al., 2019). Uma vez que, o TM não apresenta fluorescência intrínseca na região avaliada, atua desta forma como uma molécula *quencher*, que é capaz de suprimir a fluorescência da macromolécula (WANG; CAO; MENG, 2015). Foi possível observar um deslocamento do máximo de emissão da ordem de 3 nm para comprimentos de onda menores (efeito hipsocrômico) como consequência da associação entre as espécies avaliadas, indicando que houve redução da polaridade da proteína decorrente do processo de interação (ARANDAS, 2014).

Quando ocorre uma interação entre uma proteína (P) e um ligante (L, *quencher*), pode ocorrer a formação de um complexo P-L (estado fundamental), o qual não apresenta fluorescência ou a proteína ser desativada no estado excitado. Uma estratégia para investigar o mecanismo de *quenching* é estudar a dependência da temperatura no processo de interação. Para este fim, titulou-se a proteína (CAT) com timerosal em temperaturas diferentes (Tabela 2). Os possíveis mecanismos de supressão de fluorescência são classificados como dinâmico e/ou estático, sendo diferenciados em virtude do

comportamento em função da temperatura e tempo de vida no estado excitado (ZHANG et al., 2013; DEHGHAN et al., 2019). O *quenching* dinâmico está relacionado ao aumento do K_{SV} com o aumento da temperatura, visto que há maior frequência de colisões, referindo-se ao processo em que o fluoróforo e o *quencher* entram em contato apenas momentaneamente durante a existência transitória do estado excitado. Em contrapartida o *quenching* estático, neste caso, refere-se à formação de um complexo supramolecular estável entre as espécies no estado fundamental (LEI, et al., 2016; JOYE et al., 2015).

Notou-se uma redução nos valores de K_{SV} com o aumento da temperatura, indicando que o tipo de *quenching* associado ao processo de supressão de fluorescência é estático, ou seja, o complexo P-L está sendo formado no estado fundamental. Além disso, os valores de K_q (10^{12}) foram maiores (Tabela 2) que a constante máxima da taxa de *quenching* por colisão difusional ($2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para uma série de supressores com proteínas (CHEN et al., 2018). Desta forma, reforçando que o mecanismo de *quenching* não é causado por colisão dinâmica, mas pela formação de um complexo supramolecular não fluorescente. Temperaturas mais altas resultam em maiores coeficientes de difusão, desta forma, espera-se que as constantes de *quenching* bimolecular difusional aumentem proporcionalmente com a temperatura. (ACHARYA; SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2013).

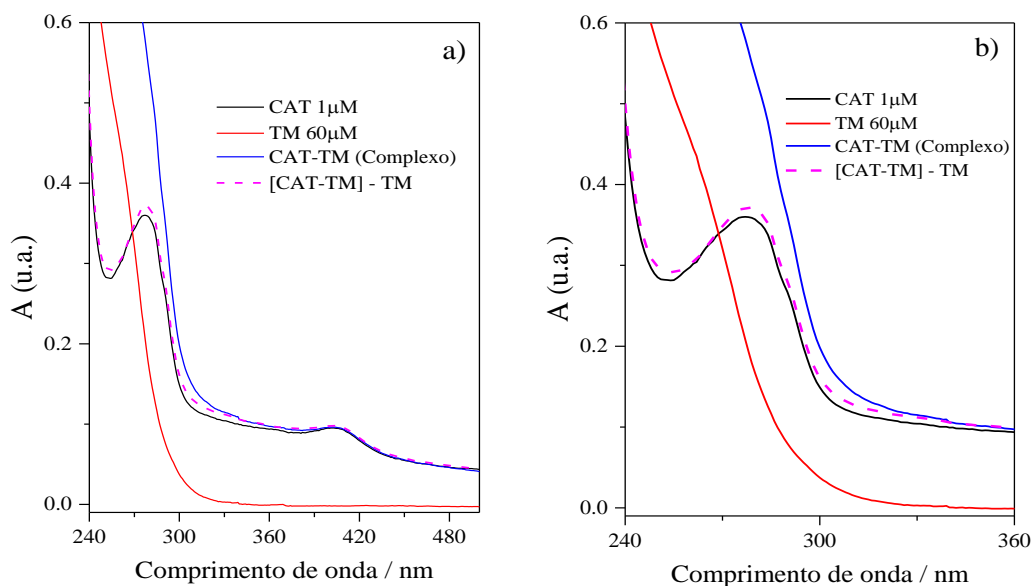
Tabela 2. Parâmetros de ligação e termodinâmicos referentes ao processo de interação entre CAT e TM simulando condições fisiológicas.

T (°C)	Parâmetros de ligação					Parâmetros termodinâmicos			
	K_{SV} ($10^4 M^{-1}$)	r	K_q ($10^{12} M^{-1} s^{-1}$)	K_b ($10^4 M^{-1}$)	r	n	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J K mol ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
22	1,37 ± 0,06	0,9904	1,37	3,73 ± 0,02	0,9952	1,38 ± 0,04			-31,01
30	1,36 ± 0,07	0,9888	1,36	0,80 ± 0,02	0,9936	1,21 ± 0,04	- 88,8	-195,9	-29,44
38	1,31 ± 0,05	0,9947	1,31	0,58 ± 0,02	0,9931	1,15 ± 0,05			- 27,87

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Os resultados obtidos por fluorescência molecular quanto à natureza do *quenching* foram confirmados pelo ensaio por espectrometria de absorção no UV-vis (Fig. 4), visto que esta técnica pode ser utilizada para investigar a formação do complexo proteína-ligante no estado fundamental, além de explorar mudanças estruturais da proteína (HE et al., 2014).

Figura 4. Espectros obtidos no UV-vis. a) Espectro da região de 240 a 500 nm; b) Expansão da região de 240 a 360 nm. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A formação do complexo CAT-TM foi sustentada pelos dados espectrais obtidos devido à alteração da intensidade de absorbância da CAT ($A_{CAT} = 0,3601$), resultante da adição de TM à sua solução.

De acordo com o perfil espectral é possível inferir o mecanismo de *quenching* existente, pois quando este é dinâmico o espectro de absorção da proteína não é influenciado pela presença do ligante, uma vez que esse estado decorre das colisões entre o *quencher* e o fluoróforo no estado excitado. No entanto, quando a interação ocorre por *quenching* estático, são observadas alterações associadas à formação do complexo supramolecular no estado fundamental (LYRA et al., 2019). O fato de $\Delta A = A(\text{complexo}) -$

A(TM) ser diferente de zero, sustenta que de fato, forma-se um complexo no estado fundamental, isto é, o mecanismo é por *quenching* estático (MOLINA-BOLÍVAR, 2014).

A interação do complexo formado possui afinidade moderada com K_b da ordem de 10^4 (Tabela 2), de acordo com alguns relatos na literatura. Moradi e colaboradores (2015) estudaram os efeitos causados na CAT pelo deferisirox (quelante de ferro), utilizado no tratamento da sobrecarga crônica de ferro, obtendo $K_b = 1,7 \times 10^7$. Chen et al. (2015), avaliou a interação da catalase com Hg(II) por estudos espectroscópicos combinados com *docking* molecular, obtendo uma constante de ligação de 10^1 . Santos e colaboradores (2018) por sua vez avaliou a interação do timerosal com a albumina do soro bovino (BSA) empregando técnicas espectroscópicas, onde foi verificado que este composto organomercural reage/interage com a BSA apresentando K_b da ordem de 10^3 . Silva e colaboradores (2020) investigou os principais parâmetros relacionados a interação entre o TM e a hemoglobina obtendo uma constante de ligação da ordem de 10^6 . Em ambos os trabalhos descritos onde a interação do TM com diferentes proteínas foi avaliada, notou-se a migração do EtHg^+ para resíduos de cisteínas livres existentes nessas macroestruturas. Contudo, para esse estudo, visto que a CAT não possui resíduos de cisteínas livres esperava-se que a interação ocorra com a molécula do TM na sua forma íntegra, ou seja, não havendo reação.

O complexo avaliado apresentou estequiometria 1:1 de acordo com os valores de n obtidos, ou seja, uma molécula de TM se liga a uma CAT com alta afinidade em apenas uma região (Tabela 2). Os valores de K_b diminuem com o aumento da temperatura, isso implica que possivelmente um complexo proteína-ligante está sendo desfavorecido, sendo dissociado parcialmente com o aumento da temperatura (LU et al., 2010).

A natureza das forças envolvidas no processo de interação entre essas espécies pode ser revelada por meio do estudo dos parâmetros termodinâmicos do sistema. A dependência da constante de ligação em virtude da variação da temperatura fornece informações sobre o sinal e a magnitude da variação de entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e a mudança na variação da energia livre (ΔG) do sistema. Sendo esses parâmetros calculados mediante o uso das equações 3 e 4.

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

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

De forma geral, as forças de interação intermoleculares principais entre pequenas moléculas e proteínas são: ligação de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Valores de ΔH e ΔS negativos indicam a existência das forças Van der Waals e ligações de hidrogênio como preferenciais, ao passo que quando ambos valores são positivos refletem em interações hidrofóbicas, e se apenas ΔS é positivo considera-se uma evidência da interação eletrostática (ZHANG; MA, 2013). Tais forças, associadas a outros fatores, são responsáveis pelos sinais e magnitudes dos parâmetros termodinâmicos para a estabilidade proteica, bem como a sua ligação com moléculas pequenas (ARROYO-MAYA et al., 2016).

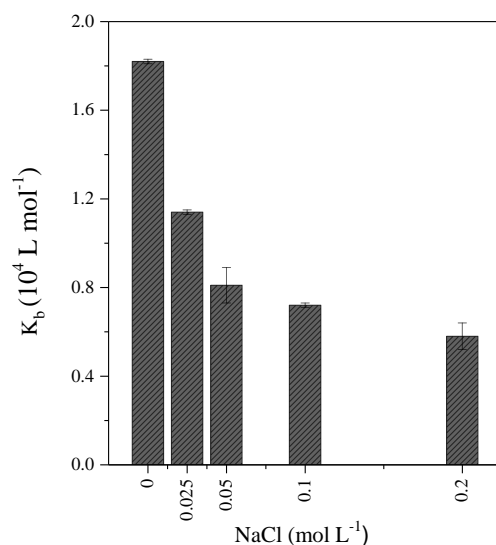
Com base nos valores obtidos foi possível observar que o processo de interação foi espontâneo ($\Delta G < 0$) e que, há uma redução no valor do K_b e n com o aumento da temperatura, sugerindo que a associação CAT-TM é desfavorecida em temperaturas mais elevadas. Com base nos valores de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) verificou-se que o TM interage predominantemente por forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio ($\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$) com a CAT, ou seja, as moléculas estão mais organizadas devido às ligações serem mais estáveis, havendo liberação de energia devido a estabilidade dessas ligações (LU et al., 2010). Baseado nisso, pode-se considerar esse processo entálpicamente favorável, visto que as contribuições do fator ΔH superam as contribuições desfavoráveis da entropia ($T\Delta S$), fornecendo uma variação líquida negativa da energia livre do sistema, o que possibilita a interação entre CAT e TM (ARROYO-MAYA et al., 2016)

Os parâmetros termodinâmicos ΔH e ΔS fornecem uma maneira de compreender quais são as forças preferenciais (e não exclusivas) presentes na formação de um complexo supramolecular. No entanto, outros estudos são necessários para verificar se há outras forças de interações coexistentes. Avaliar a influência da força iônica no sistema possibilita verificar se há algum componente iônico no processo de interação, visto que as espécies iônicas podem interagir com diversas macromoléculas com variado grau de afinidade (OTZEN, 2002).

Após a adição gradual de NaCl (0,05 a 0,2 mol L⁻¹) ao meio (Fig. 5), observou-se uma redução na constante de ligação de aproximadamente 68%, indicando que apesar das forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio serem preferenciais durante o processo de

interação, há uma parcela de forças eletrostáticas envolvidas. Uma vez que, o aumento da força iônica da solução ocasionou uma redução na constante de ligação do complexo CAT-TM, ou seja, a presença dos íons no meio dificulta o processo de interação entre essas espécies. A existência dessas forças decorre do comportamento ácido-base do grupo ácido carboxílico do TM ($pK_a = 3,05$), pois, nas condições avaliadas (pH 7,4) o mesmo está carregado negativamente, o que favorece a interação por meio de forças eletrostáticas (SANTOS et al., 2018).

Figura 5. Avaliação do efeito da força iônica na interação CAT-TM. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

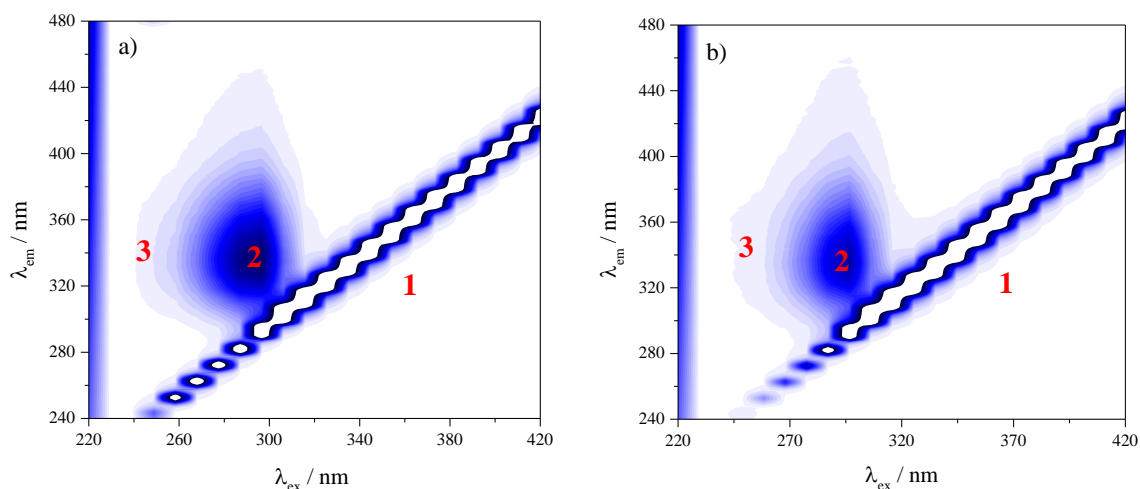
5.2 Alterações conformacionais

A interação do TM com a CAT resultou na extinção do sinal de fluorescência de CAT. No entanto, é necessário avaliar se essa interação pode afetar a conformação e/ou microambiente da CAT. Uma vez que, a estrutura de uma biomolécula está intimamente relacionada às suas funções, e sendo esta alterada a proteína/enzima pode perder sua funcionalidade de forma parcial ou total (CAO; LIU; YANG, 2013). Diante disso, ensaios foram realizados a fim de monitorar as alterações conformacionais na estrutura da enzima após interagir com o TM.

5.2.1 Fluorescência tridimensional na avaliação do processo de interação CAT-TM

A espectroscopia de fluorescência 3D tem sido muito empregada na análise de proteínas, pois sugere possíveis alterações na conformação e no microambiente das mesmas, caso haja variações na intensidade de determinadas regiões em função do processo de interação. Essas alterações conformacionais na estrutura proteica podem ser averiguadas a partir de mudanças características das bandas de emissão referentes ao esqueleto polipeptídico e resíduos de Trp e Tir (BRAGA et al., 2019).

Figura 6. Espectros de contorno de fluorescência tridimensional da CAT, a) Na ausência de TM, b) Na presença de TM. [Cat]= 3 μ M, [TM]= 100 μ M. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

As alterações conformacionais e no microambiente dos aminoácidos aromáticos (Trp e Tir) da CAT foram investigadas comparando-se as mudanças espectrais entre os gráficos na ausência e na presença do TM (Fig. 6). O pico 1 refere-se ao espalhamento Rayleigh ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$), o 2 (297 / 339) está associado aos resíduos de Tir e Trp e o 3 reflete a emissão do esqueleto polipeptídico na estrutura protéica (DANTAS et al., 2019). Com adição de TM ao sistema observa-se uma redução nos picos 2 e 3 (Tabela 3), o que implica inferir que há alteração na polaridade do microambiente dos resíduos Trp e Tir causadas pela formação do complexo CAT-TM e conseqüente mudança na estrutura secundária da proteína induzida por essa interação. Esses resultados são confirmados pelos valores de

deslocamento de Stokes obtidos após a ligação do TM à proteína, indicando a possível ocorrência de alterações microambiente ao redor dos aminoácidos como também na conformação da CAT (HUO et al., 2019).

Tabela 3. Informações associadas aos espectros de fluorescência 3D da CAT livre e complexada.

Pico	Catalase			Complexo		
	Posição	Stokes	F	Posição	Stokes	F
	($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	$\Delta\lambda$ (nm)		($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)	$\Delta\lambda$ (nm)	
1	($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$)	0	-	($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$)	0	-
2	297/339	42	604 (100%)	297/345	48	468 (23%)
3	258/334	76	89 (100%)	258/336	78	56 (37%)

Stokes = Deslocamento Stokes

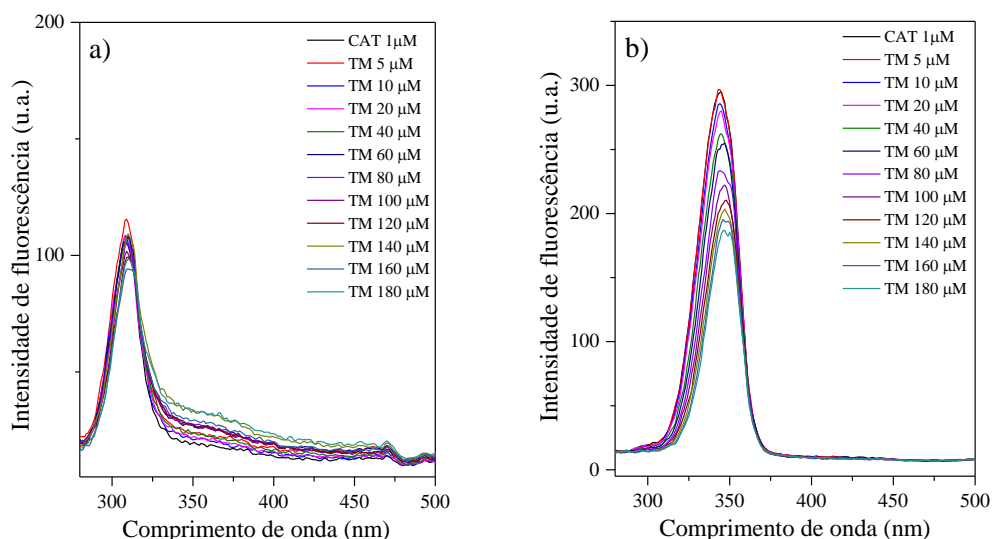
Fonte: elaborado pela autora, 2020.

5.2.2 Fluorescência sincronizada na avaliação do processo de interação CAT-TM

A espectroscopia de fluorescência sincronizada é ideal para observar alterações conformacionais nas proteínas após estas interagirem com pequenas moléculas, pois os perfis espectrais podem ser utilizados para detectar mudanças na polaridade no microambiente no entorno dos fluoróforos (ZAMAN et al., 2017). Com esta técnica é possível uma separação espectral para os resíduos de aminoácidos quando os intervalos ($\Delta\lambda$) entre os comprimentos de onda de excitação e emissão são fixados em 15 ou 60 nm, fornecendo dados característicos para os resíduos de Trp ou Tyr, respectivamente (ZHANG et al., 2015).

Como pode ser observado na Fig. 7 que quando aplicado o $\Delta\lambda = 15$ nm (Fig. 6A) na curva de titulação as intensidades de fluorescência do complexo CAT-TM não apresentaram diminuição significativa, enquanto que para o $\Delta\lambda = 60$ nm (Fig. 7B), as intensidades de fluorescência do complexo reduziram gradativamente, indicando que a interação CAT-TM altera o microambiente ao redor dos resíduos de triptofano, de forma mais significativa.

Figura 7. Titulação empregando fluorescência sincronizada para os resíduos de: a) Tirosina e b) Triptofano, com adição de incrementos de TM (0 - 180 μM). Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Para a obtenção de comparações quantitativas calculou-se a constante de Stern-Volmer, um parâmetro que indica qual dos resíduos possui seu ambiente mais afetado partir do processo de interação. Para o resíduo de Trp foi obtido-se $K_{sv} = 3,43 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ enquanto que para os resíduos de Tir, o valor de $K_{sv} = 0,93 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, sendo menor devido ao fato de que praticamente não houve mudanças no microambiente para esses resíduos. Assim, indicando que o resíduo de Trp é o que influencia mais no processo de interação, concordante com o perfil espectral apresentado.

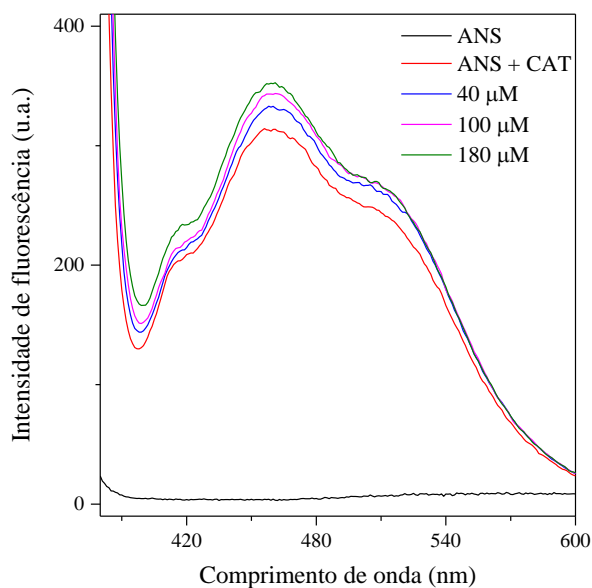
Os resultados também mostram que a polaridade no entorno dos resíduos de Trp aumentam, uma vez que houve variação de + 2 nm em relação ao comprimento de onda de máxima emissão, assim, os resíduos deste aminoácido aromático sensível a variação de polaridade foi exposto à água durante o processo de interação, possivelmente devido a mudanças na conformação da CAT (LU et al., 2010; ZHANG et al., 2015). HUO e colaboradores (2019) ao avaliar a influência do Maltol nos resíduos da CAT obteve resultados similares aos aqui apresentados, bem como Zaman et al., (2017) que estudou o efeito da clofazimina frente a essa enzima. Ambos verificaram que os resíduos de Trp

sofrem maiores alterações, indicando que a região de ligação para esses ligantes está mais próxima desses resíduos.

5.2.3 Avaliação da hidrofobicidade superficial da CAT

As regiões hidrofóbicas expostas das proteínas são amplamente detectadas por intermédio da ligação com sondas fluorescentes como 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS), que é uma molécula anfipática composta por um grupo hidrofóbico de anilina naftaleno e um grupo sulfonato carregado negativamente (SINGH et al., 2019). O ANS ao se ligar a regiões hidrofóbicas da proteína tem a sua mobilidade restrita resultando em um aumento gradual no seu sinal de fluorescência, sendo desta forma utilizado para monitorar as mudanças na hidrofobicidade da superfície proteica (DING et al., 2010). Portanto, buscando entender melhor a natureza da interação entre CAT e TM, estudos de ligação foram realizados na presença de ANS (Fig. 8).

Figura 8. Espectro de fluorescência do sistema CAT-ANS em diferentes concentrações de TM (0-180 μM). Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

De acordo com a Fig. 8, o ANS livre não apresenta fluorescência intrínseca apreciável, contudo, ao se ligar a proteína (CAT-ANS) observa-se a emissão de fluorescência com emissão máxima em 456 nm. Ao adicionar quantidades crescentes de

TM ao sistema CAT-ANS não houve uma redução na intensidade do sinal de fluorescência, pelo contrário, se observou um aumento. Tal evidência experimental indica que houve um aumento no número de regiões hidrofóbicas expostas na superfície da CAT em decorrência do processo de interação CAT-TM, e inferindo que o ligante não interage em sítios hidrofóbicos da enzima, corroborando com o que foi verificado em ensaios anteriores. Em estudo biofísico realizado por Khan e colaboradores (2018) avaliou-se o comportamento da CAT frente uma classe de surfactantes catiônico obtendo um aumento gradual do sinal de fluorescência com adição destas espécies ao sistema CAT-ANS, bem como o resultado aqui exposto.

5.2.4 Dicroísmo circular da CAT no processo de interação com TM

Para investigar alterações na estrutura secundária da CAT no processo de interação com o TM, realizou-se o ensaio por espectroscopia de dicroísmo circular (DC), pois trata-se de uma técnica útil para verificar a influência do processo de interação na estrutura secundária das proteínas. Além disto, pode também ser empregada para determinar os parâmetros de ligação, visto que a elipticidade da proteína depende da concentração do ligante, no entanto, os erros associados são geralmente maiores do que pelo método de fluorescência utilizado nesse estudo. Assim como para outras proteínas, como HSA e BSA, por exemplo, a CAT apresenta duas bandas negativas na região ultravioleta em 208 e 222 nm, características da estrutura α -helicoidal, enquanto o sinal em 215 nm representa a folha β (VARLAN; HILLEBRAND, 2010; HAO et al., 2015).

As medições de DC foram realizadas na presença de diferentes concentrações de TM (Fig. 9). Os resultados foram expressos em termos de elipticidade média do resíduo (EMR, Φ) em $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, de acordo com a seguinte equação:

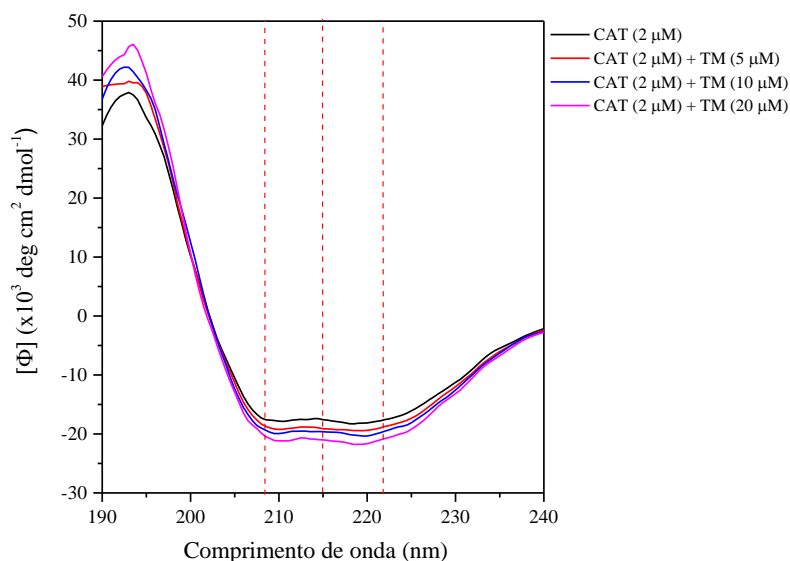
$$\text{EMR} = \frac{\text{DC}(\text{med}) \text{ observado}}{C_p \times n \times L \times 10} \quad \text{equação (8)}$$

Onde C_p é a concentração molar da proteína (2 μM), n é o número de resíduos de aminoácidos da CAT (506) e L é o comprimento do caminho óptico (0,1 cm). O conteúdo da α -hélice foi calculado a partir dos valores médios de elipticidade dos resíduos a 208 nm, usando a seguinte equação:

$$\alpha\text{-hélice (\%)} = \frac{-\text{EMR}_{208} - 4000}{33000 - 4000} \quad \text{equação (9)}$$

Sendo EMR_{208} a representação do valor de EMR, O EMR da forma beta na conformação randômica corresponde a 4000 e o valor de EMR da α -hélice pura é 33000, todos esses valores foram calculados a 208 nm (SANTOS et al., 2018).

Figura 9. Espectros de dicroísmo circular da CAT em diferentes concentrações de TM. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A adição de TM a CAT ocasionou uma redução dos sinais espectrais próximos as regiões avaliadas (208 a 222 nm) evidenciando a existência de interações eletrostáticas entre essas espécies durante o processo de interação, corroborante com o ensaio de força iônica que avalia esse tipo de interação (SANTOS et al., 2018). Este processo induz ao rearranjo e alterações conformacionais na estrutura secundária da CAT (RASHTBARI et al., 2017), sugerindo a estabilização da enzima pelo aumento de 8,76% no conteúdo de α -hélice (YEKTA et al., 2017), que podem afetar nas suas funções fisiológicas (Tabela 4).

Tabela 4. Alterações na estrutura secundária da CAT na ausência e presença de diferentes concentrações de TM.

[CAT] (μM)	[TM] (μM)	Proporção	α -hélice (%)
2,0	0	1:0	45,07
	2	1:2,5	48,55
	10	1:5,0	50,96
	20	1:10	53,83

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

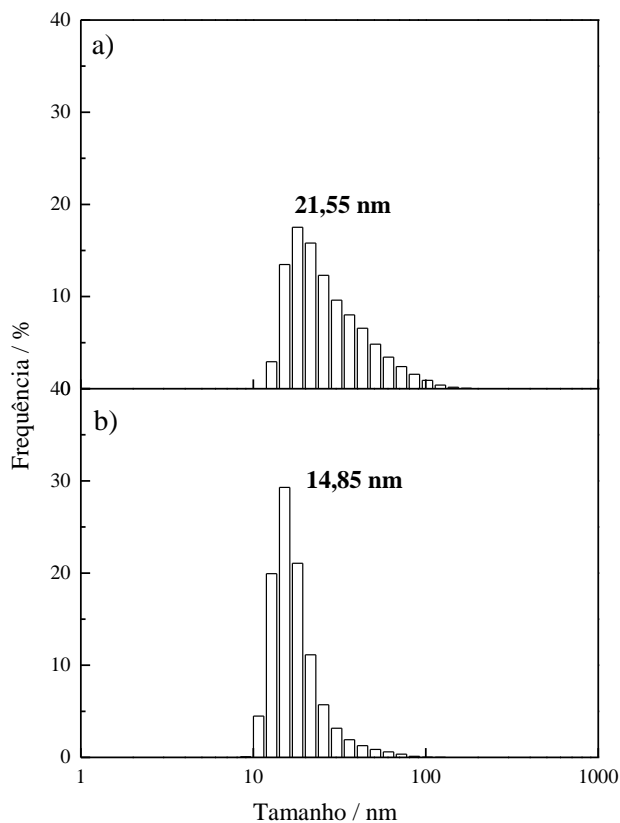
5.2.5 Dispersão dinâmica da luz (DLS) da CAT no processo de interação com TM

A dispersão dinâmica da luz é empregada para medir o tamanho da partícula em solução, a partir do coeficiente de difusão, desta forma, o tamanho de partícula obtido é chamado de dimensão "hidrodinâmica". O coeficiente de difusão de uma partícula depende não apenas da sua massa, mas também da forma e da composição química da superfície, uma vez que, esses parâmetros afetam as interações partícula-solvente e, portanto, o movimento browniano dessas partículas (LIU; PIERRE-PIERRE; HUO, 2012).

Assim, buscando monitorar o tamanho da enzima e do complexo enzima-ligante, realizou-se o ensaio de DLS em condições fisiológicas simuladas. Os resultados obtidos por meio desse estudo (Fig. 10) inferem que houve alteração no tamanho das moléculas possivelmente decorrentes de agregação e/ou mudanças conformacionais que ocorreram na proteína durante a interação (ZAMAN et al., 2017; SINGH et al., 2019).

De acordo com o valor dos raios hidrodinâmicos da CAT *in natura* (14,85 nm) e do complexo (21,55 nm), nota-se um aumento de aproximadamente 6 nm no raio hidrodinâmico após o processo de interação, sugerindo que houve alterações conformacionais sofridas por essa macromolécula durante o processo de interação ocasiona na formação de agregados da CAT, o que pode influenciar na atividade e funcionalidade desta enzima.

Figura 10. Raio hidrodinâmico da CAT. a) na presença TM (20 μ M); b) CAT in *natura*. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).

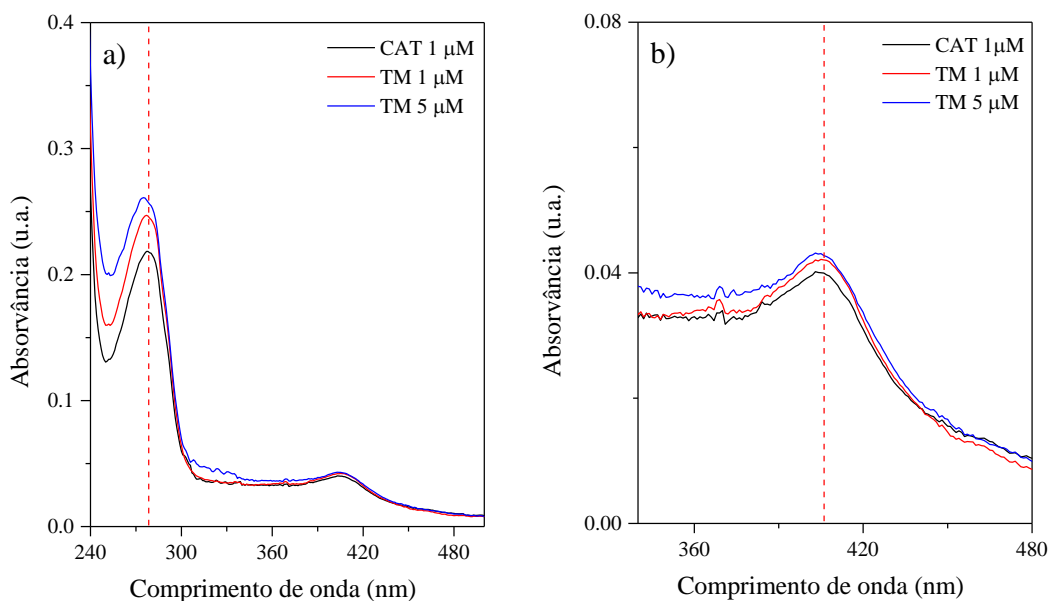


Fonte: elaborado pela autora, 2020.

5.2.6 Espectroscopia de absorção no UV-vis

A espectroscopia de absorção UV-vis é bastante eficaz para explorar também alterações estruturais das proteínas (YANG et al., 2013). A catalase possui duas bandas de absorção na faixa de comprimento de onda avaliada (200 a 500 nm), com uma banda principal próxima de 280 nm, que deriva principalmente de aminoácidos aromáticos, incluindo o triptofano e tirosina, e outra em aproximadamente 405 nm denominada banda Soret, a qual é proveniente das transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ no grupo heme (Fig. 11). Normalmente, a interação da proteína com uma espécie externa resulta na formação do complexo com alterações na absorvância e na posição dos picos de absorção (YEKTA et al., 2017; RASHTBARI et al., 2017).

Figura 11. Espectros de absorção de UV-vis da CAT na ausência e presença de TM. a) Sinal dos Resíduos de triptofano e tirosina e banda de Soret; b) Expansão da região da banda de Soret. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Observou-se um crescimento gradual nas bandas de absorção da CAT nas diferentes concentrações de TM, como também um leve deslocamento para menores comprimentos de onda da ordem de 3 nm (deslocamento hipsocrômico). Isso é um indício de que há mudanças na polaridade ao redor dos resíduos de triptofano e tirosina, assim como, alteração na cadeia peptídica da CAT com conseqüente alteração na hidrofobicidade (ZAMAN et al., 2017).

Portanto, a interação entre essas espécies conduz a variações conformacionais na estrutura protéica, principalmente próximo aos resíduos de triptofano, os quais estão sujeitos a maior variação em decorrência do efeito da variação da polaridade do microambiente (COLLAZOS et al., 2019). É possível notar uma perturbação do pico de Soret (405 nm) resultante de alterações no microambiente do grupo heme e alterações estruturais do sítio ativo da enzima pelo TM (DEHGHAN et al., 2019), cuja absorção nessa região foi negligenciada por não influenciar consideravelmente (SANTOS et al., 2018).

5.3 Transferência de energia por ressonância de Förster (FRET)

O FRET é um fenômeno físico que depende da distância na qual a energia é transferida de um doador (fluoróforo) a um receptor (ligante) que geralmente emite em comprimento de onda maior (RASHTBARI et al., 2020). É frequentemente utilizado na química de proteínas para calcular a distância do local de ligação entre o resíduo de aminoácido da proteína com a molécula de interesse e, depende das seguintes condições: (i) o doador deve produzir fluorescência intrínseca; (ii) o espectro de absorção do receptor deve se sobrepor ao espectro de emissão de fluorescência do doador e (iii) a distância entre o doador e o receptor deve ser inferior a 8 nm. Assim, o FRET é uma técnica sensível para investigar uma variedade de fenômenos biológicos que produzem alterações na proximidade da região de interação a nível molecular (SEKAR; PERIASAMY, 2003; CHENG; JIANG; LIU, 2013).

Neste trabalho, as equações utilizadas no tratamento dos dados de FRET são as seguintes:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6} \quad \text{equação (5)}$$

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

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) dy} \quad \text{equação (7)}$$

onde, E é a eficiência de transferência de energia (equação 5), R_0 a distância crítica de Förster (equação 6), J é a integral de sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência do doador e o espectro de absorção do receptor (equação 7), K^2 fator de orientação que está diretamente relacionado com a geometria do dipolo entre o doador e o receptor, n índice de refração do meio, Φ rendimento quântico da proteína (catalase) e r_0 a distância entre o doador e o receptor.

De acordo com os resultados (Tabela 5), houve transferência de energia entre o resíduo de triptofano da CAT para o TM em ambas as proporções empregadas, uma vez que o doador e o receptor estão dentro do intervalo de distância crítica (8 nm), indicando que a transferência de energia ocorreu com alta probabilidade (CHI et al., 2010).

Tabela 5. Parâmetros de FRET obtidos da sobreposição espectral entre o doador e receptor em diferentes proporções, onde $K^2 = 2/3$, $n = 1,36$ e $\Phi = 0,15$. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).

[CAT] (μM)	CAT:TM	J ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{nm}^4$)	E (%)	R_0 (nm)	r_0 (nm)
2,5	1:4	$5,32 \times 10^{-15}$	2,48	2,26	4,18
5	1:1	$2,56 \times 10^{-15}$	0,62	2,00	4,68

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Empregando uma proporção de 1:10 Xu e colaboradores (2014) avaliou a transferência de energia entre a CAT e 6-benzilaminopurina encontrando os seguintes valores para as constantes $E = 37,2\%$, $R_0 = 2,02$ nm e $r_0 = 2,21$ nm. Enquanto Zhang; Jin (2008) encontraram os valores descritos a seguir utilizando uma proporção CAT:mesilato de pazufloxacina (1:6), $E = 4,2\%$, $R_0 = 2,31$ nm e $r_0 = 3,89$ nm. Quando comparados com os dados obtidos observa-se que a transferência de energia é maior, visto que as proporções do ligante utilizadas são bem maiores. A distância crítica de Förster foi similar para todas as proporções avaliadas e estudadas, enquanto que a distância (r_0) entre a CAT e o TM foi maior que a encontrada na literatura para a CAT e outros ligantes.

5.4 Avaliação de diferentes espécies no processo de interação

No plasma, existem algumas espécies que são essenciais ao corpo humano, as quais podem influenciar no desempenho das funções exercidas pelas biomoléculas. A CAT desempenha um papel importante na proteção dos tecidos contra efeitos tóxicos principalmente do H_2O_2 e sua atividade pode ser alterada pela presença de alguns compostos (ZHANG et al., 2015; ZHANG et al., 2013). Essas espécies podem ser nomeadas inibidores quando reduzem a funcionalidade da macromolécula, interagindo de três maneiras distintas, dentre elas a inibição competitiva, não competitiva e mista (KHATAEE et al., 2019).

Nesse estudo, avaliaram-se diferentes inibidores, competitivos e não competitivos, como também algumas espécies presentes no organismo buscando verificar a influência destes na interação CAT-TM. As constantes de ligação do complexo na presença de íons estão expostas na Tabela 6.

Tabela 6. Avaliação da influência de diferentes espécies na constante de ligação do complexo. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).

Espécie	K_b ($10^4 M^{-1}$)	r	n	K_b'/K_b	Tipo de inibição
Referência	$3,14 \pm 0,01$	0,9984	$1,14 \pm 0,02$	1,00	-
Fosfato	$0,97 \pm 0,02$	0,9830	$1,05 \pm 0,06$	0,31	-
Glicose	$3,28 \pm 0,01$	0,9976	$1,14 \pm 0,03$	1,04	-
Brucina	$1,23 \pm 0,02$	0,9923	$1,03 \pm 0,04$	0,39	-
Ca(II)	$1,38 \pm 0,01$	0,9970	$1,04 \pm 0,03$	0,44	-
Fe(III)	$1,18 \pm 0,01$	0,9954	$1,02 \pm 0,03$	0,37	-
Mg(II)	$1,21 \pm 0,02$	0,9924	$0,98 \pm 0,04$	0,39	-
Fe(II)	$0,80 \pm 0,01$	0,9960	$0,92 \pm 0,03$	0,26	-
Zn(II)	$1,27 \pm 0,01$	0,9969	$0,97 \pm 0,02$	0,40	Competitivo
Ag(I)	$0,12 \pm 0,02$	0,9891	$0,75 \pm 0,04$	0,04	Competitivo
Cu(II)	$0,90 \pm 0,02$	0,9922	$1,00 \pm 0,04$	0,28	Competitivo
Cianeto	$1,21 \pm 0,01$	0,9950	$0,98 \pm 0,03$	0,39	Não competitivo
NaN ₃	$1,52 \pm 0,01$	0,9959	$1,05 \pm 0,03$	0,48	Não competitivo
Hidroxilamina	$0,81 \pm 0,02$	0,9922	$0,99 \pm 0,04$	0,26	Não competitivo
Quercetina	$1,77 \pm 0,01$	0,9952	$1,07, \pm 0,03$	0,56	Não competitivo

K_b' = constante de ligação na presença de uma dada espécie competidora.

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

De acordo com os resultados, ficou evidente que as constantes de ligação de CAT-TM diminuíram na presença da maioria das espécies avaliadas, exceto a glicose. Sugerindo que a presença dessas espécies no plasma, tanto quanto os inibidores avaliados influenciam na afinidade do complexo CAT-TM, o que implica na ocorrência de competição ou possível alteração conformacional ao redor do sítio de ligação na presença destes.

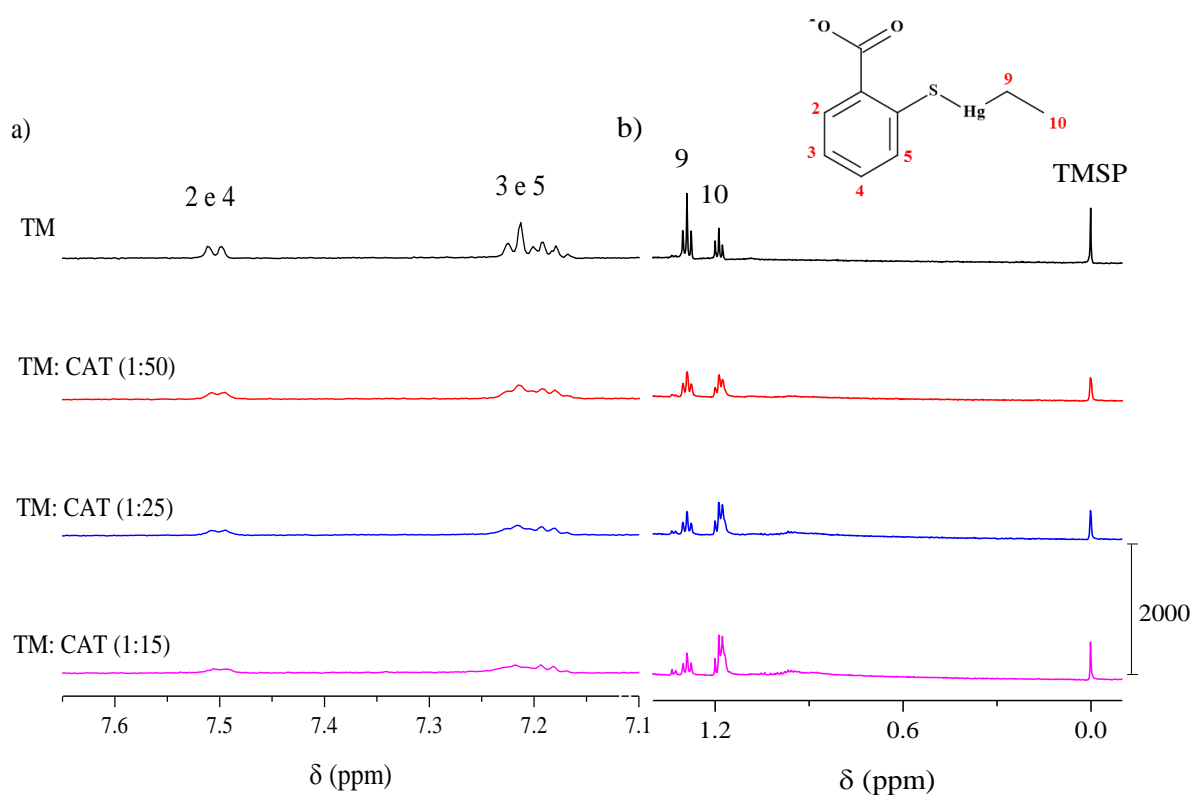
5.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

O estudo por RMN ¹H (Fig. 12) possibilita monitorar do processo de interação sob a perspectiva do ligante, ou seja, a partir da comparação dos parâmetros dos espectros do TM livre e ligado à macromolécula. Com a utilização dessa técnica pode-se mensurar, em

alguns casos, a região de interação do ligante com a CAT a partir da variação de deslocamento químico de cada hidrogênio.

Pode-se observar uma redução na intensidade e na resolução dos picos com o aumento da concentração da macromolécula, sendo associado ao processo de interação existente entre essas espécies apesar de não haver deslocamentos químicos. Como a redução foi proporcional para todos os hidrogênios pode-se inferir que a interação é com a molécula de forma geral, sem uma região específica e desta forma, todos os hidrogênios foram afetados nesse processo.

Figura 12. Espectro de RMN ^1H do TM na presença de diferentes proporções de CAT. Expansão das diferentes regiões (a e b). Condições: 30°C e pH = 7,4 (Fosfato 10 mM).



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

5.6 Estudos cinéticos de inibição da CAT frente ao TM

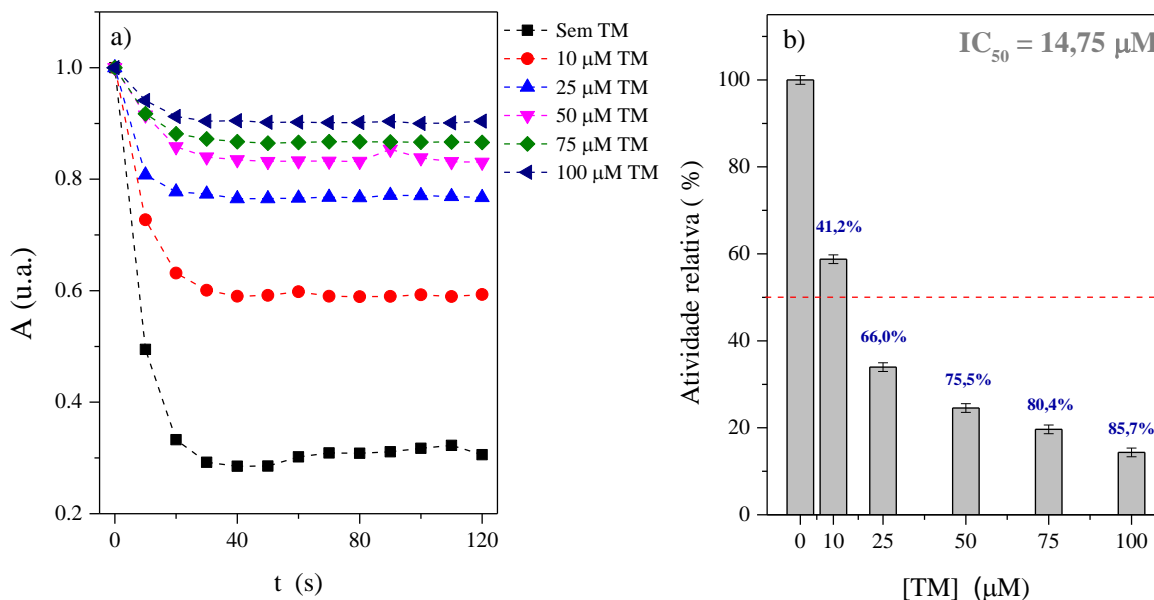
O papel desempenhado pelas biomoléculas está intimamente relacionado com a sua estrutura, de modo que uma variação estrutural pode afetar a função fisiológica destas (HU; DA, 2014). De acordo com os estudos realizados anteriormente existem alterações conformacionais na estrutura da CAT durante o processo de interação com o TM, que podem ser responsáveis pela diminuição da atividade enzimática. Em virtude disso, realizou-se o estudo cinético *in vitro* sob condições fisiológicas, buscando verificar se de fato, tais mudanças afetaram a atividade catalítica da enzima.

A atividade da CAT (0,1 μM) foi avaliada por espectroscopia de absorção no UV-vis por meio do monitoramento da decomposição de H_2O_2 a 240 nm. Para avaliar os possíveis efeitos do TM na atividade da CAT, a mesma foi incubada com diferentes concentrações de TM. Com os dados obtidos nesse ensaio foi possível calcular a atividade relativa da CAT (Fig. 13) utilizando a seguinte equação:

$$\text{atividade CAT (\%)} = \frac{\Delta A_x}{\Delta A_0} \times 100 \quad \text{equação (8)}$$

onde ΔA_x e ΔA_0 são respectivamente os valores da redução de absorção em 240 nm da solução de peróxido de hidrogênio e CAT com e sem o TM (HAO et al., 2018).

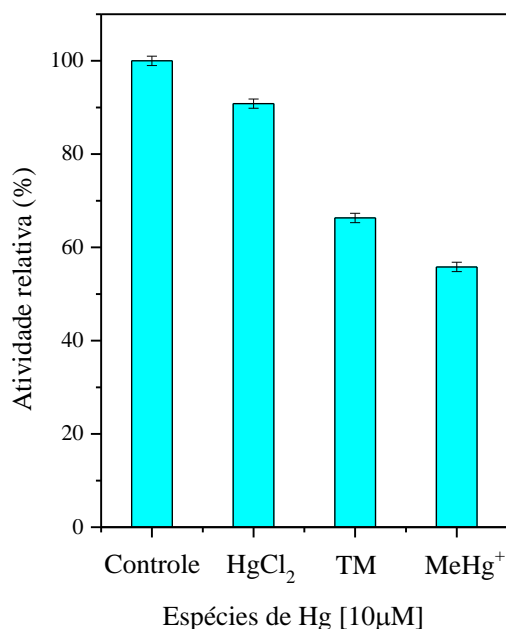
Figura 13. Efeito de diferentes concentrações de TM na decomposição de H_2O_2 pela CAT. a) Cinética de decomposição do peróxido; b) Atividade relativa. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Pôde-se observar uma redução de cerca de 85% na atividade da CAT em função da adição de TM ao sistema (Fig. 12), indicando que o mesmo tem uma ação inibitória significativa na decomposição de H_2O_2 , corroborando com o valor de IC_{50} calculado que foi de $14,75 \mu M$. Assim, propiciando indícios para inferir que a diminuição na atividade da CAT pode ser causada pelas alterações conformacionais evidenciadas anteriormente devido ao processo de interação. Em estudo realizado por Chen e colaboradores (2015) que avaliou a interação do mercúrio inorgânico (Hg(II)) com a CAT, foi obtido um valor de IC_{50} de aproximadamente $260 \mu M$, indicando que o TM é um inibidor muito mais efetivo que o Hg(II). O que está de acordo com o resultado obtido pela análise de absorção no UV-vis (Fig. 14), onde avaliou-se a influência das diferentes espécies de mercúrio na atividade da CAT. O metil mercúrio foi a espécie que mais reduziu a atividade enzimática, o que é esperado pois trata-se da espécie mais tóxica de Hg (DÓREA, 2017b).

Figura 14. Efeito das diferentes espécies de Hg na decomposição de H_2O_2 pela CAT. Condições: $30^\circ C$ e $pH = 7,4$ (Tris-HCl 50 mM , 100 mM NaCl).



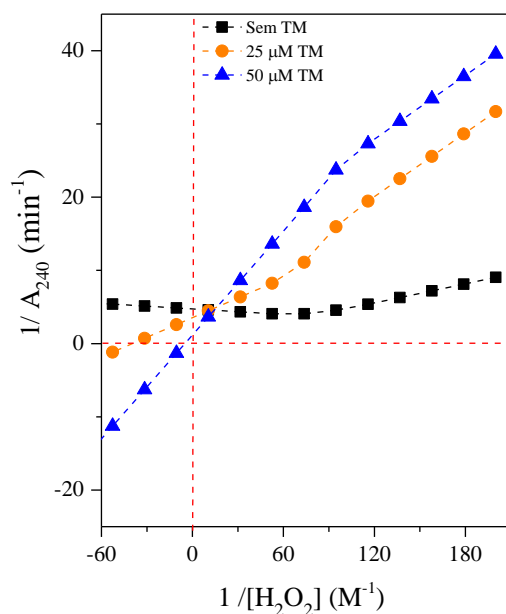
Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Com base no tratamento do gráfico duplo recíproco (também conhecido como Lineweaver–Burk) determinou-se o tipo de inibição. A Fig. 15 mostra as linhas

convergindo no mesmo ponto no eixo da abscissa (x) enquanto o eixo do intercepto (y) aumenta em função da concentração de TM. De acordo com gráfico de Lineweaver-Burk, o declive da linha resultante é $K_H / V_{máx}$, o intercepto é $1/V_{máx}$, enquanto que o eixo da abscissa (x) equivale a $-1/K_M$ (Xu et al., 2014).

As evidências da inibição mista são a modificação simultânea na constante de Michaelis (K_M) e na velocidade máxima ($V_{máx}$) quando o inibidor é adicionado (SHAHRAKI; DELARAMI; SAEIDIFAR, 2019). A adição gradual de TM a CAT ocasionou um aumento tanto nos valores de $V_{máx}$ que variou de $6,76 \times 10^{-3}$ a 0,178, quanto nos valores de K_M aparente cuja variação foi de 4,77 a 1,07. Sendo assim, o TM atua como um inibidor misto da CAT, isso significa que o TM pode se ligar a CAT livre, bem como ao complexo enzima-substrato para reduzir a catálise, tendo efeitos inibitórios tanto competitivos quanto não competitivos (YEKTA et al., 2018; NELSON; COX, 2014).

Figura 15. Gráfico Lineweaver-Burk para catalase. Condições: 30°C e pH = 7,4 (Tris-HCl 50 mM, 100 mM NaCl).



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Por fim, a Tabela 7 faz uma comparação entre diferentes estudos espectroscópicos existentes na literatura que avaliaram a interação da catalase frente a diferentes ligantes,

ressaltando os principais parâmetros como, constante de ligação, tipo de forças existentes, distância entre o ligante e a enzima durante a interação e o tipo de inibição encontrado. De acordo com os dados apresentados, torna-se notável que a CAT age pelos diferentes tipos de inibição reversíveis existentes, sendo majoritariamente por via não competitiva. Além de apresentar magnitude da interação intermediária para grande parte dos ligantes avaliados.

Tabela 7. Comparação da interação de diferentes ligantes com a catalase simulando condições fisiológicas.

Ligante	Tampão e pH	K_{SV} ($10^4 M^{-1}$)	K_b ($10^4 M^{-1}$)	Forças intermoleculares	r_0 (nm)	Tipo de inibição	Referência
Bifendato (DDB) ou análogos	Fosfato 200 mM (pH 7,4)	3,13	2,87	Interações Hidrofóbicas	2,74	-	WANG et al., 2013
Bicyclol	Fosfato 200 mM (pH 7,4)	1,05	0,96	Interações Hidrofóbicas	2,84	-	WANG et al., 2013
Aspirina	Fosfato 50 mM (pH 7,0)	2,00	100	Lig. de hidrogênio e forças de Van der Waals	-	-	KOOHSHEKAN et al., 2016
Ácido salicílico	Fosfato 200 mM (pH 7,2)	2,65	4,46	Lig. de hidrogênio e forças de Van der Waals	2,62	-	WU, 2007
Quercetina	Fosfato 50 mM (pH 7,5)	21,8	16,04	Interações Hidrofóbicas	-	Não competitivo	RASHTBARI et al., 2017
2-mercaptobenzimidazol	Fosfato 200 mM (pH 7,4)	2,25	342	Lig. de hidrogênio e forças de Van der Waals	-	Não competitivo	TENG et al., 2014
Oxalli-paládio	Fosfato 50 mM (pH 7,0)	0,32	46,60	Forças eletrostáticas	-	Não competitivo	GHOLAMIAN et al., 2017
Deferasirox	Fosfato 50 mM (pH 7,0)	0,90	1700	Interações Hidrofóbicas	-	Competitivo	MORADI et al., 2015
Oxitetraciclina	Fosfato 200 mM (pH 7,4)	1,78	7,09	Lig. de hidrogênio e forças de Van der Waals	6,48	-	CHI; LIU; ZHANG, 2010
Farnesiferol C	Fosfato 50 mM (pH 7,4)	5,30	11,70	Interações Hidrofóbicas	-	Misto	YEKTA et al., 2018
Resveratrol	Fosfato 50 mM (pH 7,0)	14,0	0,49	Lig. de hidrogênio e forças de Van der Waals	-	Não competitivo	RASHTBARI et al., 2017
Pioglitazona	Fosfato 50 mM (pH 7,0)	5,00	5000	Interações Hidrofóbicas	-	-	YEKTA et al., 2017
Complexos de platina	Fosfato 50 mM (pH 7,4)	0,34	427000	Lig. de hidrogênio e forças de Van der Waals	-	-	GHOBADI et al., 2018
Miricertina	Fosfato 200 mM (pH 7,4)	10,15	22,34	Lig. de hidrogênio e interações eletrostáticas	6,07	-	ZHU et al., 2007
Ácido elágico	Fosfato 50 mM (pH 7,0)	2,2	47350	Lig. de hidrogênio e interações eletrostáticas	2,83	-	RASHTBARI et al., 2020
Mesilato de pazufloxacina	Fosfato 200 mM com NaCl 100mM (pH 7,4)	4,36	4,00	Lig. de hidrogênio e interações eletrostáticas	3,89	-	ZHANG; JIN, 2008
Sunset yellow	Fosfato 50 mM (pH 7,0)	0,69	0,26	Lig. de hidrogênio e forças de Van der Waals	-	Não competitivo	DEHGHAN et al., 2019
6-benzilaminopurina	Tampão Tris 50 mM com NaCl 100 mM (pH 7,4)	0,77	0,72	Lig. de hidrogênio e forças de Van der Waals	2,21	Não competitivo	XU et al., 2014

Base de Schiff [Pd(II)]	Tampão Tris 50 mM com NaCl 100 mM (pH 7,4)	12,0	4,00	Lig. de hidrogênio e forças de Van der Waals	-	Misto	SHAHRAKI; DELARAMI; SAEIDIFAR, 2019
Base de Schiff [Zn(II)]	Tampão Tris 50 mM com NaCl 100 mM (pH 7,4)	22,5	63,1	Lig. de hidrogênio e forças de Van der Waals	-	Misto	SHAHRAKI; DELARAMI; SAEIDIFAR, 2019
Hg(II)	Tampão Tris 50 mM com NaCl 100 mM M (pH 7,4)	1,03	0,0013	Lig. de hidrogênio e forças de Van der Waals	-	-	CHEN et al., 2015
Timerosal	Tampão Tris 50 mM com NaCl 100 mM (pH 7,4)	0,86	2,59	Lig. de hidrogênio, forças de Van der Waals e eletrostáticas	4,18	Misto	Este trabalho

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

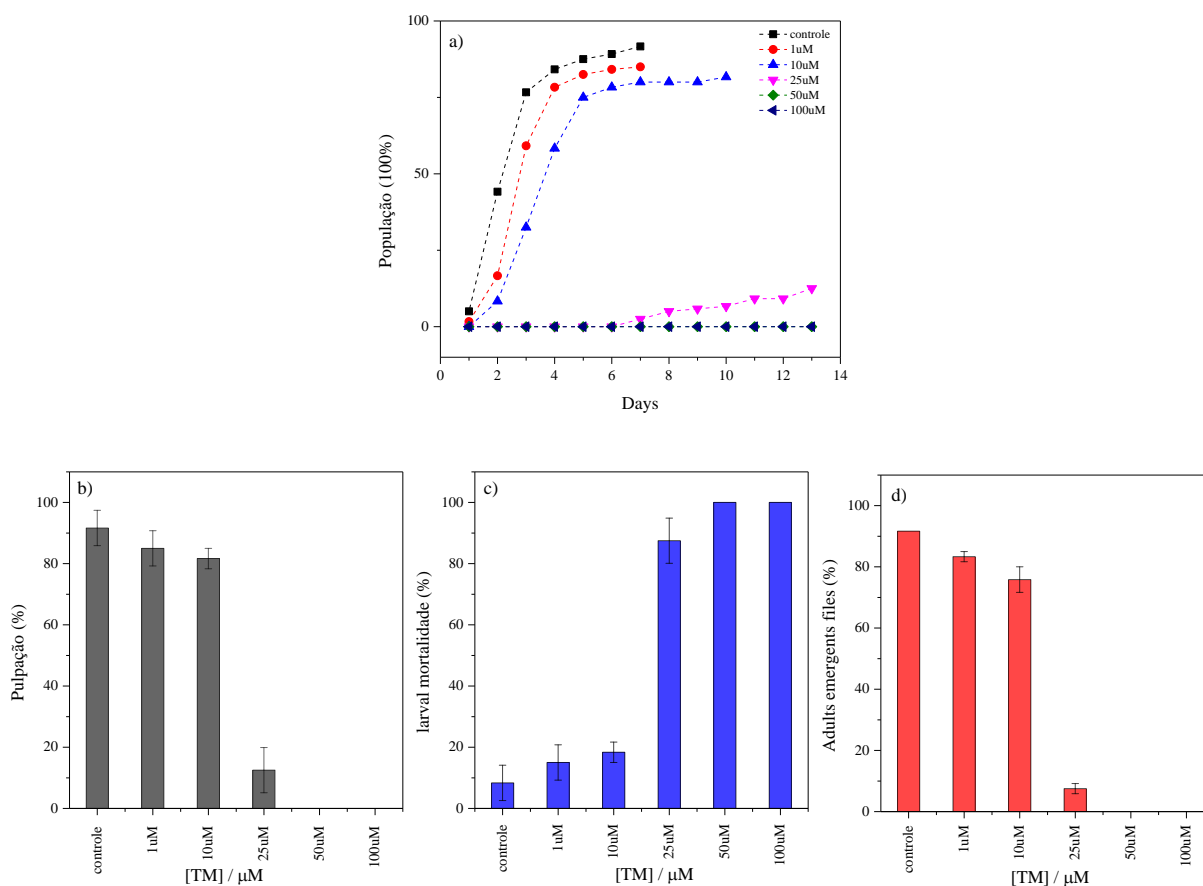
5.7 Estudos preliminares de toxicidade do TM *in vivo*

5.7.1 Modelo empregando *Drosophila melanogaster*

Em estudos realizados anteriormente por NIEHOFF et al. (2015) foi avaliado os efeitos de HgCl(II), MeHgCl e TH em *drosophilas*, verificando-se que as três espécies investigadas apresentam diferenças significativas com relação à passagem da barreira hematoencefálica. Sendo que as espécies orgânicas foram capazes de ultrapassá-la, uma vez que possuem polaridade menor e, portanto, toxicidade maior quando comparado ao mercúrio inorgânico, causando danos irreversíveis ao sistema nervoso, especialmente nos primeiros estágios de desenvolvimento (ABNOOS et al., 2013; MAHAPATRA et al., 2010). Esses estudos sugerem que a *Drosophila* é um modelo confiável para estudos *in vivo* a fim de avaliar os mecanismos moleculares associados à citotoxicidade do TM e seu efeito nos sistemas de neurotransmissores monoaminérgicos (BIANCHINI et al., 2019).

Larvas na 1ª fase foram expostas ao meio contendo TM, objetivando avaliar o efeito dessa espécie de Hg no desenvolvimento das moscas, uma vez que os estágios iniciais da vida são suscetíveis aos efeitos adversos do mercúrio (KORBAS et al., 2012). Foi possível observar um atraso significativo no desenvolvimento das larvas com o aumento da concentração de TM ao meio, sendo que em maiores concentrações as larvas não chegaram na 3ª fase, havendo assim uma letalidade larval acentuada ($LC_{50} = 17,4 \mu\text{M}$) (Fig. 16). Essa letalidade pode estar associada a diferentes fatores, dentre eles, o acúmulo de Hg no sistema nervoso central que ocasiona déficits neuroquímicos e comprometimentos comportamentais (BIANCHINI et al., 2019) ou até mesmo danos ao DNA (MOJICA-VÁZQUEZ et al., 2019).

Figura 16. Gráficos de avaliação da letalidade larval, pupal e de atrasos no desenvolvimento monitorados durante 13 dias consecutivos. a) Gráfico de pupação por dia; b) Pupação total; c) Mortalidade larval; d) Controle de adultos emergentes.



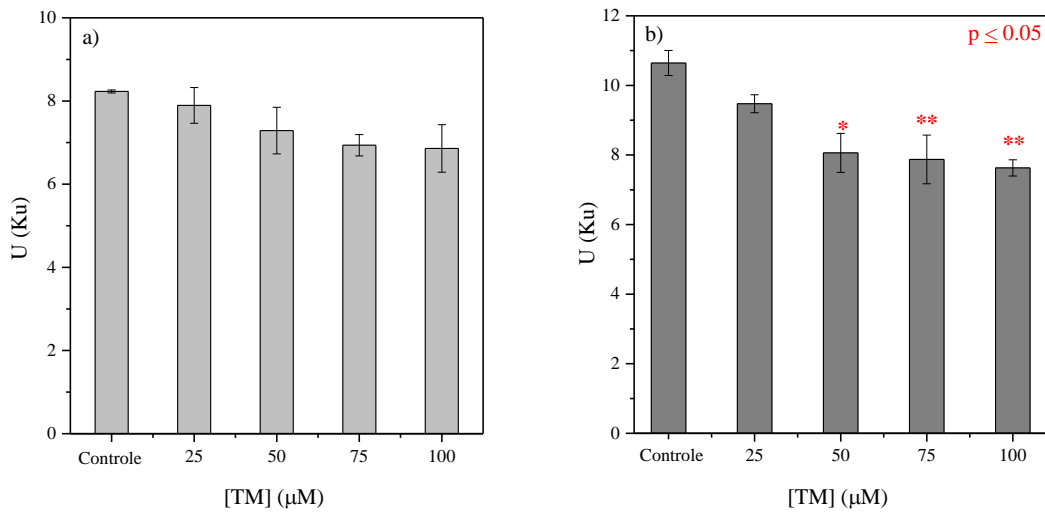
Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Em estudos anteriores realizados em *Drosophila* verificou-se que tanto o MeHg^+ quanto o EtHg^+ , se acumulam no cérebro, levando a dificuldades comportamentais e neuroquímicas, além de observar que os níveis de dopamina sofreram alterações na presença de TM (BIANCHINI et al., 2019). A interação de espécies de Hg com nucleofílos moles de biomoléculas é um dos fatores responsáveis pela diminuição da capacidade antioxidante e consequente aumento da geração das espécies reativas de oxigênio (FARINA; ASCHNER; ROCHA, 2011), concordante com observações de que o estresse oxidativo representa um evento central na mediação da neurotoxicidade induzida por MeHg^+ (RAND; DAO; CLASON, 2009).

Desta forma, optou-se por avaliar a atividade da CAT presente nas *Drosophilas* (Fig. 17), visto que muitas das defesas imunológicas inatas desses invertebrados exibem semelhanças funcionais significativas com o sistema imunológico dos vertebrados, e a CAT que está presente no cérebro e fígado, faz parte do sistema de defesa antioxidante (MULCAHY et al., 2011).

Para essa finalidade realizou-se adicionalmente um ensaio piloto com *drosophilas* machos, objetivando avaliar a resistência desses quando expostos a diferentes concentrações de TM e determinar quais destas seriam empregadas.

Figura 17. Resultados prévios da atividade da catalase em *Drosophilas* sob 48 h de exposição. a) Na fase larval; b) Machos na fase adulta.



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

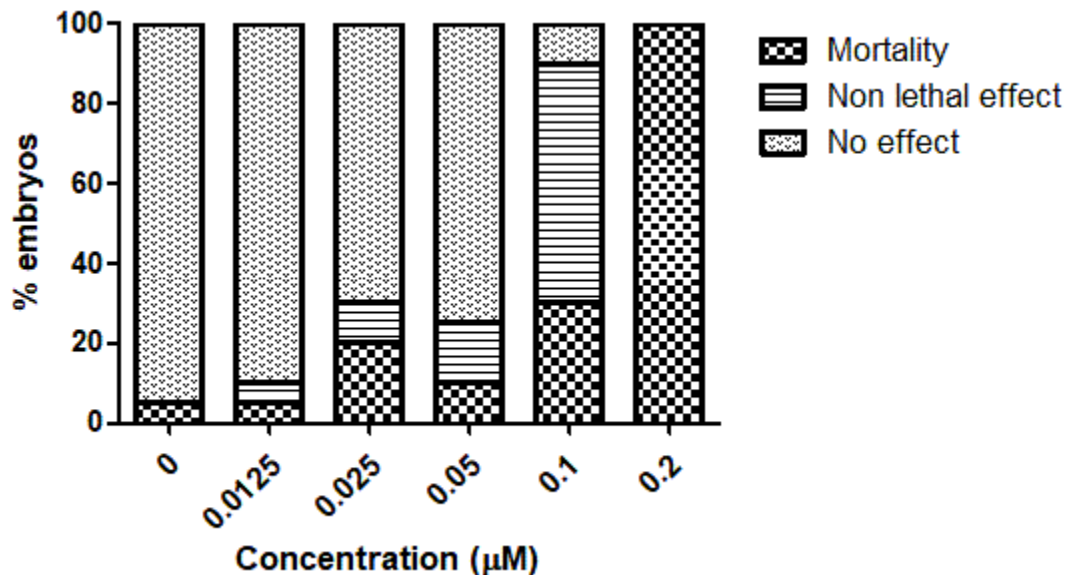
Foi possível observar uma redução gradual da atividade enzimática nas *Drosophilas* machos adultos, contudo na fase larval não foram observadas diferenças significativas. Isso pode estar relacionado ao fato de que como foi preparado um homogenato das moscas tanto na fase adulta quanto na fase larval, todo seu organismo foi analisado, o que pode ter influenciado, já que as larvas estão em etapas de desenvolvimento. Em contrapartida, nos estágios iniciais a letalidade pode estar associada a outros fatores, dentre eles os danos ao DNA, que serão avaliados posteriormente. Também pretende-se direcionar os estudos para o sistema nervoso central e corpo adiposo, um órgão

metabolicamente semelhante ao fígado humano, devido à majoritariedade de catalases nesses sistemas.

5.7.2 Modelo empregando ZF

De acordo com os resultados obtidos nesse ensaio pôde-se notar os efeitos das amostras testadas em embriões e larvas de ZF no final de um período de exposição de 96 h (Fig. 18). Na concentração mais alta testada (0,2 μM), o TM causou alta mortalidade embrionária, além da coagulação (Figura 19d) e falta de batimento cardíaco mediante a exposição. Com a diminuição na concentração, a letalidade também diminuiu, enquanto os efeitos não letais foram predominantes até 0,05 μM ; esses efeitos não letais observados, foram malformação ocular, malformação otólita, edema pericárdico e retardo na eclosão dos ovos (Figura 19e, 19f e 19g, respectivamente), todos associados a teratogenicidade ocasionada por essa espécie de mercúrio.

Figura 18. Visão geral dos efeitos cumulativos do timerosal em embriões e larvas de peixe-zebra após 96 h de exposição. Sem efeito: características morfológicas semelhantes aos organismos de controle; Efeito não letal: presença de endpoints subletais; Mortalidade: presença de desfechos de letalidade.

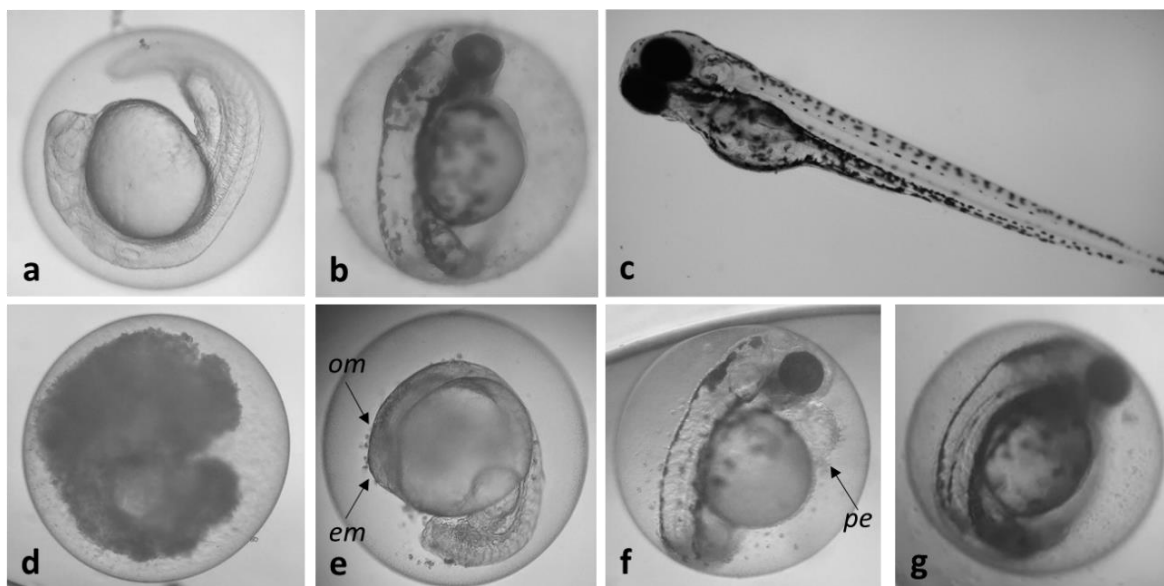


Fonte: elaborado por Juliana Souza e Davi Farias (DBM – UFPB), 2020.

Os resultados do ensaio de embriotoxicidade em embriões de ZF expostos a concentrações crescentes de TM durante 96 h, mostrou alguns efeitos não letais sofridos

como a malformação ocular e de otólito, atraso na incubação do ovo, edema pericárdico, bem como efeitos letais coagulação de ovo e a falta de batimento cardíaco. O LC_{50} calculado para o timerosal foi de $0,11 \mu\text{M}$.

Figura 19. Efeitos letais e não letais observados em embriões e larvas de ZF após exposição a concentrações crescentes de TM. (a), (b) e (c) Organismos controle com desenvolvimento normal após 24, 72 e 96 h expostos apenas ao meio E3; (d) embrião coagulado com 24 h de idade exposto a $0,05 \mu\text{M}$ de TM; (e) embrião de 24 h com malformação ocular e otólita (em e om, respectivamente) exposto a $0,2 \mu\text{M}$; (f) embrião de 72 h com edema pericárdico (ep) exposto a $0,05 \mu\text{M}$; e (g) embrião de 96 h com atraso de incubação exposto a $0,1 \mu\text{M}$.

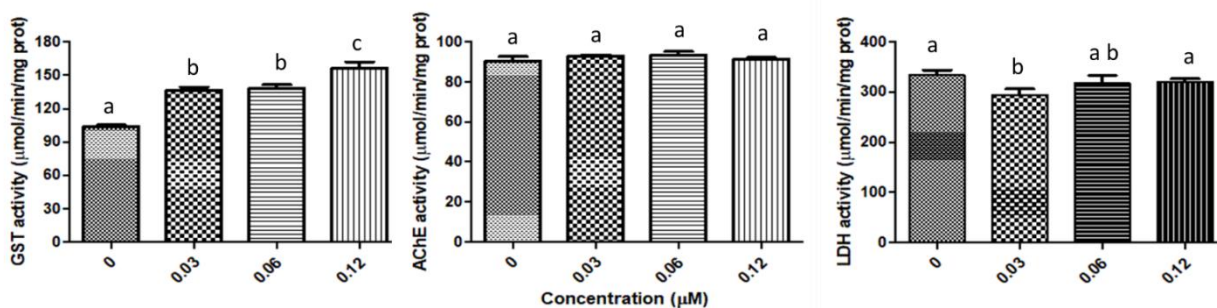


Fonte: elaborado por Juliana Souza e Davi Farias (DBM – UFPB), 2020.

Inicialmente tentando esclarecer os mecanismos de toxicidade do TM neste sistema, três enzimas biomarcadoras - colinesterase, lactato desidrogenase e glutathione S-transferase (GST)- foram avaliadas. Os níveis de expressão dessas enzimas podem ser alterados por espécies tóxicas e, portanto, é possível associar essas alterações a mecanismos particulares de toxicidade. Na Figura 20 é mostrada a quantificação das atividades de biomarcadores em larvas de ZF após a exposição ao TM durante 96 h. O composto de mercúrio mudou consistentemente apenas os níveis de GST de maneira dependente da concentração. O principal papel da família GST é a desintoxicação dos xenobióticos, visto que a GST sofreu alterações significativas e assim como a CAT trata-se de uma enzima antioxidante que possui átomos de enxofre em sua estrutura, pelo qual o mercúrio tem forte

afinidade podendo interromper a atividade de proteínas que contenham esse átomo (FREITAS; JUNIOR; MASUDA, 2008; FARINA; ASCHNER; ROCHA, 2011). Desta forma, espera-se que a CAT presente no ZF também sofra alterações quando avaliada, pois o fígado é um dos principais órgãos de acúmulo de tóxicos, e o mesmo possui uma grande quantidade dessa enzima (CARDOSO; OLIVEIRA; ROCHA, 2019). E tanto o fígado quanto o cérebro e rins estão relacionados a possíveis mecanismos de desintoxicação devido à transformação de MeHg^+ em espécies menos tóxicas de Hg, no entanto os detalhes sobre tais processos biológicos ainda são desconhecidos (FENG et al., 2015).

Figura 20. Atividades de GST, AChE e LDH (valor médio \pm desvio padrão) em larvas de ZF após 96 h de exposição ao TM. a, b, c Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (ANOVA seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: elaborado por Juliana Souza e Davi Farias (DBM – UFPB), 2020.

6. CONCLUSÕES

O processo de interação foi investigado com base em estudos biofísicos, confirmando-se por meio dos ensaios que o TM inibe a fluorescência da catalase, além de provocar alterações conformacionais na estrutura proteica e consequente redução na atividade desempenhada pela mesma na decomposição de H_2O_2 . Dessa forma, concordante com os ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados é possível constatar a toxicidade associada ao TM frente à CAT que é um modelo biológico relevante, visto que diversas doenças estão relacionadas ao desequilíbrio da sua função. Portanto, esses resultados podem auxiliar na compreensão de possíveis efeitos relacionados à desordem causadas pelo TM no organismo, em particular os efeitos associados ao estresse oxidativo ocasionado, dentre outros fatores, pela deficiência da catalase.

6.1 PERSPECTIVAS

- a)* Avaliar a formação do complexo por estudos teóricos (*docking* e dinâmica molecular);
- b)* Monitorar a atividade da CAT em *drosophilas* fêmeas e no ZF;
- c)* Avaliar o processo de interação e/ou reação do TM com o DNA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMIR, Mohd et al. In silico prediction, characterization, molecular docking, and dynamic studies on fungal SDRs as novel targets for searching potential fungicides against Fusarium wilt in tomato. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1038, 2018.

ABNOOS, Hamideh et al. Developmental study of mercury effects on the fruit fly (*Drosophila melanogaster*). **Interdisciplinary Toxicology**, v. 6, n. 1, p. 34-40, 2013.

ACHARYA, D. P., SANGUANSRI, L., & AUGUSTIN, M. A. Binding of resveratrol with sodium caseinate in aqueous solutions. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, 1050–1054, 2013.

AGRAWAL, Piyush et al. Benchmarking of different molecular docking methods for protein-peptide docking. **BMC bioinformatics**, v. 19, n. 13, p. 426, 2019.

AHMAD, Shahbaz; MAHMOOD, Riaz. Mercury chloride toxicity in human erythrocytes: enhanced generation of ROS and RNS, hemoglobin oxidation, impaired antioxidant power, and inhibition of plasma membrane redox system. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 6, p. 5645-5657, 2019.

ALANAZI, Amer M.; ABDELHAMEED, Ali Saber. A spectroscopic approach to investigate the molecular interactions between the newly approved irreversible ErbB blocker " Afatinib" and bovine serum albumin. **PloS one**, v. 11, n. 1, 2016.

ALANAZI, Amer M.; ABDELHAMEED, Ali Saber. A spectroscopic approach to investigate the molecular interactions between the newly approved irreversible ErbB blocker " Afatinib" and bovine serum albumin. **PloS one**, v. 11, n. 1, 2016.

ALANAZI, Mohammed M. et al. Mechanistic interaction study of 5, 6-Dichloro-2-[2-(pyridin-2-yl) ethyl] isoindoline-1, 3-dione with bovine serum albumin by spectroscopic and molecular docking approaches. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 3, p. 341-347, 2019.

ALLOCATI, Nerino et al. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. **Oncogenesis**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2018.

ARROYO-MAYA, Izlia J. et al. Characterization of flavonoid-protein interactions using fluorescence spectroscopy: Binding of pelargonidin to dairy proteins. **Food chemistry**, v. 213, p. 431-439, 2016.

ARANDAS, Anderson Marcelino de. **Investigação das propriedades fotofísicas do Morin complexado com cátions de magnésio bivalente e cério trivalente**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ARZENŠEK, Dejan; PODGORNIK, Rudolf; KUZMAN, Drago. Dynamic light scattering and application to proteins in solutions. In: Seminar; University of Ljubljana: Ljubljana, Slovenia. 2010. p. 1-18.

AUSLÄNDER, Simon; AUSLÄNDER, David; FUSSENEGGER, Martin. Synthetic biology—the synthesis of biology. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 23, p. 6396-6419, 2017.

BAKER, Jeffrey P. Mercury, vaccines, and autism: one controversy, three histories. **American journal of public health**, v. 98, n. 2, p. 244-253, 2008.

BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. *Current Topics in Developmental Biology*, [s. l.], v. 124, p. 331–367, 2017.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BECKER, Walter et al. Investigating protein–ligand interactions by solution nuclear magnetic resonance spectroscopy. **ChemPhysChem**, v. 19, n. 8, p. 895-906, 2018.

BHARTI, Santosh Kumar; ROY, Raja. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 5-26, 2012.

BHIRDE, Ashwinkumar A. et al. High-throughput in-use and stress size stability screening of protein therapeutics using algorithm-driven dynamic light scattering. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 107, n. 8, p. 2055-2062, 2018.

BIANCHINI, Matheus C. et al. Thimerosal inhibits *Drosophila melanogaster* tyrosine hydroxylase (Dm TyrH) leading to changes in dopamine levels and impaired motor behavior: implications for neurotoxicity. **Metallomics**, v. 11, n. 2, p. 362-374, 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p. 248-254, 1976.

BRIGUGLIO, Matteo et al. Food bioactive compounds and their interference in drug pharmacokinetic/pharmacodynamic profiles. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 277, 2018.

BURTON, Graham J.; JAUNIAUX, Eric. Oxidative stress. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011.

CAO, Zhaozhen; LIU, Rutao; YANG, Bingjun. Potential toxicity of sarafloxacin to catalase: spectroscopic, ITC and molecular docking descriptions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 457-463, 2013.

CARDOSO, P. G.; RESENDE-DE-OLIVEIRA, R.; ROCHA, E. Combined effects of increased temperature and levonorgestrel exposure on zebrafish female liver, using stereology and immunohistochemistry against catalase, CYP1A, HSP90 and vitellogenin. **Environmental pollution**, v. 252, p. 1059-1067, 2019.

CHATURVEDI, Sumit Kumar et al. Elucidating the interaction of limonene with bovine serum albumin: a multi-technique approach. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 1, p. 307-316, 2015.

CHAVES, Otávio A. et al. Studies of the interaction between BSA and a plumeran indole alkaloid isolated from the stem bark of *Aspidosperma cylindrocarpon* (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 7, p. 1229-1236, 2017.

CHEN, Linfeng et al. Interaction of chromium (III) or chromium (VI) with catalase and its effect on the structure and function of catalase: an in vitro study. **Food chemistry**, v. 244, p. 378-385, 2018.

CHEN, Linfeng et al. Molecular interaction of inorganic mercury (II) with catalase: a spectroscopic study in combination with molecular docking. **RSC Advances**, v. 5, n. 97, p. 79874-79881, 2015.

CHEN, Linfeng et al. Molecular interaction of inorganic mercury (II) with catalase: a spectroscopic study in combination with molecular docking. **RSC Advances**, v. 5, n. 97, p. 79874-79881, 2015.

CHENG, Z.; JIANG, X. LIU, R. 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, nov., 2013.

CHI, Zhenxing et al. Binding of oxytetracycline to bovine serum albumin: spectroscopic and molecular modeling investigations. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 18, p. 10262-10269, 2010.

CHI, Zhenxing et al. Binding of oxytetracycline to bovine serum albumin: spectroscopic and molecular modeling investigations. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 18, p. 10262-10269, 2010.

CHI, Zhenxing; LIU, Rutao; ZHANG, Hao. Potential enzyme toxicity of oxytetracycline to catalase. **Science of the total environment**, v. 408, n. 22, p. 5399-5404, 2010

COLLAZOS, Nicole et al. Binding interactions of a series of sulfonated water-soluble resorcinarenes with bovine liver catalase. **International journal of biological macromolecules**, v. 139, p. 75-84, 2019.

COPELAND, Robert A. **Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis**. John Wiley & Sons, 2004.

CORRÊA, Daniel HA; RAMOS, Carlos HI. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, n. 5, p. 164-173, 2009.

DANTAS, Maria Dayanne de A. et al. Interactions of tetracyclines with ovalbumin, the main allergen protein from egg white: Spectroscopic and electrophoretic studies. **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 505-514, 2017.

DANTAS, Maria Dayanne de A. et al. Interactions of tetracyclines with milk allergenic protein (casein): a molecular and biological approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, n. just-accepted, p. 1-21, 2019.

DEGHAN, Gholamreza et al. Synergistic inhibition of catalase activity by food colorants sunset yellow and curcumin: An experimental and MLSD simulation approach. **Chemico-biological interactions**, v. 311, p. 108746, 2019.

DING, Fei et al. Determining the binding affinity and binding site of bensulfuron-methyl to human serum albumin by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. **Journal of Luminescence**, v. 130, n. 11, p. 2013-2021, 2010.

DÓREA, José G. Abating mercury exposure in young children should include thimerosal-free vaccines. **Neurochemical research**, v. 42, n. 10, p. 2673-2685, 2017a.

DÓREA, José G. Integrating experimental (in vitro and in vivo) neurotoxicity studies of low-dose thimerosal relevant to vaccines. **Neurochemical research**, v. 36, n. 6, p. 927-938, 2011.

DÓREA, José G. Low-dose Thimerosal (ethyl-mercury) is still used in infants vaccines: Should we be concerned with this form of exposure?. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 49, p. 134-139, 2018.

DÓREA, José G. Low-dose Thimerosal in pediatric vaccines: Adverse effects in perspective. **Environmental research**, v. 152, p. 280-293, 2017b.

DÓREA, José G.; FARINA, Marcelo; ROCHA, João BT. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. **Journal of Applied toxicology**, v. 33, n. 8, p. 700-711, 2013.

DU, Xing et al. Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 2, p. 144, 2016.

FARINA, Marcelo; ASCHNER, Michael; ROCHA, João BT. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 256, n. 3, p. 405-417, 2011).

FELLMAN, Jason B.; HOOD, Eran; SPENCER, Robert GM. Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. **Limnology and oceanography**, v. 55, n. 6, p. 2452-2462, 2010.

FENG, Caiyan et al. Specific pathways of dietary methylmercury and inorganic mercury determined by mercury speciation and isotopic composition in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental science & technology**, v. 49, n. 21, p. 12984-12993, 2015.

FREITAS, Daniela RJ; JUNIOR, Itabajara da S. V.; MASUDA, Aoi. Expressão e atividade enzimática de glutathione s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 99-104, 2008.

FREIRES, Irlan Almeida et al. Alternative animal and non-animal models for drug discovery and development: bonus or burden?. **Pharmaceutical research**, v. 34, n. 4, p. 681-686, 2017.

GALEONE, A. et al. In vivo assessment of CdSe–ZnS quantum dots: coating dependent bioaccumulation and genotoxicity. **Nanoscale**, v. 4, n. 20, p. 6401-6407, 2012.

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**, United States, n.1, p.2-25, 2013.

GEIER, David A. et al. A cross-sectional study of the relationship between infant Thimerosal-containing hepatitis B vaccine exposure and attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 46, p. 1-9, 2018.

GEIER, David A. et al. Thimerosal exposure and disturbance of emotions specific to childhood and adolescence: A case-control study in the Vaccine Safety Datalink (VSD) database. **Brain injury**, v. 31, n. 2, p. 272-278, 2017.

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

GEIER, David A.; KERN, Janet K.; GEIER, Mark R. Premature Puberty and Thimerosal-Containing Hepatitis B Vaccination: A Case-Control Study in the Vaccine Safety Datalink. **Toxics**, v. 6, n. 4, p. 67, 2018.

GHASEMI, Jahan B.; ABDOLMALEKI, Azizeh; SHIRI, Fereshteh. Molecular docking challenges and limitations. In: **Pharmaceutical Sciences: Breakthroughs in Research and Practice**. IGI Global, 2017. p. 770-794.

GHOBADI, Roohollah et al. Spectroscopic investigation of Bovine Liver Catalase interactions with a novel phen-imidazole derivative of platinum. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 36, n. 3, p. 656-662, 2018.

GHOLAMIAN, Azam et al. Generation of reactive oxygen species via inhibition of liver catalase by oxalli-palladium: A spectroscopic and docking study. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 165-173, 2017.

GÖNENÇA, A. et al. Increased oxidative dna damage and impaired antioxidant defense system in patients with gastrointestinal cancer. **European journal of internal medicine**, Turkey, v. 23, n. 4, p. 350-354, jun. 2012. .

GREÑO, Mairer et al. Nuclear magnetic resonance to study the interactions acting in the enantiomeric separation of homocysteine by capillary electrophoresis with a dual system of γ -cyclodextrin and the chiral ionic liquid EtCholNTf₂. **Electrophoresis**, v. 40, n. 15, p. 1913-1920, 2019.

GRZESIEK, S. et al. Nuclear magnetic resonance as a quantitative tool to study interactions in biomacromolecules. **Pure and applied chemistry**, v. 77, n. 8, p. 1409-1424, 2005.

HAO, Fang et al. Spectroscopy, calorimetry and molecular simulation studies on the interaction of catalase with copper ion. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 143, p. 100-106, 2015.

HAO, Xiaoyan et al. Molecular mechanism of composite nanoparticles TiO₂/WO₃/GO-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. **Chemico-biological interactions**, v. 292, p. 30-36, 2018.

HE, W. et al. Investigation of the interaction between five alkaloids and human hemoglobin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, China, v. 123, p. 176-186, Abr., 2014.

HE, W. et al. Investigation of the interaction between five alkaloids and human hemoglobin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, China, v. 123, p. 176-186, Abr., 2014.

HERNÁNDEZ-SANTOYO, Alejandra et al. Protein-protein and protein-ligand docking. In: **Protein engineering-technology and application**. InTech Rijeka, 2013. p. 66.

HOGEBACK, Jens et al. Investigating the adduct formation of organic mercury species with carbonic anhydrase and hemoglobin from human red blood cell hemolysate by means of LC/ESI-TOF-MS and LC/ICP-MS. **Metallomics**, v. 8, n. 1, p. 101-107, 2016.

HU, Yuandong; DA, Liangjun. Insights into the selective binding and toxic mechanism of microcystin to catalase. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 121, p. 230-237, 2014.

HUO, Mengling et al. Binding mechanism of maltol with catalase investigated by spectroscopy, molecular docking, and enzyme activity assay. **Journal of Molecular Recognition**, p. e2822, 2019.

HUSSAIN, Rohanah; SILIGARDI, Giuliano. Characterisation of Conformational and Ligand Binding Properties of Membrane Proteins Using Synchrotron Radiation Circular Dichroism (SRCD). *Adv Exp Med Biol*. 2016 April 28; 922: 43-59.

IBRAHIM, Muhammad; RICHARDSON, Michael K. In vitro development of zebrafish vascular networks. **Reproductive Toxicology**, v. 70, p. 102-115, 2017.

JING, Meng; BOWSER, Michael T. Methods for measuring aptamer-protein equilibria: a review. **Analytica chimica acta**, v. 686, n. 1-2, p. 9-18, 2011.

JOYE, Iris J. et al. Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: Towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins. **Food chemistry**, v. 185, p. 261-267, 2015.

KELLY, Sharon M.; PRICE, Nicholas C. Circular dichroism to study protein interactions. **Current protocols in protein science**, v. 46, n. 1, p. 20.10. 1-20.10. 18, 2006.

KENRICK, Sophia; SOME, Daniel. The Diffusion Interaction Parameter (kD) as an Indicator of Colloidal and Thermal Stability. Wyatt Technology Corporation.–2014, 2018.

KERN, Janet K. et al. Thimerosal exposure and the role of sulfation chemistry and thiol availability in autism. **International journal of environmental research and public health**, v. 10, n. 8, p. 3771-3800, 2013.

KESSENBROCK, Mareike; GROTH, Georg. Circular dichroism and fluorescence spectroscopy to study protein structure and protein–protein interactions in ethylene signaling. In: **Ethylene Signaling**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 141-159.

KHAN, Mohsin Vahid et al. Cationic surfactant mediated fibrillogenesis in bovine liver catalase: a biophysical approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 36, n. 10, p. 2543-2557, 2018.

KOENIG, J. A. et al. Zebrafish as a model for acetylcholinesterase-inhibiting organophosphorus agent exposure and oxime reactivation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, [s. l.], v. 1374, n. 1, p. 68–77, 2016.

KORBAS, Malgorzata et al. Chemical form matters: differential accumulation of mercury following inorganic and organic mercury exposures in zebrafish larvae. **ACS chemical biology**, v. 7, n. 2, p. 411-420, 2012.

KOOHSHEKAN, B. et al. Protective effects of aspirin on the function of bovine liver catalase: A spectroscopy and molecular docking study. **Journal of Molecular Liquids**, v. 218, p. 8-15, 2016.

KRISHNAN, Viswanathan V. Molecular Thermodynamics Using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. **Inventions**, v. 4, n. 1, p. 13, 2019.

KUMAR, Deepak et al. Assessment of tick antioxidant responses to exogenous oxidative stressors and insight into the role of catalase in the reproductive fitness of the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum*. **Insect molecular biology**, v. 25, n. 3, p. 283-294, 2016

LEE, Eun Young et al. Immunogenicity of a bivalent killed thimerosal-free oral cholera vaccine, Euvichol, in an animal model. **Clinical and experimental vaccine research**, v. 7, n. 2, p. 104-110, 2018.

LEHN, Jean-Marie. From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 2, p. 151-160, 2007.

LEI, Shan et al. Water-soluble [60] fullerene derivatives as potential chelating agents of radionuclides via chlorofullerene (C₆₀Cl₁₆) as a precursor. **Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures**, v. 24, n. 11, p. 705-711, 2016.

LI, Daojin et al. Characterization of the baicalein–bovine serum albumin complex without or with Cu²⁺ or Fe³⁺ by spectroscopic approaches. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 588-599, 2011.

LI, Daojin et al. Characterization of the baicalein–bovine serum albumin complex without or with Cu²⁺ or Fe³⁺ by spectroscopic approaches. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 588-599, 2011

LI, Yiling et al. Characterization of mercury-binding proteins in human neuroblastoma SK-N-SH cells with immobilized metal affinity chromatography. **Talanta**, v. 178, p. 811-817, 2018.a

LI, Yiling et al. Characterization of mercury-binding proteins in rat blood plasma. **Chemical communications**, v. 54, n. 54, p. 7439-7442, 2018b.

LIESCHKE, Graham J.; CURRIE, Peter D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353-367, 2007.

LIU, Helin; PIERRE-PIERRE, Nickisha; HUO, Qun. Dynamic light scattering for gold nanorod size characterization and study of nanorod–protein interactions. **Gold bulletin**, v. 45, n. 4, p. 187-195, 2012.

LIU, Jianli et al. Characterizing the binding interaction of astilbin with bovine serum albumin: a spectroscopic study in combination with molecular docking technology. **RSC advances**, v. 8, n. 13, p. 7280-7286, 2018.

LOMBARDO, Salvatore et al. Thermodynamic study of the interaction of bovine serum albumin and amino acids with cellulose nanocrystals. **Langmuir**, v. 33, n. 22, p. 5473-5481, 2017.

LORBER, Bernard et al. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. **Biochemistry and molecular biology education**, v. 40, n. 6, p. 372-382, 2012.

LORBER, Bernard et al. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. **Biochemistry and molecular biology education**, v. 40, n. 6, p. 372-382, 2012.

LOUIS-JEUNE, Caroline; ANDRADE-NAVARRO, Miguel A.; PEREZ-IRATXETA, Carol. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 80, n. 2, p. 374-381, 2012.

LU, Yan et al. Molecular mechanism of interaction between norfloxacin and trypsin studied by molecular spectroscopy and modeling. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 75, n. 1, p. 261-266, 2010.

LU, Yan et al. Molecular mechanism of interaction between norfloxacin and trypsin studied by molecular spectroscopy and modeling. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 75, n. 1, p. 261-266, 2010.

LUSHCHAK, Volodymyr I. et al. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 8, p. 1670-1680, 2005.

LUSHCHAK, V. et al. Drosophila melanogaster larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 160, n. 1, p. 27-34, 2011..

LYRA, Ana Carolina Fradique et al. Molecular interaction of sulfonamides and ovalbumin, an allergenic egg protein, exploring biophysical, theoretical and biological studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, p. 117747, 2019.

MA, Xianyong; DENG, Dun; CHEN, Weidong. Inhibitors and Activators of SOD, GSH-Px, and CAT. **Enzyme inhibitors and activators**, v. 29, p. 207, 2017.

MAHAPATRA, Cecon T. et al. Identification of methylmercury tolerance gene candidates in Drosophila. **Toxicological sciences**, v. 116, n. 1, p. 225-238, 2010.

MANACH, Claudine et al. Addressing the inter-individual variation in response to consumption of plant food bioactives: towards a better understanding of their role in healthy aging and cardiometabolic risk reduction. **Molecular nutrition & food research**, v. 61, n. 6, p. 1600557, 2017.

MARQUES, Rejane C. et al. Neurodevelopment of Amazonian children exposed to ethylmercury (from Thimerosal in vaccines) and methylmercury (from fish). **Environmental research**, v. 149, p. 259-265, 2016.

MARTIN, Stephen R.; SCHILSTRA, Maria J. Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. *Methods in cell biology*, v. 84, p. 263-293, 2008.

MILES, Andrew J.; WALLACE, Bonnie A. Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. **Chemical society reviews**, v. 45, n. 18, p. 4859-4872, 2016.

MOCZ, G.; ROSS, J.A. Fluorescence Techniques in Analysis of Protein-Ligand Interactions. In: WILLIAMS, M.A. & DAVITER, T. (Ed). Protein-ligands interactions- Methods and applications. 2 ed. London: Humana Press, 2013.

MOJICA-VÁZQUEZ, Luis Humberto et al. Mercury chloride exposure induces DNA damage, reduces fertility, and alters somatic and germline cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 31, p. 32322-32332, 2019.

MOLINA-BOLÍVAR, J. A., et al. Spectroscopic investigation on the interaction of maslinic acid with bovine sérum albumin. *Jornal of luminescence*, Espanha, v.156, p.141-149, Ago. 2014.

MORADI, M. et al. Inhibitory effects of deferasirox on the structure and function of bovine liver catalase: a spectroscopic and theoretical study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 33, n. 10, p. 2255-2266, 2015.

MORADI, M. et al. Inhibitory effects of deferasirox on the structure and function of bovine liver catalase: a spectroscopic and theoretical study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 33, n. 10, p. 2255-2266, 2015.

MULCAHY, Heidi et al. *Drosophila melanogaster* as an animal model for the study of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in vivo. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 10, p. e1002299, 2011.

MUSYOKA, Thommas M. et al. Structure based docking and molecular dynamic studies of plasmodial cysteine proteases against a South African natural compound and its analogs. **Scientific reports**, v. 6, p. 23690, 2016.

NAIK, P. N.; CHIMATADAR, S. A.; NANDIBEWOOR, S. T. Interaction between a potent corticosteroid drug–dexamethasone with bovine serum albumin and human serum albumin: a fluorescence quenching and fourier transformation infrared spectroscopy study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 100, n. 3, p. 147-159, 2010.

NANDI, Ankita et al. Role of Catalase in Oxidative Stress-and Age-Associated Degenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

NAZIROĞLU, Mustafa. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca²⁺ signaling and TRP cation channel activation in nervous system. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 32, n. 3, p. 134-141, 2012.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6.ed. São Paulo: Sarvier, 2014.

NEVÍDALOVÁ, Hana; MICHALCOVÁ, Lenka; GLATZ, Zdeněk. In-depth insight into the methods of plasma protein-drug interaction studies: Comparison of capillary electrophoresis-frontal analysis, isothermal titration calorimetry, circular dichroism and equilibrium dialysis. **Electrophoresis**, v. 39, n. 4, p. 581-589, 2018.

NIEHOFF, Ann-Christin et al. Quantitative bioimaging to investigate the uptake of mercury species in *Drosophila melanogaster*. **Analytical chemistry**, v. 87, n. 20, p. 10392-10396, 2015.

NILE, Shivraj Hariram et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 32, n. 1, p. e22002, 2018.

ORENSTEIN, Walter A. et al. Global vaccination recommendations and thimerosal. **Pediatrics**, v. 131, n. 1, p. 149-151, 2013.

OVCHINNIKOV, Sergey et al. Large-scale determination of previously unsolved protein structures using evolutionary information. **Elife**, v. 4, p. e09248, 2015.

PANTALEÃO, Thiago U. et al. Effect of thimerosal on thyroid hormones metabolism in rats. **Endocrine connections**, v. 6, n. 8, p. 741-747, 2017.

PIETERS, Bas JGE et al. Natural supramolecular protein assemblies. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 1, p. 24-39, 2016.

PIRES, Vinicius. Timerosal contido em vacinas e transtornos do espectro autista: revisão de literatura. **SANARE, Sobral**, Brasil, v.17, n. 1, p.93-101, Jan./Jun. 2018.

PRATHIBHA, T. et al. Aggregation and organic phase splitting behavior of a synergic extractant system probed by dynamic light scattering spectroscopy. *Journal of Molecular Liquids*, v. 291, p. 111320, 2019.

RAND, Matthew D.; DAO, Julie C.; CLASON, Todd A. Methylmercury disruption of embryonic neural development in *Drosophila*. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 5, p. 794-802, 2009.)

RASHTBARI, Samaneh et al. Effects of resveratrol on the structure and catalytic function of bovine liver catalase (BLC): Spectroscopic and theoretical studies. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 7, n. 3, p. 349, 2017.

RASHTBARI, Samaneh et al. Experimental investigation and molecular dynamics simulation of the binding of ellagic acid to bovine liver catalase: Activation study and interaction mechanism. **International journal of biological macromolecules**, v. 143, p. 850-861, 2020.

RASHTBARI, Samaneh et al. Investigation of the binding mechanism and inhibition of bovine liver catalase by quercetin: Multi-spectroscopic and computational study. **Bioimpacts: Bi**, v. 7, n. 3, p. 147, 2017.

RASOOL, Nouman et al. Probing the Pharmacological Parameters, Molecular Docking and Quantum Computations of Plant Derived Compounds Exhibiting Strong Inhibitory Potential Against NS5 from Zika Virus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2018.

RESNATI, Giuseppe et al. Supramolecular interactions in the solid state. **IUCrJ**, v. 2, n. 6, p. 675-690, 2015.

RIBEIRO, Thales P. et al. Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 67-76, 2015.

ROY, Sanjay; SENGUPTA, Partha Sarathi; GUIN, Partha Sarathi. Electrochemical and UV-Vis spectroscopic studies on the interaction of sodium 1, 4-dihydroxy-9, 10-

anthraquinone-2-sulphonate with cetyltrimethylammonium bromide micelles. **Chemical Physics Letters**, v. 694, p. 7-13, 2018.

SÁEZ-FERRE, Sara et al. Elucidation of the Interaction Mechanism between Organic Chiral Cages with Biomolecules through Nuclear Magnetic Resonance and Theoretical Studies. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 122, n. 29, p. 16821-16829, 2018.

SANTOS, João César N. et al. Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA). **International journal of biological macromolecules**, v. 113, p. 1032-1040, 2018.

SEKAR, Rajesh Babu; PERIASAMY, Ammasi. Fluorescence resonance energy transfer (fret) microscopy imaging of live cell protein localizations. **Jornal of cell biology**, Virginia, v. 160, n. 5, p. 629–633., mar. 2003.

SHAHRAKI, Somaye; DELARAMI, Hojat Samareh; SAEIDIFAR, Maryam. Catalase inhibition by two Schiff base derivatives. Kinetics, thermodynamic and molecular docking studies. **Journal of Molecular Liquids**, v. 287, p. 111003, 2019.

SHAMSI, Anas et al. Probing the interaction of Rivastigmine Tartrate, an important Alzheimer's drug, with serum albumin: Attempting treatment of Alzheimer's disease. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

SILVA, Marina Magalhães et al. Toxicity of thimerosal in biological systems: Conformational changes in human hemoglobin, decrease of oxygen binding capacity, increase of protein glycation and amyloid's formation. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

SILVEIRA, Themis Reverbel; SCHNEIDER, Ana Claudia; HAMMES, Thais Ortiz. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, 2012.

SINGH, Kulwant et al. New insight on 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid interaction with TgFNR for hydrophobic exposure analysis. **International journal of biological macromolecules**, v. 122, p. 636-643, 2019.

SOARES, D. Estudo da interação entre porfirinase eumelanina sintética. 2005. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso e Pós-graduação em Química, Universidade de São Paulo, São paulo.

SOARES, Franciela A. et al. Tianeptine Esters Derivatives: A Study of Protein-Drug Interaction Performed by Fluorescence Quenching and Molecular Docking. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 10, p. 2125-2135, 2019.

STAMOGIANNOS, Athanasios et al. Screening identifies thimerosal as a selective inhibitor of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 7, n. 7, p. 681-685, 2016.

STETEFELD, Jörg; MCKENNA, Sean A.; PATEL, Trushar R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical reviews**, v. 8, n. 4, p. 409-427, 2016.

STETEFELD, Jörg; MCKENNA, Sean A.; PATEL, Trushar R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical reviews**, v. 8, n. 4, p. 409-427, 2016.

STROHMIDEL, Philipp; SPERLING, Michael; KARST, Uwe. Investigations on the binding of ethylmercury from thiomersal to proteins in influenza vaccines. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 100-104, 2018.

TENG, Yue et al. Molecular interaction of 2-mercaptobenzimidazole with catalase reveals a potentially toxic mechanism of the inhibitor. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 141, p. 241-246, 2014.

TIWARI, A. K. et al. Environmental chemical mediated male reproductive toxicity: *Drosophila melanogaster* as an alternate animal model. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 197-216, 2011.

TOYAMA, Takashi et al. The Nuclear Protein HOXB13 Enhances Methylmercury Toxicity by Inducing Oncostatin M and Promoting Its Binding to TNFR3 in Cultured Cells. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 45, 2020.

TRÜMPLER, Stefan 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, n. 2, p. 125-130, 2014.

TRÜMPLER, Stefan et al. Interaction of thimerosal with proteins—ethylmercury adduct formation of human serum albumin and β -lactoglobulin A. **Metallomics**, v. 1, n. 1, p. 87-91, 2009.

TRÜMPLER, Stefan et al. Interaction of thimerosal with proteins—ethylmercury adduct formation of human serum albumin and β -lactoglobulin A. **Metallomics**, v. 1, n. 1, p. 87-91, 2009.

TUROVEROV, Konstantin K.; KUZNETSOVA, Irina M.; UVERSKY, Vladimir N. The protein kingdom extended: ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 102, n. 2-3, p. 73-84, 2010.

VAN DER WORP, H. Bart et al. Can animal models of disease reliably inform human studies?. **PLoS med**, v. 7, n. 3, p. e1000245, 2010.

VARLAN, Aurica; HILLEBRAND, Mihaela. Bovine and human serum albumin interactions with 3-carboxyphenoxathiin studied by fluorescence and circular dichroism spectroscopy. **Molecules**, v. 15, n. 6, p. 3905-3919, 2010.

VIKULINA, A. S. et al. The mechanism of catalase loading into porous vaterite CaCO₃ crystals by co-synthesis. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 13, p. 8822-8831, 2018.

WANG, Xu et al. Catalase ameliorates diabetes-induced cardiac injury through reduced p65/RelA-mediated transcription of BECN1. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 21, n. 12, p. 3420-3434, 2017.

WANG, Zhigang; CAO, Jing; MENG, Fangang. Interactions between protein-like and humic-like components in dissolved organic matter revealed by fluorescence quenching. **Water Research**, v. 68, p. 404-413, 2015.

WANGLER, Michael F.; HU, Yanhui; SHULMAN, Joshua M. Drosophila and genome-wide association studies: a review and resource for the functional dissection of human complex traits. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 2, p. 77-88, 2017.

WANI, Tanveer A. et al. Spectrophotometric and molecular modelling studies on in vitro interaction of tyrosine kinase inhibitor linifanib with bovine serum albumin. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0176015, 2017.

WANI, Tanveer A. et al. Study of interactions of an anticancer drug neratinib with bovine serum albumin: spectroscopic and molecular docking approach. **Frontiers in chemistry**, v. 6, p. 47, 2018.

WU, Yunhua. Study on the interaction between salicylic acid and catalase by spectroscopic methods. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 44, n. 3, p. 796-801, 2007.

XU, Qin et al. Specific binding and inhibition of 6-benzylaminopurine to catalase: Multiple spectroscopic methods combined with molecular docking study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 123, p. 327-335, 2014.

YANG, Bingjun et al. Binding of chrysoidine to catalase: spectroscopy, isothermal titration calorimetry and molecular docking studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 128, p. 35-42, 2013.

YANG, Bingjun et al. Binding of chrysoidine to catalase: spectroscopy, isothermal titration calorimetry and molecular docking studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 128, p. 35-42, 2013.

YEKTA, Reza et al. Activation of catalase by pioglitazone: Multiple spectroscopic methods combined with molecular docking studies. **Journal of Molecular Recognition**, v. 30, n. 12, p. e2648, 2017.

ZAMAN, Masihuz et al. Elucidating the interaction of clofazimine with bovine liver catalase; a comprehensive spectroscopic and molecular docking approach. **Journal of Molecular Recognition**, v. 30, n. 8, p. e2619, 2017.

ZAMAN, Masihuz et al. Elucidating the interaction of clofazimine with bovine liver catalase; a comprehensive spectroscopic and molecular docking approach. **Journal of Molecular Recognition**, v. 30, n. 8, p. e2619, 2017.

ZEINABAD, Hojjat Alizadeh et al. Thermodynamic and conformational changes of protein toward interaction with nanoparticles: a spectroscopic overview. **RSC advances**, v. 6, n. 107, p. 105903-105919, 2016.

ZHANG, Jun et al. Study on the binding of chloroamphenicol with bovine serum albumin by fluorescence and UV–vis spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 105, p. 74-79, 2013.

ZHANG, Liangliang et al. UV–Vis spectroscopy combined with chemometric study on the interactions of three dietary flavonoids with copper ions. **Food chemistry**, v. 263, p. 208-215, 2018.

ZHANG, Lihui et al. Comparative studies on the interaction of cefixime with bovine serum albumin by fluorescence quenching spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy. **Luminescence**, v. 30, n. 5, p. 686-692, 2015.

ZHANG, Guowen; MA, Yadi. Mechanistic and conformational studies on the interaction of food dye amaranth with human serum albumin by multispectroscopic methods. **Food chemistry**, v. 136, n. 2, p. 442-449, 2013.

ZHANG, X; JIN, J. Binding analysis of pazufloxacin mesilate to catalase using spectroscopic methods. **Journal of molecular structure**, China, v. 882, p. 96–100, 2008.

ZHENG, Yuan-Yuan et al. Molecular Interaction Kinetics and Mechanism Study of Phytohormones and Plant Protein with Fluorescence and Synchronous Fluorescence Techniques. **ChemistrySelect**, v. 2, n. 14, p. 3993-4000, 2017.

ZIEMINSKA, E. et al. Low molecular weight thiols reduce thimerosal neurotoxicity in vitro: modulation by proteins. **Toxicology**, v. 276, n. 3, p. 154-163, 2010.

ZHU, Jingfeng et al. Probing the binding of flavonoids to catalase by molecular spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 843, n. 1-3, p. 38-44, 2007.