



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**BIOFÍSICA DA INTERAÇÃO ENTRE UREASE COM METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE LÍQUENS E DA ALBUMINA DO SORO HUMANO COM
COCAÍNA E COCAETILENO**

THAMILLA MARIA SILVA MACIEL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

THAMILLA MARIA SILVA MACIEL

BIOFÍSICA DA INTERAÇÃO ENTRE UREASE COM METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE LÍQUENS E DA ALBUMINA DO SORO
HUMANO COM COCAÍNA E COCAETILENO

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

Orientador: Prof. Dr. Josué C. Caldas Santos

Maceió – AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

- M152b Maciel, Thamilla Maria Silva.
 Biofísica da interação entre urease com metabólitos secundários de
 líquens e da albumina do soro humano com cocaína e cocaetileno / Thamilla
 Maria Silva Maciel. – 2019.
 135 f. : il. grafs.
- Orientador: Josué C. Caldas Santos.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.
- Bibliografia: f. 105-127.
Apêndices: f. 128-135.
1. Urease. 2. Albumina do soro humano. 3. Compostos bioativos.
4. Estudos biofísicos. 5. Técnicas espectroscópicas. I. Título.

CDU: 543.384



PPGQB

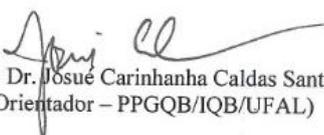
Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia

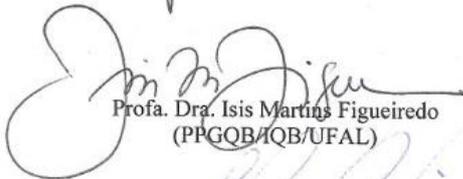


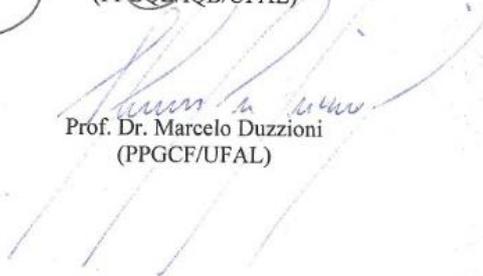
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **THAMILLA MARIA MACIEL**, intitulada: “**Biofísica da interação entre urease com metabólitos secundários de líquens e da albumina do soro humano com cocaína e cocaetileno**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 21 de Fevereiro de 2019, às 9h, na sala de aulas da Pós-Graduação do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


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


Profa. Dra. Isis Martins Figueiredo
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Marcelo Duzzioni
(PPGCF/UFAL)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Senhor e Salvador Jesus Cristo por ter me concedido saúde, por ter guiado meus passos nos momentos decisivos e por ter ouvido minhas orações de gratidão e súplica.

A minha família que sempre acreditou em mim e me deu toda base necessária, carinho, amor e conselhos.

Ao meu orientador prof. Dr. Josué Carinhonha Caldas Santos que além de mestre, me inspira por seu profissionalismo e me incentiva a estudar mais e buscar mais. Muito obrigada pelos ensinamentos, ajuda, apoio e paciência.

Ao meu querido Lucas por entender minha ausência, por ouvir meus medos, sonhar junto comigo e por ter me ajudado com os problemas do meu computador.

A todos os amigos do laboratório de instrumentação e desenvolvimento em química analítica (LINQA): Alef, Ari, Jaelson, Karolayne, Emerson, Mayara, Camila, Fátima, Francisco, Amanda, Aryanna, Marina, Dayanne, Janaina, Woodland e Maria Célia por todas as conversas, momentos de descontração, apoio e companheirismo nas apresentações e prévias durante o mestrado e, em especial a minha amiga e agora companheira de laboratório Aryanna que me acompanha nas noites de estudos desde a época da graduação e que sempre está pronta para me ajudar em várias situações. A Marina pelos conselhos e por muitas vezes ser uma professora para mim.

Ao professor Ângelo de Fátima por fornecer todos os compostos citados neste projeto completamente caracterizados.

*Ao Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (IEF-MG/GPROP) pela autorização da colheita de *Cladonia rappii* no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, localizado em Araponga, Minas Gerais, Brasil.*

*Ao professor Claudio Farina por fornecer duas cepas clínicas do *Helicobacter pylori*. A professora Luiza Valentina Modolo que realizou os estudos de seleção quanto a atividade enzimática. A professora Francesca Sisto que realizou os ensaios biológicos frente a cepas resistentes. A Camila Nunes (IQB-UFAL) por preparar a Figura 20. A Yane Mota por fornecer os dados dos valores de IC_{50} dos metabólitos secundários de líquen avaliados neste trabalho.*

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – FAPAL e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A natureza e a dinâmica da ligação entre pequenas moléculas e proteínas estão relacionadas à disponibilidade e transporte desses compostos. Inicialmente avaliou-se a interação entre metabólitos secundários de líquen, como os isômeros do ácido úsnico, neste caso o (+)-USN e (-)-USN), e o ácido fumarprotocetrárico (FUM) como inibidores de urease simulando condições fisiológicas, assim como, a interação da cocaína (COC) e do cocaetileno (CE) com albumina do soro humano (HSA). Nos estudos de interação entre metabólitos secundários de líquen e urease os valores de K_b (constante interação) obtidos indicam força de ligação de intermediária a forte entre a enzima e os inibidores, variando de $0,25$ a $35,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ a 30°C , sendo (+)-USN o composto com maior interação e FUM o de menor. O mecanismo de *quenching* deste processo é preferencialmente estático e as forças predominantes de interação eletrostáticas ($\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$). Por meio de fluorescência sincronizada e 3D foi possível inferir que houve mudanças na estrutura secundária da urease nativa. A avaliação da influência do substrato e de alguns inibidores clássicos (tiourea, hidroxitiourea e omeprazol) na interação entre a urease e os compostos líquens, indicou que os mesmos interagem no sítio ativo da enzima. Por fim, foi observada relação inversa entre os valores de K_b e a concentração inibitória mínima (MIC) para cepas resistentes de *H. pylori* em ensaios *in vitro*, o que credencia os compostos avaliados a possíveis candidatos para o tratamento desta bactéria. Nos estudos de interação entre os alcaloides COC e CE com HSA, os valores da constante de ligação obtidos para o CE variaram de $2,92$ a $8,33 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, sendo maiores quando comparados a COC ($1,15$ a $3,77 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) em diferentes temperaturas. O estudo de transferência de energia ressonante (FRET), indicou que houve transferência de energia não-radioativa. Os parâmetros termodinâmicos indicaram que a COC apresentou interações preferenciais (não exclusivas) por forças de van der Waals e ligações de hidrogênio, enquanto que o CE tem maior preferência por interações hidrofóbicas. A utilização da sonda ANS, que se liga a regiões hidrofóbicas da HSA, confirmou as características mais hidrofóbicas da CE. Contudo, o valor de K_b , para ambos os compostos reduziu com aumento da força iônica (NaCl de 25 a 200 mM), indicando componente eletrostático nas forças de interação com a proteína, devido a protonação do nitrogênio ($\text{pK}_a = 8,6$). O estudo por fluorescência sincronizada indicou que ambos compostos interagem preferencialmente na microrregião próximo ao resíduo de Trp214. O estudo por fluorescência 3D, UV-vis e dicroísmo circular indicaram mudanças na estrutura secundária em relação à proteína nativa. Além disso, foram realizados estudos para avaliação do sítio de ligação utilizado como marcadores a varfarina (sítio I), diazepam (sítio II) e digitoxina (subdomínio IIIB), sendo que ambos os compostos interagem preferencialmente no sítio I. A avaliação da influência de competidores indicou que apenas na presença do íons Ca(II) houve um aumento na constante de interação de forma mais significativa, sendo mais acentuado para o CE. Por fim, com base nos estudos por Ressonância Magnética Nuclear ^1H foi possível propor o epítipo das moléculas. Assim, pôde-se concluir que o CE apresentou a maior afinidade pela HSA, justificando o seu maior tempo de vida no plasma quando comparado a COC, e desta forma, o aumento dos efeitos da droga no organismo.

Palavras chaves: urease; albumina do soro humano; compostos bioativos; estudos biofísicos; técnicas espectroscópicas.

ABSTRACT

The nature and dynamics of the binding between small molecules and proteins represent an area of intense study, due to the interaction processes are related to the availability and the transport of these compounds. The interaction between secondary lichen metabolites, as the usnic acid isomers, (+)-USN and (-)-USN) and fumarprotocetraric acid (FUM) as urease inhibitors as well as cocaine (COC) and cocaethylene metabolite (CE) interacting with human serum albumin (HSA) were evaluated simulating physiological conditions. In the interaction studies between secondary metabolites of lichen and urease, the K_b (binding constant) values obtained indicated intermediate to strong binding strength between the enzyme and inhibitors, varying from 0.25 to $35.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ at 30°C. The (+)-USN was the compound with higher interaction, while the FUM presented lower affinity. The quenching mechanism of the process is preferably static and the electrostatic forces ($\Delta H < 0$ and $\Delta S > 0$) shown the main contribution. Through synchronous fluorescence and 3D it was possible to infer that there were changes in the secondary structure of the native urease. Finally, the influence of the substrate and some classical inhibitors (thiourea, hydroxyurea and omeprazole) on the interaction between urease and lichen compounds, which interact in the active site of the enzyme, was evaluated. Finally, an inverse relationship was observed regarding K_b values and minimum inhibitory concentration (MIC) for resistant strains of *H. pylori* in *in vitro* assays, which credential the compounds evaluated to possible candidates for the treatment of this bacteria. In the interaction studies between the alkaloids COC and CE with HSA, the binding constants obtained for the CE varied from 2.92 to $8.33 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, being greater than COC (1.15 to $3.77 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) at different temperatures. These results agreement with the resonant energy transference (FRET) study, since the distance between donor (HSA) and receptors (ligands) for CE (1.76 nm) was lower than for COC (2.25 nm). Considering the thermodynamic parameters, the COC presented preferential interactions by van der Waals forces and hydrogen bonds, whereas the CE were hydrophobic interactions. The employ of the ANS probe, which binds to hydrophobic sites of the HSA, confirmed the hydrophobic characteristics of the CE. However, the K_b value for both compounds decreased with increasing ionic strength (NaCl 25-200 mM), indicating electrostatic component in the interaction with the protein, probably due to nitrogen protonation ($\text{pK}_a = 8.6$). Synchronized fluorescence shown that both compounds interact preferentially in the microenvironment near the Trp214 residue. The 3D fluorescence, UV-vis and circular dichroism studies indicated that there were changes in the secondary structure relative to the native protein. Besides, the HSA binding sites were evaluated using warfarin (site I), diazepam (site II) and digitoxin (subdomain IIIB) as markers, COC and CE preferentially interact at site I of protein. The evaluation of the competitors influence indicated that only Ca(II) ions there was an increase in the interaction constant, being more accentuated for the CE. Finally, based on ^1H Nuclear Magnetic Resonance studies was possible to propose the epitope of the molecules. Therefore, based on results was concluded that EC has the highest affinity for HSA, justifying its longer plasma life when compared with COC, and thus prolongs the effects.

Keywords: urease; human serum albumin; bioactive compounds; biophysical studies; spectroscopic techniques.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplo de ligação reversível proteína-ligante.....	18
Figura 2- Formação do complexo proteína-ligante, considerando os modelos: (a) chave-fechadura, (b) ajuste induzido e (c) seleção conformacional.....	18
Figura 3- Ligações não-covalentes envolvidas no processo de interação proteína-ligante.....	19
Figura 4- (a) Estrutura em tridimensional da urease; (b) sítio ativo da urease, sendo w1, w2 e w3 moléculas de água; (c) reação de hidrólise da ureia.....	22
Figura 5- Esquema de estrutura da <i>H. pylori</i> : (a) monômeros de urease da <i>H. pylori</i> ; (b) trímeros de urease da <i>H. pylori</i> (b); associação dos trímeros da urease da <i>H. pylori</i> (c).....	24
Figura 6- Estrutura e sítios de ligação da albimuna do soro humano (HSA).....	27
Figura 7- Estruturas químicas de metabólitos secundários de líquens: (a) (R)-(+)-ácido úsnico, (b) (S)-(-)-ácido úsnico e (c) ácido fumarprotocetrárico.....	31
Figura 8- Metabólitos da cocaína formados durante o metabolismo da droga, reações de hidrólise e transesterificação <i>in vivo</i>	34
Figura 9- Espectro de emissão de aminoácidos aromáticos livre tirosina, triptofano e fenilalanina.....	39
Figura 10- Esquema dos estudos de competição para determinação do sítio de ligação, onde M é o marcador de sítio e L é o ligante.....	44
Figura 11- Esquema geral de um sistema com transferência de energia por ressonância de Förster com e sem (re)emissão de luz.....	45
Figura 12- Esquema da sonda ANS na presença da proteína e do ligante.....	47
Figura 13- A atividade enzimática foi avaliada a partir de reações contendo os metabólitos secundários de líquen (1 mM), ureia (10 mM) e urease de <i>Canavalia ensiformis</i> (12,5 mU).....	59
Figura 14- Perfil espectral de emissão da urease (1,0 μ M) na presença de diferentes concentrações de (R)-(+)-USN a pH 7,4 e 30oC (a). Gráfico de Stern-Volmer (b). Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação corresponde ao microambiente em torno dos resíduos Trp (c).....	61
Figura 15- O espectro de fluorescência tridimensional para (a) urease livre e (b) complexada com (R)-(+)-USN, em pH 7,40. Enzima e ligante foram utilizados em 1,0 e 10 μ M, respectivamente.....	65

Figura 16- Espectros de fluorescência sincronizado da urease (1,0 μ M) após a adição de concentrações crescentes de (R)-(+)-USN em pH 7,4, monitorando (b) $\Delta\lambda = 15$ nm (resíduos Tir) e (c) $\Delta\lambda = 60$ nm (resíduos Trp).....	67
Figura 17- Resíduos de tirosina (Tir410 e Tir544) próximos ao centro catalítico da urease na forma nativa. Os resíduos de Tir não fazem parte do sítio catalítico (W ₁ -W ₃ , moléculas de água no sítio ativo)	68
Figura 18- Estrutura do substrato e dos inibidores (tiourea (TU), hidroxitiourea (HU) e omeprazol (OM)) avaliados.....	69
Figura 19- Representação esquemática do sítio ativo da urease nativa de <i>Jack bean</i> (a) (KRAJEWSKA & BRINDELL, 2016) e sua interação com a hidroxitiourea (b) (KRAJEWSKA, 2007) (omeprazol após reação com o resíduo Cis (c) (AMTUL et al., 2002) ou (R) - (+) - USN (d; modelo proposto). W ₁ -W ₃ , moléculas de água no sítio ativo; WB, ponte de água (forma de hidróxido). Os resíduos Tir410 e Tir544, que não pertencem ao sítio ativo da urease foram afetados pelo processo de interação, conforme atestado por ensaio de fluorescência.....	70
Figura 20- Superposição estrutural das ureases no sítio ativo. Urease nativa de <i>Jack bean</i> (590-607, azul) e urease nativa de <i>H. pylori</i> (319-336, vermelho) mostram a alta semelhança estrutural.....	72
Figura 21- Titulação espectrofluorimétrica da HSA (1,0 μ M) em pH 7,4 (30°C) com COC e CE: a1) perfil espectral para a COC; b1) perfil linear do gráfico de K _{SV} referente a COC; c1) Constante de ligação para a COC; a2) Titulação espectrofluorimétrica da HSA com CE; b2) perfil linear do gráfico de K _{SV} para o CE; c2) Constante de ligação para o CE.....	77
Figura 22- Espectros de absorção molecular no UV-vis para os sistemas contendo HSA com a) COC e b) CE. Condições: HSA (2 μ M), COC e CE (2 μ M), em tampão Tris 10 mM, pH 7,40 e 30°C.....	82
Figura 23- Fórmula estrutural da cocaína da forma de base livre e cloridrato.....	83
Figura 24- Avaliação do efeito do NaCl (0-200 mM) no processo de interação para os sistemas HSA-COC e HSA-CE. Condições: tampão Tris 10 mM, pH 7,4 a 30°C.....	83

Figura 25- Espectros de fluorescência 3D para os sistemas contendo a) HSA; b) HSA-COC; c) HSA-CE. Condições: HSA (2 μ M), COC e CE (40 μ M), em tampão Tris 10 mM a pH 7,40 e 30°C.....	85
Figura 26- Espectros de fluorescência sincronizado da HSA (2,0 μ M) após a adição de concentrações crescentes de COC em pH 7,4, monitorando (b) $\Delta\lambda = 15$ nm (resíduos Tir) e (c) $\Delta\lambda = 60$ nm (resíduos Trp)	88
Figura 27- Estrutura molecular dos marcadores de sítio de ligação da HSA.....	90
Figura 28- Avaliação do sítio de ligação na HSA (2 μ M) a partir da razão dos valores de K_b na ausência e presença dos marcadores (2 μ M) varfarina, diazepam e digoxina para os ligantes (a) COC (b) CE.....	91
Figura 29- Perfil da ligação do ANS (0- 40 μ M) a HSA (2 μ M) na ausência presença dos ligantes COC e CE. Condições: pH 7,4 e 30°C.....	93
Figura 30- Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da HSA (10 μ M) que atua como doador (D) de radiação e absorção molecular da COC (20 μ M) (a) e do CE (20 μ M) (b) que atuam como aceptores em pH 7,4.....	95
Figura 31- Efeito da presença dos competidores no processo de interação entre HSA (2 μ M) e CO/CE (0-80 μ M) em pH 7,4 a 30°C.....	98
Figura 32- Espectro de dicroísmo circular da HSA (2 μ M) na presença de COC (A) e CE (B) (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M). Condições: tampão fosfato 5 mM (pH 7,4).....	99
Figura 33- Espectro de RMN 1 H (600 MHz) da COC (1mM) na ausência e na presença de HSA (25mM) em 10% (v/v) de DMSO-d6 em tampão fosfato 10 mM com D ₂ O a pH 7,4.....	101
Figura 34- Espectro de RMN 1 H (600 MHz) da COC (1mM) na ausência e na presença de HSA (25mM) em 10% (v/v) de DMSO-d6 em tampão fosfato 10 mM com D ₂ O a pH 7,4.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Energias de ligação envolvidas nas ligações não-covalentes.....	20
Tabela 2- Parâmetros de ligação e termodinâmicos referentes a interação entre os metabólitos secundários de líquen e urease.....	62
Tabela 3- Parâmetros de fluorescência tridimensional para urease livre (pH 7,4) ou na presença de compostos de líquen 1-3. Proteína e ligantes foram usados em 1,0 e 10 μM , respectivamente, sendo o pico 1 referente ao espalhamento da radiação (scattering Rayleigh); pico 2 referente à emissão dos resíduos Trp e Tir e o pico 3 referente à emissão da cadeia polipeptídica da estrutura da urease.....	66
Tabela 4- Parâmetros de ligação de fluorescência sincronizada para os compostos secundários de líquen e urease.....	68
Tabela 5- Relação das constantes de ligação da urease na ausência (K_b) e na presença (K_b') de substrato ou dos inibidores clássicos da urease, nas seguintes condições: urease 1,0 μM , 25 μM de substrato ou inibidor, compostos de líquen (1,0-80 μM). HU: hidroxiiureia (inibidor competitivo); OMP: omeprazol (inibidor não competitivo) e TU: tioureia (inibidor competitivo)	69
Tabela 6- Concentração inibitória mínima (MIC; μM) de metabólitos secundários de líquen necessários para inibir o crescimento de <i>H. pylori</i> . Hidroxiiureia (HU), omeprazol (OMP) e tioureia (TU) foram usados como referências de inibidores de urease.....	72
Tabela 7- Valores de IC_{50} para várias classes de inibidores de urease.....	73
Tabela 8- Parâmetros de ligação e termodinâmicos referentes à interação entre a COC, seu metabólito o CE e a HSA.....	78
Tabela 9- Parâmetros de fluorescência tridimensional para HSA livre (pH 7,4) ou na presença de compostos COC e CE. Proteína e ligantes foram usados em 2,0 e 40 μM , respectivamente, sendo o pico 1 referente ao espalhamento da radiação (scattering Rayleigh); pico 2 referente à emissão dos resíduos Trp e Tir e o pico 3 referente à emissão da cadeia polipeptídica da estrutura da HSA.....	86
Tabela 10- Parâmetros relacionados aos estudos de fluorescência sincronizada para os resíduos Tir e Trp quanto a interação da HSA com COC e CE.....	89

Tabela 11- Parâmetros relacionados ao índice de hidrofobicidade da superfície da proteína (PSH) para os sistemas HSA+ANS na ausência e na presença dos ligantes COC e CE.....	93
Tabela 12- Parâmetros calculados relacionados ao processo de FRET quanto a interação entre HSA-COC e HSA-CE.....	94
Tabela 13- Parâmetros de ligação e FRET de alcaloides para fins de comparação.....	96
Tabela 14- Estimativa da variação da estrutura secundária da HSA empregando CD na ausência e presença de COC e CE, Condições: tampão fosfato 5 mM (pH 7,4), HSA a 2 μ M, COC e CE avaliados a 5, 10 e 20 μ M.....	100
Tabela 15- Deslocamento químico (δ) de ^1H (600 MHz) da COC na ausência e presença de HSA no excesso de 25 vezes menor que o ligante em tampão fosfato 10 mM em D_2O a pH 7,4.....	103
Tabela 16- Deslocamentos químicos (δ) do RMN ^1H (600 MHz) do CE na ausência e na presença de HSA em um excesso de 25 vezes menor que o ligante em tampão fosfato 10 mM em D_2O a pH 7,4.....	103

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

3D	Tridimensional
A	Absorvância
ANS	Ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato
CE	Cocaetileno
Cis	Cisteína
COC	Cocaína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DC	Dicroísmo circular
F	Fluorescência na presença do ligante
F ₀	Fluorescência na ausência do ligante
FRET	Transferência de energia por ressonância de fluorescência
HSA	Albumina do Soro Humano (<i>Human Serum Albumin</i>)
K _b	Constante de ligação
K _{SV}	Constante de Stern-Volmer
MIC	Concentração inibitória mínima
<i>n</i>	Número de sítios de ligação do complexo
nm	Nanômetros
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoeletrônico
pK _a	Constante de dissociação
PSH	Índice de Hidrofobicidade Superficial da Proteína
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Tir	Tirosina
Trp	Triptofano
UV	Ultravioleta-visível
Var	Varfarina
ΔG	Energia livre de Gibbs
ΔH	Varição de Entalpia
ΔS	Varição de Entropia
μL	Microlitros
USN	Ácido Úsnico
FUM	Fumarprotocetrárico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Proteínas como um alvo de estudos.....	17
1.2 Urease: estrutura, função e importância.....	21
1.2.1 Urease bacteriana.....	24
1.3 Albumina do soro humano: estrutura, função e importância.....	25
1.3.1 Principais sítios de ligação da HSA.....	26
1.3.2 Importância de realizar estudos de interação com a HSA.....	28
1.4 Compostos que interagem com proteínas: ligantes.....	29
1.4.1 Metabólitos secundários de líquens.....	30
1.4.2 Cocaína e cocaetilenó.....	32
<i>1.4.2.1 Uso associado de cocaína com bebidas alcólicas.....</i>	<i>33</i>
1.5 Técnicas para avaliação do processo de interação proteína-ligante.....	35
1.5.1 Espectroscopia de absorção no UV-visível.....	35
1.5.2 Espectroscopia de fluorescência molecular.....	37
<i>1.5.2.1 Supressão de fluorescência – quenching.....</i>	<i>40</i>
<i>1.5.2.2 Constantes de ligação (K_b) e parâmetros termodinâmicos.....</i>	<i>41</i>
<i>1.5.2.3 Fluorescência tridimensional (3D)</i>	<i>42</i>
<i>1.5.2.4 Fluorescência sincronizada.....</i>	<i>42</i>
<i>1.5.2.5 Avaliação do sítio preferencial de ligação.....</i>	<i>43</i>
<i>1.5.2.6 Influência de espécies biológicas no processo de interação.....</i>	<i>44</i>
<i>1.5.2.7 Transferência de energia por ressonância de Förster (FRET).....</i>	<i>45</i>
<i>1.5.2.8 Índice de hidrofobicidade.....</i>	<i>46</i>
1.5.3 Dicroísmo Circular (DC).....	47
1.5.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	48
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO TRABALHO.....	50
3 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	51
3.1 Geral.....	51
3.2 Específicos.....	51
4 EXPERIMENTAL.....	52
4.1 Reagentes e preparo das soluções.....	52
4.2 Equipamentos utilizados.....	53
4.3 Procedimentos experimentais.....	54

4.3.1 Ensaio enzimático.....	54
4.3.2 Medidas de fluorescência no estado estacionário.....	54
4.3.3 Fluorescência tridimensional (3D): alterações conformacionais.....	55
4.3.4 Fluorescência sincronizada: avaliação dos resíduos de Tir e Trp.....	55
4.3.5 Avaliação dos sítios de ligação e estudos de competição.....	56
4.3.6 Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET).....	56
4.3.7 Avaliação de regiões hidrofóbicas da proteína – sonda ANS.....	57
4.3.8 Interação proteína-ligante empregando fluorescência e UV-vis.....	57
4.3.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	57
4.3.10 Dicroísmo Circular.....	58
4.3.11 Ressonância Magnética Nuclear.....	58
5 RESULTADOS.....	59
5.1 Estudos de interação entre metabólitos secundários de líquens e urease	59
5.1.1 Efeito dos metabólitos secundários de líquen na atividade enzimática da urease.....	59
5.1.2 Avaliação dos parâmetros de ligação e termodinâmicos.....	60
5.2 Estudos de alterações conformacionais da urease.....	64
5.2.1 Avaliação da alteração da estrutura da urease por fluorescência 3D.....	64
5.2.2 Fluorescência sincronizada	67
5.3 Estudos de competição.....	69
5.4 Efeito dos metabólitos secundários de líquen no crescimento da <i>H. pylori</i>.....	71
5.5. Estudos de interação entre cocaína, seu metabólito cocaetilenol e HSA... ..	75
5.5.1. Avaliação dos parâmetros de ligação e termodinâmicos.....	75
5.6 Avaliação da interação entre os alcaloides COC e CE com HSA por UV-vis.....	81
5.7 Influência da força iônica no processo de interação entre COC e CE com HSA.....	82
5.8 Avaliação da conformação da HSA.....	84
5.8.1 Avaliação do processo de interação por fluorescência 3D	84
5.8.2 Fluorescência sincronizada.....	87
5.9 Sítios de ligação na HSA.....	89
5.9.1 Avaliação do sítio preferencial de ligação entre COC e CE com HSA.....	89

5.9.2 Avaliação dos sítios hidrofóbicos e índice de hidrofobicidade (PSH).....	91
5.10 Índice de hidrofobicidade	92
5.11 Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET).....	94
5.12 Avaliação da influência de competidores no processo de interação.....	97
5.13 Estudos por Dicroísmo Circular.....	98
5.14 Estudos por RMN.....	100
6 CONCLUSÃO.....	104
7 PERSPECTIVAS.....	104
8 REFERÊNCIAS.....	105
APÊNDICE I.....	128
APÊNDICE II.....	129
APÊNDICE III.....	130
APÊNDICE IV.....	131
APÊNDICE V.....	132
APÊNDICE VI.....	133
APÊNDICE VII.....	134
APÊNDICE VIII.....	135

1 INTRODUÇÃO

1.1 Proteínas como um alvo de estudos

No processo de reconhecimento molecular as macromoléculas biológicas interagem umas com as outras ou com várias moléculas pequenas por meio de interações não covalentes para formar um complexo supramolecular, que é estabilizado por interações não-covalentes mais fracas e reversíveis (NGUYEN et al., 2001; LENH, 1996).

Neste contexto, as proteínas, que são as unidades fundamentais de todas as células, desempenham um papel vital em várias atividades celulares e sistemas reacionais (CHOWDHRY & HARDING, 2001). Essas macromoléculas são constituídas por diferentes sequências de aminoácidos (estrutura primária) que determina o grau de dobramento em uma estrutura tridimensional específica, reponsável por suas diferentes estruturas e, conseqüentemente, funções e categorias, as quais, incluem, por exemplo: enzimas, proteínas transportadoras, proteínas estruturais, proteínas de sinalização, entre outras (GUANGLIN, 2016).

Essas inúmeras funções são realizadas pelas proteínas por meio de interações diretas com outras moléculas tais como ligantes endógenos e exógenos, como oxigênio, solvente e íons, ou macromoléculas, como outras proteínas, peptídeos, DNA, lipídeos, entre outras (ROCHE, BRACKENRIDGE, MCGUFFIN, 2015). A ligação de uma proteína com outras moléculas, de forma geral, apresenta elevada seletividade/afinidade para desempenhar adequadamente sua função. Por esta razão, a região da proteína que interage com outras moléculas, denominada de sítio de ligação, consiste de uma sequência específica de aminoácidos que possuem cadeias laterais acessíveis ao ligante (SALENTIN et al., 2014; ALBERTS et al., 2010).

Em geral, quando uma proteína (P) se liga de forma reversível a um determinado ligante (L) este sistema pode ser representado pela equação 1 de equilíbrio genérico:

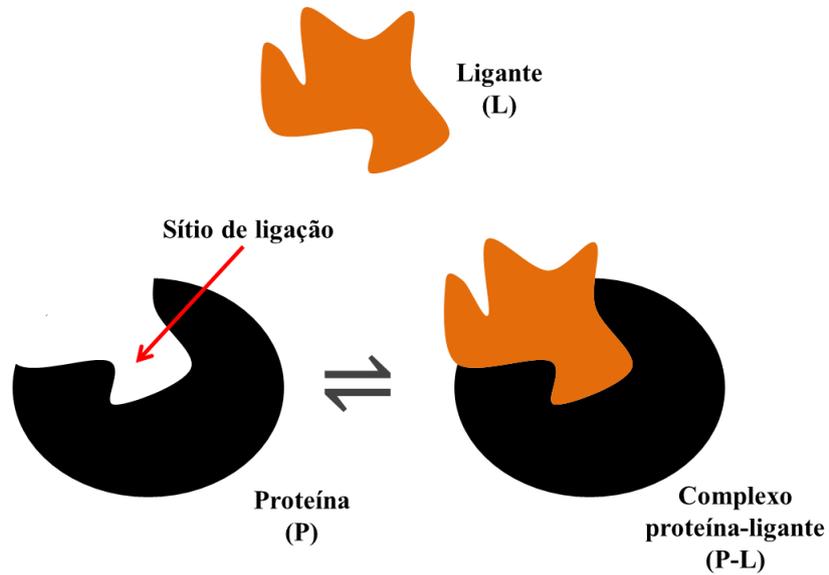


onde (PL) é o complexo proteína-ligante (ROCHE, BRACKENRIDGE, MCGUFFIN, 2015; MATSUSHITA et al., 2016) como mostrado na Figura 1

Para explicar o mecanismo genérico representado anteriormente pode-se considerar três modelos: (a) chave-fechadura, (b) ajuste induzido e (c) seleção conformacional (Figura 2). Para o modelo chave-fechadura tanto a proteína como o

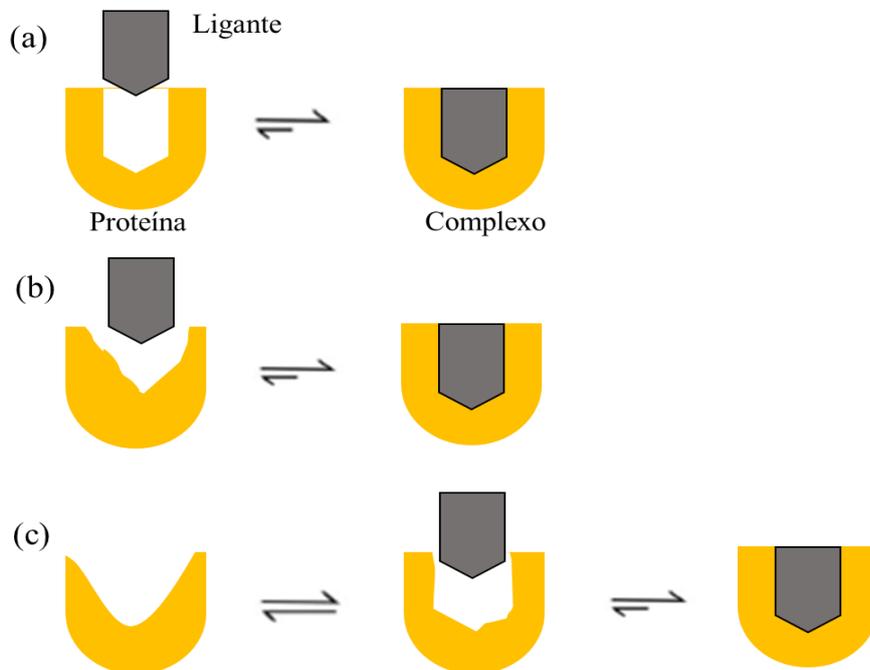
ligante possuem uma estrutura rígida, assim, a região de ligação de ambos deve ser perfeitamente compatível para ocorrer interação entre eles.

Figura 1- Exemplo de ligação reversível proteína-ligante.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 2- Formação do complexo proteína-ligante, considerando os modelos: (a) chave-fechadura, (b) ajuste induzido e (c) seleção conformacional.

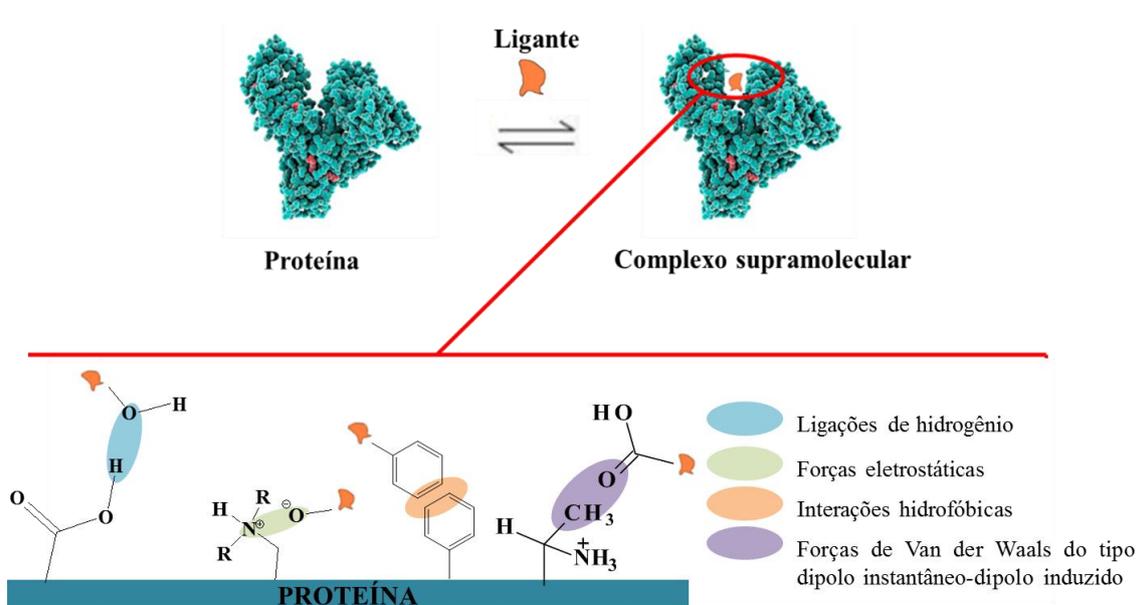


Fonte: adaptado de DU et al., 2016.

O modelo ajuste induzido é mais completo, uma vez que consegue explicar o fato de uma proteína interagir com um ligante mesmo quando suas formas iniciais não são compatíveis, pois, o sítio de ligação é flexível às alterações conformacionais induzidas pelo ligante. Mesmo assim, este modelo apresenta limitações, pois só leva em conta a flexibilidade conformacional do sítio de ligação da proteína, além de tratar a conformação da proteína como única e estável sob determinadas condições experimentais e, isto não é o que realmente ocorre com a maioria das proteínas. O modelo de seleção conformacional é o que melhor explica o mecanismo de interação proteína- ligante, pois leva em conta essa flexibilidade intrínseca. Segundo este modelo, a proteína em seu estado nativo não existe com uma única conformação, mas sim como um conjunto de vários estados/subestados conformacionais que coexistem em equilíbrio, assim o ligante pode ligar-se seletivamente ao estado/subestado conformacional mais adequado e energeticamente favorável (DU et al., 2016; SALENTIN et al., 2014).

O que determina o estado/subestado mais adequado para a interação proteína-ligante é formação de um conjunto de ligações fracas não-covalentes, as quais estão representadas na Figura 3 e melhor descritas na Tabela 1. Esse conjunto de ligações intermoleculares deve fornecer um estado conformacional mais estável e de menor energia (MATSUSHITA et al., 2016).

Figura 3- Ligações não-covalentes envolvidas no processo de interação proteína-ligante.



Fonte: Adaptado de Silva, 2017.

Tabela 1- Energias de ligação envolvidas nas ligações não-covalentes.

Tipo de ligação	Energia de ligação (kcal mol ⁻¹)	Característica
Ligação de hidrogênio	0,24 a 2,4	Entre átomos eletronegativos, como oxigênio, nitrogênio, flúor, e o átomo de hidrogênio de ligações O-H e N-H,
Interação eletrostática	1,0 a 7,0	Entre dipolos e/ou íons de cargas opostas (depende da constante dielétrica do meio e da distância entre as cargas).
Interação hidrofóbica	1,0	Ocorre em função da interação entre cadeias ou subunidades apolares, que estão organizadamente solvatadas por camadas de moléculas de água.
Interação de Van der Waals	0,5 a 1,0	Entre moléculas apolares que apresentam dipolos induzidos em função da polarização transitória proveniente de ligações C-C ou C-H.

Fonte: Adaptado de BARREIRO & FRAGA, 2015

Em suma, o conhecimento dos mecanismos responsáveis pelo reconhecimento e afinidade da ligação proteína-ligante auxilia na descoberta, planejamento e desenvolvimento de novos fármacos, sendo possível também compreender as possíveis mudanças na conformação das proteínas causadas pelas interações proteína-ligante (BARREIRO & FRAGA, 2015).

Portanto, existem vários modelos de proteínas que podem ser utilizados em estudos de interação macromolécula-ligante, fornecendo uma variedade de informações relevantes. A exemplo, pode-se citar: hemoglobina (BASU & CHAKRABARTI, 2015), albumina do soro humano (HSA) (SHAHABADI; BAZVANDI; TAHERPOUR, 2017) albumina do soro bovino (BSA) (BUDDANAVAR & NANDIBEWOR, 2017), catalase (NAJJAR et al., 2017), ovalbumina (DANTAS et al., 2017), urease (LAGE et al., 2018) e lipase pancreática (GONÇALVES, MATEUS, DE FREITAS, 2010), entre outras. Neste trabalho serão utilizados como modelos a urease e a albumina do soro humano (ROCHE, BRACKENRIDGE, MCGUFFIN, 2015; GULER, 2013). A seguir, uma abordagem geral sobre estas proteínas será realizada quantos as suas principais funções e características.

1.2 Urease: estrutura, função e importância

A urease é uma metaloenzima (Figura 3) que contém dois íons de níquel em seu sítio ativo (KAFARSKI & TALMA, 2018). A ativação do sítio também já foi observada, *in vitro*, com íons manganês e cobalto (SUJOY & APARNA, 2013).

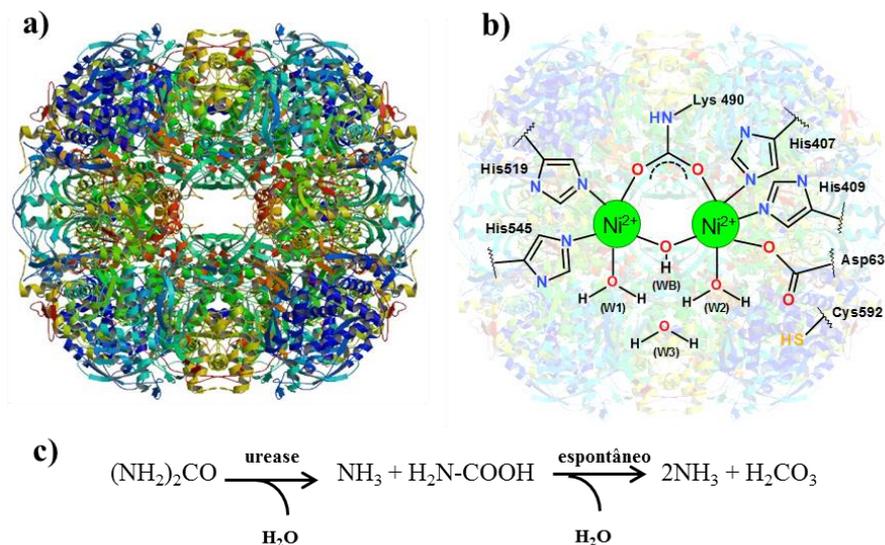
Os íons de Ni(II) no centro ativo da urease estão ligados em ponte por um resíduo de lisina carbamilada e por um íon hidróxido, apresentando elevada afinidade e a remoção destes só ocorre com o uso de desnaturantes ou ácidos, o que não é o caso na maioria das outras metaloenzimas (KAFARSKI & TALMA, 2018; KRAJEWSKA, 2009). Além disso, cada íon metálico também está ligado a dois resíduos de histidina, e a uma molécula de água, e um dos íons de Ni(II) está ligado a um de aspartato (KAPPAUNA et al., 2018).

A urease é a enzima responsável pela hidrólise da ureia. Esse composto é encontrado no meio ambiente (água e solo) e no corpo humano. Um adulto saudável excreta cerca de 30 g de ureia por dia pela urina. No entanto, a ureia não está presente apenas na urina, mas também no soro sanguíneo, suor e até no estômago (GOULD, 2014; KONIECZNA et al., 2012).

O mecanismo de hidrólise da ureia pela urease já tem sido bem discutido. De forma geral, a ureia desloca as moléculas de água do sítio ativo da urease e se liga a um dos íons de Ni(II), através do oxigênio carbonílico, tornando o carbono da ureia mais eletrofílico e, portanto, mais suscetível ao ataque nucleofílico. Em seguida, a ureia se liga ao outro íon de Ni(II) por meio de um de seus átomos de nitrogênio amino, estabelecendo uma ligação bidentada com a urease, o que facilita o ataque nucleofílico no carbono carbonílico, resultando em um intermediário tetraédrico, a partir do qual NH₃ e carbamato são liberados (KAPPAUNA et al., 2018). Esse processo ocorre espontaneamente em condição de pH fisiológico (7,20) e a enzima é ativa no intervalo de pH entre 4 -10, tendo seu pH ótimo próximo a 8 (BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010; KONIECZNA et al., 2012; LAGE et al., 2018). As principais divergências surgem com relação ao ataque nucleofílico. Enquanto Benini e col. (1999) defendem que o ataque nucleofílico ocorre pela hidroxila ligada em ponte entre os íons de Ni(II), Karplus e col. (1997), propuseram que o ataque seria via o oxigênio da hidroxila coordenada como molécula de água ligada ao Ni(II). Assim, do ponto de vista reacional, o processo de hidrólise envolve duas etapas: na primeira, uma molécula de amônia e uma molécula de carbamato são formadas. Em solução aquosa, a segunda etapa consiste na conversão espontânea do carbamato a segunda molécula de amônia e ácido carbônico, como

mostrado na Figura 4(c). Este processo resulta no aumento de pH, por conta do caráter básico da amônia (GOULD, 2014; KONIECZNA et al., 2012).

Figura 4- (a) Estrutura em tridimensional da urease; (b) sítio ativo da urease, sendo w_1 , w_2 e w_3 moléculas de água; (c) reação de hidrólise da ureia;



Fonte: Adaptado de LAGE et al., 2018.

A atividade enzimática da urease foi identificada pela primeira vez em 1876 por Frédéric Alphonse Musculus como um fermento solúvel. Em 1926, James B. Sumner, mostrou que a urease é uma proteína ao examinar a forma cristalizada da urease de feijão (*Canavalia ensiformis*), a qual foi a primeira enzima a ser cristalizada. O trabalho de Sumner foi a primeira demonstração de que uma proteína pode funcionar como uma enzima (SUMNER, 1926; SUMNER; KIRK; HOWELL, 1932).

A urease é encontrada em bactérias, fungos, algas, plantas e alguns invertebrados, bem como nos solos. Nas plantas, a urease é amplamente distribuída em sementes de leguminosas (KONIECZNA et al., 2012; BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010). A urease de vegetais e fungos é uma proteína constituída por subunidades idênticas, de aproximadamente 90 kDa cada, mais comumente organizadas como trímeros e hexâmetros. A urease *jack-bean*, por exemplo, é composta por 840 aminoácidos, sendo 90 resíduos de cisteína, além de quatro resíduos de triptofano nas posições 495, 648, 708 e 728, com massa molecular, sem os íons Ni(II), de 90,77 kDa. Já a urease bacteriana é composta por três subunidades distintas, uma α (de 60-76 kDa), β (de 8-21 kDa) e γ (de 6-14 kDa), sendo uma enzima rica em cisteína, tendo massa molar entre 190 e 300 kDa. As ureases bacterianas e vegetais apresentam alta similaridade na sequência de aminoácidos, sugerindo que possuem estruturas tridimensionais semelhantes e um

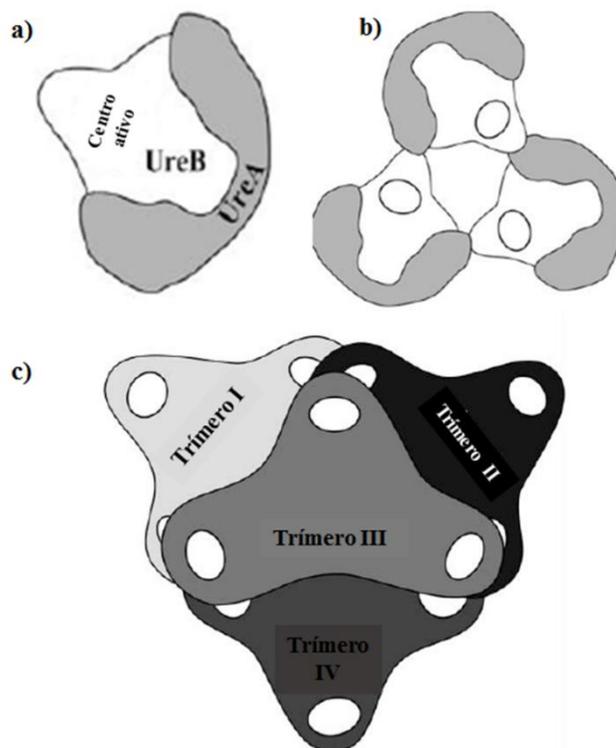
mecanismo catalítico conservado (KONIECZNA et al., 2012; BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010).

Por outro lado, diversas bactérias patogênicas apresentam atividade ureolítica, como por exemplo, *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Ureaplasma urealyticum*, *Yersinia enterocolitica* e *Helicobacter pylori*. Uma das ureases bacterianas mais estudadas é a da *H. pylori*, pois essa bactéria é responsável por causar úlceras pépticas, uma das causas do câncer de estômago, sendo relatado por Muller e colaboradores (2007) que os indivíduos infectados apresentam probabilidade 10 vezes maior para a ocorrência de lesão da mucosa gástrica (KONIECZNA et al., 2012). Nas populações do norte da Europa e da América do Norte, cerca de um terço dos adultos ainda estão infectados, enquanto no sul e leste da Europa, América do Sul e Ásia, a prevalência de *H. pylori* é frequentemente superior a 50% (EUSEBI et al., 2014)

A produção de urease pela *H. pylori* é o principal fator que permite essa bactéria sobreviver no ambiente ácido do estômago, antes de infectar sua mucosa, pois a urease hidrolisa a ureia em amônia e CO₂, resultando no aumento do pH no micro-ambiente em seu entorno (LAGE et al., 2018). Essa característica difere a *H. pylori* de algumas bactérias, uma vez que esta condição de pH altamente ácido é hostil para a maioria dos microrganismos. Cerca de 99,9% da *Salmonella* e *Vibrio sp.*, por exemplo, ao ser ingeridas morrem quando expostas ao ácido gástrico (STRUGATSKY, 2013; KONIECZNA et al., 2012).

A estrutura altamente complexa da urease de *H. pylori* é a responsável por permitir sua atividade em condições ácidas, quando outras ureases sofrem inativação não reversível. A urease da *H. pylori* é composta por apenas duas subunidades: UreA (β -61,7 kDa) e UreB (α -26,5 kDa) (Figura 5 (a)). Os polipeptídios α e β são ligados formando trímero, onde o domínio *N*-terminal da subunidade β é essencial no processo de agregação (Figura 5 (b)). Em seguida, quatro trímeros formam um complexo tetraédrico, como mostrado na Figura 5. (HA et al., 2001; STRUGATSKY, 2013).

Figura 5- Esquema de estrutura da *H. pylori*: (a) monômeros de urease da *H. pylori*; (b) trímeros de urease da *H. pylori* ; (c) associação dos trímeros da urease da *H. pylori* .



Fonte: Adaptado de KONIECZNA et al., 2012.

1.2.1 Importância de inibir a ação da urease

Atualmente há a necessidade do desenvolvimento de inibidores de urease uma vez que existe potencial de aplicação em diversas áreas, como genética, bioquímica, fisiologia, agricultura, pecuária, engenharia e medicina, destacando-se as aplicações clínicas e agrícolas (KRAJEWSKA, 2018; MODOLO et al., 2018; GRAHAMA & MIFTAHUSSURUR, 2018; CANTARELLA et al., 2018).

No contexto clínico, as ureases bacterianas podem servir como um meio pelo qual determinadas bactérias conseguem se multiplicar em um determinado organismo, provocando complicações, como a formação de cálculos urinários, úlcera péptica ou câncer gástrico (principalmente com *H. pylori*) resultante da infecção dos tratos urinários e gastrointestinais, respectivamente (GRAHAMA & MIFTAHUSSURUR, 2018)

Durante os últimos 20 anos, o tratamento para *H. pylori* consiste na associação dos antibióticos amoxicilina e claritromicina com omeprazol, um inibidor de células da

bomba de prótons e também inibidor de urease (GRAHAMA & MIFTAHUSSURUR, 2018). Porém, com o aumento da resistência da *H. pylori* a estes antibióticos, esse tratamento foi se tornando ineficaz. Assim, outras estratégias de tratamento surgiram, como o uso de sais de bismuto combinados com um inibidor da bomba de prótons ou combinações de outras classes de antibióticos como fluoroquinolonas, aminopenicilinas e tetraciclinas (KRAJEWSKA, 2018). Mas, quando se trata de resistência a antibióticos, a *H.pylori* ainda é um desafio.

Assim, a inibição da atividade da urease pode ser um meio promissor de tratamento para bactérias produtoras de urease (CLYNE & DRUMM, 1996; MODOLO et al., 2014). No entanto, os inibidores da urease comercialmente disponíveis, tais como fosforodiamidatos, derivados do ácido hidroxâmico e imidazóis são tóxicos e de baixa estabilidade, o que impedem seu uso clínico. Então, tem-se buscado novos inibidores de urease com estabilidade melhorada e baixa toxicidade.

No contexto agrícola, a ureia é usada como fertilizante nitrogenado em todo o mundo. Este composto orgânico apresenta algumas vantagens em relação a outros fertilizantes nitrogenados, como alto teor de N (46%), baixo preço, solubilidade em água e facilidade de manejo (MODOLO et al., 2018). No entanto, em condições de campo, a eficiência da ureia pode ser reduzida devido a perdas de nitrogênio (mais de 50%) causada, entre outros fatores, pela volatilização da amônia (NH₃) a partir da ação de ureases presentes nos microrganismos do solo, o que pode levar a um desequilíbrio no ciclo do nitrogênio, implicando em desastres ambientais a longo prazo, quando as populações de bactérias já foram selecionadas. Além disso, pode vir a ser tóxica e levar danos às plantas devido a exposição a amônia e, a necessidade do uso de maior quantidade de fertilizante para atender a uma determinada área de lavoura (MODOLO et al., 2014; CANTARELLA et al., 2018). Assim, estratégias baseadas na inibição da urease devem ser consideradas visando diminuir a perda de ureia, pois só existe um inibidor disponível comercialmente, o NBPT (N-(n-butil) tiofosfórico triamida) (CANTARELLA et al., 2018).

1.3 Albumina do soro humano: estrutura, função e importância

A albumina do soro humano (HSA) é uma proteína carreadora constituída por uma única cadeia de polipeptídeos não glicosilados que contém 585 aminoácidos com uma massa molecular de 66.5 kDa (GHUMAN et al., 2005). A estrutura secundária da proteína

é composta por cerca de 67% de α -hélice tendo seis regiões de enovelamento e 17 pontes dissulfeto. Sob condições fisiológicas (pH = 7,20) a HSA apresenta carga negativa, uma vez que seu pI é aproximadamente 4,7. Nesta condição de pH, a HSA adota uma estrutura tridimensional em forma de “*coração*” tendo três domínios homólogos I-III. A concentração da HSA no plasma humano varia de 34 a 54 g L⁻¹, e compreende de 50-60% das proteínas presentes no plasma humano, além disto, possui uma meia vida de 19 dias (PETITPAS et al., 2001; VLASOVA & SALETSKY, 2009).

A HSA desempenha um importante papel na regulação da pressão osmótica e no transporte de vários compostos endógenos, como ácidos graxos, vitaminas, hormônios, metabólitos tóxicos (bilirrubina, por exemplo), aminoácidos, íons metálicos e compostos exógenos, como uma variedade de fármacos, os quais podem se encontrar ligadas às proteínas do plasma ou nas suas formas livres (MATSUSHITA et al., 2017; PETITPAS et al., 2001).

1.3.1 Principais sítios de ligação da HSA

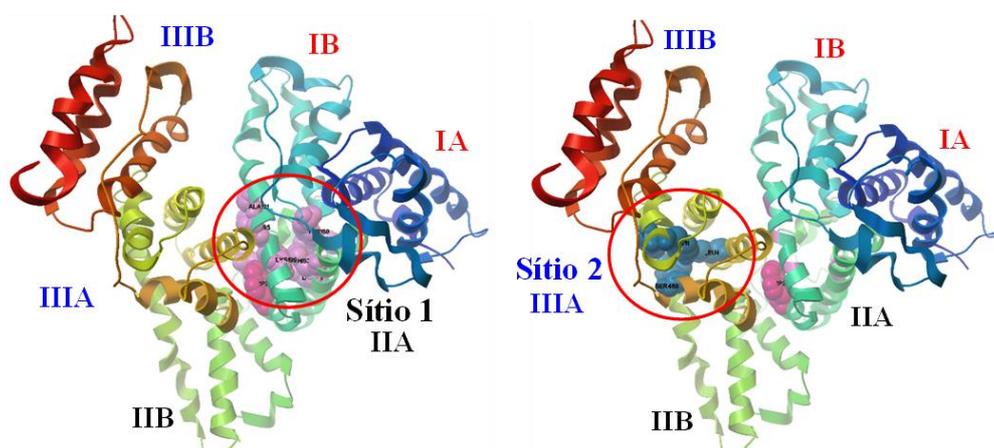
Estudos recentes de cristalografia de raios-X demonstraram claramente a presença de sítios preferenciais de interação da HSA, e uma vez estabelecida a interação proteína-ligante pode levar a mudanças na conformação da proteína (YAMASAKI et al., 2013; RANJBAR et al., 2013). Além disso, dados cristalográficos mostram que a HSA contém três domínios, denominados I, II e III, os quais podem se dividir em subdomínios A e B, como ilustrado na Figura 6. Sendo observado também que a HSA contém 35 resíduos de cisteína, e todos, exceto Cis34 (no subdomínio IB), estão envolvidos na formação de ligações dissulfeto que servem para estabilizar a estrutura tridimensional da proteína. As interações entre domínios e subdomínio também contribuem significativamente para a estabilidade da macromolécula (ABDOLLAHPOUR et al., 2016).

Estudos pioneiros de Sudlow usando um método de deslocamento de sonda fluorescente mostraram a presença de dois sítios preferenciais para a ligação com fármacos na HSA: o sítio I (sítio da varfarina) e sítio II (o sítio de ligação da benzodiazepina) (SJÖHOLM et al. 1979; SUDLOW, BIRKETT, WADE, 1976). Em seguida, uma série de estudos para caracterizar os ambientes dos sítios I e II foram realizados. Inicialmente, Fehske e col. (1982), demonstraram a existência de um único resíduo de triptofano (Trp214) na estrutura da HSA, localizado no sítio I, enquanto que

Yamasaki e col (1996), prôpos a existência de três regiões de ligação (subsítio Ia, Ib e Ic) dentro do sítio I.

Bos e col. (1987), utilizaram fragmentos de albumina humana após ação enzimática da pepsina e tripsina para prôpor que os sítios I e II estavam localizados nos domínios II e III, respectivamente. Atualmente, estudos cristalográficos comprovam que os sítios I e II são atribuídos aos subdomínios IIA e IIIA, respectivamente (YAMASAKI, 2013; GUIZADO, 2014).

Figura 6- Estrutura e sítios de ligação da albumina do soro humano (HSA).



Fonte: Elaborado pela autora, 2019

Ligantes preferenciais do sítio I são geralmente ácidos dicarboxílicos e/ou moléculas heterocíclicas volumosas com uma carga negativa localizada no meio da molécula. Além disso, estudos cristalográficos demonstraram que o sítio I é maior do que o sítio II e que apresenta características apolares, em grande parte, com regiões polares localizadas centralmente (formadas pelas cadeias laterais de Tir150, His242 e Arg257 localizado na parte interior e Lis195, Lis199, Arg218 e Arg222 na parte externa). A preferência por compostos aromáticos planos, como varfarina, fenilbutazona, azapropazona, furosemida, é devido aos compostos serem capazes de se ajustarem entre as cadeias de Leu238 e Ala291 no centro da cavidade (YAMASAKI, 1996), e desta forma, o sítio I mostra pobre estereoseletividade em função de sua flexibilidade (KRAGH-HANSEN, 1985).

De acordo com a estrutura cristalina da HSA, o sítio II é uma cavidade em grande parte apolar com uma única região polar dominante perto da entrada do sítio, centrado na Tir411 e Arg410. Este arranjo polar e apolar é consistente com as estruturas típicas das moléculas que se ligam preferencialmente ao sítio II, que são ácidos carboxílicos

aromáticos com uma função ácida carregada negativamente na extremidade da molécula e separadas por um centro hidrofóbico. O diazepam (7 - cloro- 1, 3- dihidro- 1- metil- 5- fenil- 1, 4- benzodiazepin- 2 (2H)- ona), diflunisal (5- (2, 4- difluorofenil)- 2- hidroxibenzoico) e ibuprofeno (ácido (RS)- 2- (- (2- metilpropil) fenil) propanoico) são drogas que interagem com o grupo hidroxila da Tir411, no sítio II (KRAGH-HANSEN, 1985). Vale ressaltar que não foram observadas divisões, como observado no caso do sítio I (SUDLOW, BIRKETT, WADE, 1976). O sítio II foi proposto ser menor e menos flexível que o sítio I porque as moléculas grandes raramente se ligam a este sítio (GHUMAN, 2005). O sítio II frequentemente mostra estereoseletividade, ou seja, a magnitude da interação é afetada em função de modificações estruturais do ligante com grupos de pequeno volume (SUDLOW; BIRKETT; WADE, 1976). Por exemplo, o (*R*) ibuprofeno se liga ao sítio II com uma afinidade de 2,3 vezes mais elevada do que o enantiômero *S* (YAMASAKI, 2013).

Nem todos os fármacos se ligam aos sítios I ou II (subdomínios IIA ou IIIA). Sudlow e col. (1976) sugeriram a existência de pelo menos um outro local de ligação para a probenecida (ácido 4- dipropilsulfamóil benzóico), amitriptilina (3- (10, 11- diidro- 5H- dibenzo" a", "d" ciclohepteno-5-ilideno)-*N, N*- dimetil-1- propanamina) e debrisoquina (1, 2, 3, 4- tetra- hidroisoquinolino- 2- carboximidamida) que se ligam fortemente à albumina. Além disso, Sjöholm (1979) e Kragh-Hansen (1985) demonstraram o sítio de ligação da digitoxina o qual ainda não foi totalmente esclarecido, contudo não está associado ao sítio I ou II. O ibuprofeno e o diflunisal têm um sítio de ligação secundário, que fica na interface entre os subdomínios IIA e IIB, e que é o sítio preferencial para oxifenilbutazona, no subdomínio IIB (SUDLOW, BIRKETT, WADE, 1976).

Para identificar o sítio de ligação de uma grande variedade de compostos com a HSA são usadas moléculas, denominadas de marcadores, que se ligam seletivamente aos sítios I e II, em ensaios de competição empregando diferentes técnicas instrumentais (SUDLOW, BIRKETT, WADE, 1976, RANJBAR et al., 2013).

1.3.2 Importância de realizar estudos de interação com a HSA

Devido a sua função transportadora, as albuminas do soro humano têm sido muito estudadas dentro da bioquímica e biofísica, sendo empregadas como modelo de proteína, visando explorar sua capacidade de interagir com diversos ligantes. Esse atributo confere grande importância a esta proteína, uma vez que a farmacocinética e farmacodinâmica de

drogas lipossolúveis depende fortemente de sua interação com a HSA. Além disso, a interação da HSA com drogas proporciona uma visão sobre terapia medicamentosa e *design* de fármacos e desta forma, é possível prever sobre a eficácia de compostos como agente terapêutico a depender do grau de interação (LIU et al., 2016; SLEEP, CAMERON, EVANS, 2013).

O desenvolvimento de vários medicamentos explorou a interação dos mesmos com a HSA, como exemplo, as drogas Levemir[®] e Victosa[®]. Aquele é um análogo da insulina em que um ácido graxo (ácido mirístico) está ligado ao aminoácido lisina na posição B29, enquanto este é um derivado do peptídeo do tipo glucagon (GLP-1) com um ácido mirístico na posição ϵ -amino da lisina N-terminal. Foi observado que, a partir da ligação de um ácido graxo na cadeia dessas moléculas o tempo de meia-vida aumentou de 4-6 min para 5-7 h e de aproximadamente 2min para 11-15 h, respectivamente. Isso ocorreu pelo fato de que quando essas moléculas se encontraram associadas a um ácido graxo, passaram a se ligar à HSA em sítios hidrofóbicos, sendo, posteriormente, dissociadas lentamente, prolongando a biodisponibilidade. Adicionalmente, Trussel e colaboradores (2009) sintetizaram o ácido 4- (*p*- iodofenil) butanoico, o qual possui capacidade de ligar-se fortemente à albumina e dessa forma, aumentar o tempo de meia-vida, permitindo assim, aumentar a meia-vida de um anticorpo de cadeia única (scFv), de 20 min para cerca de 40 h em camundongos (SLEEP, CAMERON, EVANS, 2013). Além disso, muitos medicamentos podem ter sua solubilidade melhorada, uma vez que a HSA tem a capacidade de se ligar a substâncias de baixa solubilidade, como ácidos graxos, porfirinas e uma ampla variedade de drogas (SULTAN et al., 2015).

Em virtude da importância de estudos de interação proteína-ligante, é necessário um entendimento detalhado desse mecanismo e isso implica em conhecer não só as características das proteínas, mas também das particularidades dos ligantes avaliados, o que será discutido nos próximos tópicos.

1.4. Compostos que interagem com proteínas: ligantes

Um ligante pode ser definido como qualquer composto de estrutura química definida de variada massa molar com alguma função ou propriedade biológica capaz de interagir com macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos ou lipídeos (DU et al., 2016). Neste trabalho, os ligantes avaliados foram pequenas

moléculas como: os isômeros do ácido úsnico (USN) e o ácido fumarprotocetrárico (FUM), além da cocaína (COC) e cocaetileno (CE), em sistemas simulando as condições fisiológicas.

1.4.1 Metabólitos secundários de líquens

Os líquens são associações simbióticas complexas entre fungos e algas e são constituintes importantes de muitos ecossistemas, além disso, eles possuem ampla distribuição e habitam as mais diferentes regiões do planeta (MOLNÁRA & FARKAS, 2010). Eles geralmente crescem em superfícies de rochas, no solo não fértil, bem como nos troncos e folhas de árvores, sendo capazes de sobreviver em situações de estresse ecológico como, alta iluminação, altas temperaturas e escassez de água (ÇOBANOĞLU et al., 2016; CALCOTT et al., 2018).

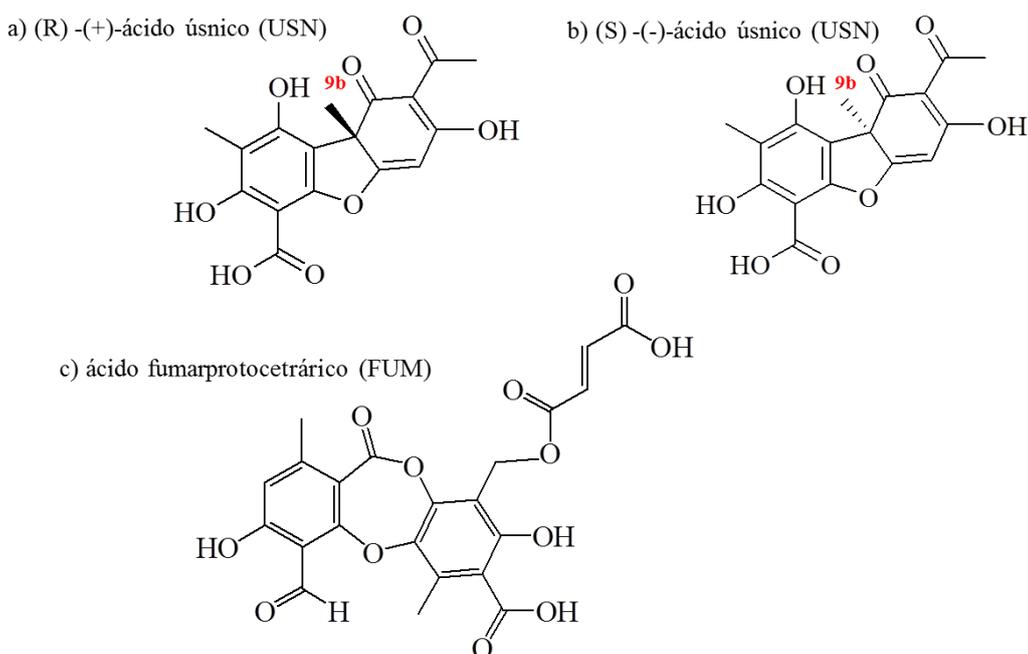
Como resultado dessa simbiose há a produção de metabólitos primários (intracelulares) e secundários (extracelulares) (MACIAĞ-DORSZYŃSKA, WEGRZYN, GUZOW-KRZEMIŃSKA, 2014). Os metabólitos primários são proteínas, aminoácidos, carboidratos, carotenoides, polissacarídeos e vitaminas essenciais para o crescimento vegetativo (KOWALSKI et al., 2011). Já os metabólitos secundários, não são essenciais para o crescimento vegetativo sendo produzidos quando o crescimento microbiano já está na fase estacionária, a partir de um metabólito primário, podendo funcionar como (i) hormônios sexuais, (ii) ionóforos, (iii) compostos competitivos contra bactérias, fungos, amebas, insetos e planta, (iv) agentes de simbiose, (v) efetores de diferenciação, e outras atividades ainda desconhecidas (DEMAIS & ADRIANO, 2008).

Os metabólitos secundários são constituídos por uma grande variedade de compostos alifáticos e aromáticos, principalmente ácidos fenólicos (KOWALSKI et al., 2011), e foram bastante explorados em muitas pesquisas relacionadas às aplicações fitoquímicas e farmacêuticas, pois eles possuem um grande potencial farmacêuticos, incluindo principalmente atividades antimicrobianas, antioxidantes, antivirais, anticancerígenas, antígenotóxicas, anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas (MOLNÁR & FARKAS, 2010). Dentre os metabólitos secundários produzidos por líquens, merecem destaque os isômeros do ácido úsnico e o ácido fumarprotocetrárico, cujas estruturas estão ilustradas na Figura 7 (BAČKOROVÁ et al., 2012). O ácido úsnico (USN) (2, 6- diacetil- 7, 9- dihidroxi- 8, 9b- dimetildibenzo[*b,d*] furan-1, 3(2*H*,9*bH*)-diona) é um composto de coloração amarela que existe em duas formas enantioméricas,

as quais diferem na posição 9b do grupo metila (BAČKOROVÁ et al., 2012). Este metabólito secundário ocorre em muitas espécies de líquens pertencentes a diferentes gêneros, como: *Usnea*, *Evernia*, *Lecanora*, *Cladonia* e *Parmelia*, tendo a importante função de proteger o líquen da radiação de menor comprimento de onda (RUNDEL, 1987), além de ser considerado uma reserva energética em casos de estresse nutricional (VICENTE et al., 1980).

Além disso, é o metabólito secundário de líquen mais amplamente estudado, por conta das suas várias propriedades bioativas, já relatado na literatura sua atividade antiviral, anti-inflamatória, analgésica, antifúngicas e antibactericida (MACIAG-DORSZYNSKA, WEGRZYN, GUZOW-KRZEMINSKA, 2014) para bactérias como, *Mycobacterium tuberculosis* (VARTIA, 1949); *Micrococcus luteus*, *Bacillus licheniformis*, *B. mycoides* e *Streptococcus β-hemolyticus* (BUSTINZA, 1951); *M. aurum* (INGÓLFSDÓTTIR et al, 1998), *B. cereus*, *B. megaterium*, *S. aureus*, *Klebsiela pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* (SAENZ, GARCIA, HOWEL, 2006). Vicente e col. (1973; 1978), estudando a germinação de sementes, demonstraram que o uso do ácido úsnico pode inativar algumas enzimas, como por exemplo, glutamato desidrogenase e a urease.

Figura 7- Estruturas químicas de metabólitos secundários de líquens: (a) (R)-(+)-ácido úsnico, (b) (S)-(-)-ácido úsnico e (c) ácido fumarprotocetrárico.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019

O ácido fumarprotocetrárico (FUM), por sua vez, é uma depsidona produzida pelo líquen *Cladonia verticillaris* (CALCOTT et al, 2018), sendo importante para o organismo produtor, uma vez que pode agregar metais prejudiciais à parede celular de fungos, impedindo sua entrada nas células (HAUCK & HUNECK, 2007), além de possuir atividade antiherbívora (REUMATIMANN & SCHEIDEGGER, 1987) e contribuir na regulação da atividade da urease (VICENTE & XAVIER-FILHO, 1979), pois segundo Legaz e colaboradores (2006), os fenóis liquênicos bloqueiam os grupos – SH essenciais para a atividade enzimática, impedindo a formação dos complexos enzima-substrato, sendo reportado que o ácido fumarprotocetrárico de *C. verticillaris* inibe a urease.

Esse metabólito já tem sido descrito na literatura como um potente bactericida e fungicida. Alguns estudos mostraram sua forte ação contra muitas bactérias, como *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, entre outros (CALCOTT et al, 2018).

Pelo fato desses metabólitos já serem bem estudados e bem caracterizados quanto a estrutura, citotoxicidade, ação antimicrobiana, entre outros, buscou-se avaliar a ação dos mesmos como inibidores de urease, e conseqüentemente como possíveis compostos para o tratamento da *H. pilory*, uma vez que há uma grande demanda da indústria farmacêutica por novas moléculas que não sofreram de detoxificação pelos microrganismos patogênicos, ainda sendo possível conferir a esses compostos uma nova aplicação ainda não explorada, significativamente, na literatura.

1.4.2 Cocaína e cocaetileno

A cocaína (benzoilmetil ecgonina) é um alcaloide extraído das folhas da coca, uma planta cujo nome científico é *Erythroxylum coca*, natural da América do Sul. Além disso, é uma das drogas ilegais mais amplamente usadas no mundo e o vício na cocaína (COC) constitui um problema de saúde pública. Esta droga é vendida na forma de um pó solúvel em água, como cloridrato de cocaína, que pode ser inalado ou injetado. Após inalação sua concentração máxima no plasma é atingida em cerca de 5 min e os níveis máximos no cérebro após cerca de 4-10 min (SUKBUNTHEUNG et al., 1996; DENG et al., 2002). Os usuários de cocaína experimentam uma série de efeitos, como euforia, elevação do humor e aumento da energia sexual, no entanto, alguns efeitos indesejáveis podem ser causados, incluindo paranoia, alucinações e psicose (CASEY LAIZURE et al., 2003).

Os efeitos de euforia, prazer e agitação estão relacionados ao estímulo da biossíntese e bloqueio de receptação de neurotransmissores dopaminérgicos. A dopamina é sintetizada por alguns neurônios em certas regiões do cérebro. Após ser sintetizada, fica armazenada em pequenas vesículas e quando um impulso elétrico chega aos dendritos terminais dos neurônios, essas vesículas liberam seus conteúdos no espaço sináptico (ponto de encontro entre os neurônios). Ali, a dopamina se liga a receptores específicos situados na membrana externa do neurônio seguinte (ROTH et al., 1995), desencadeando a transmissão do impulso nervoso e sendo recapturada ao se ligar a receptores específicos na célula de origem, como um tipo de ciclo de reutilização. A cocaína bloqueia esses receptores, impedindo sua receptação e o acúmulo de dopamina estimula, sucessivamente, o neurônio seguinte (PARKER et al., 1995).

1.4.2.1 Uso associado de cocaína com bebidas alcóolicas

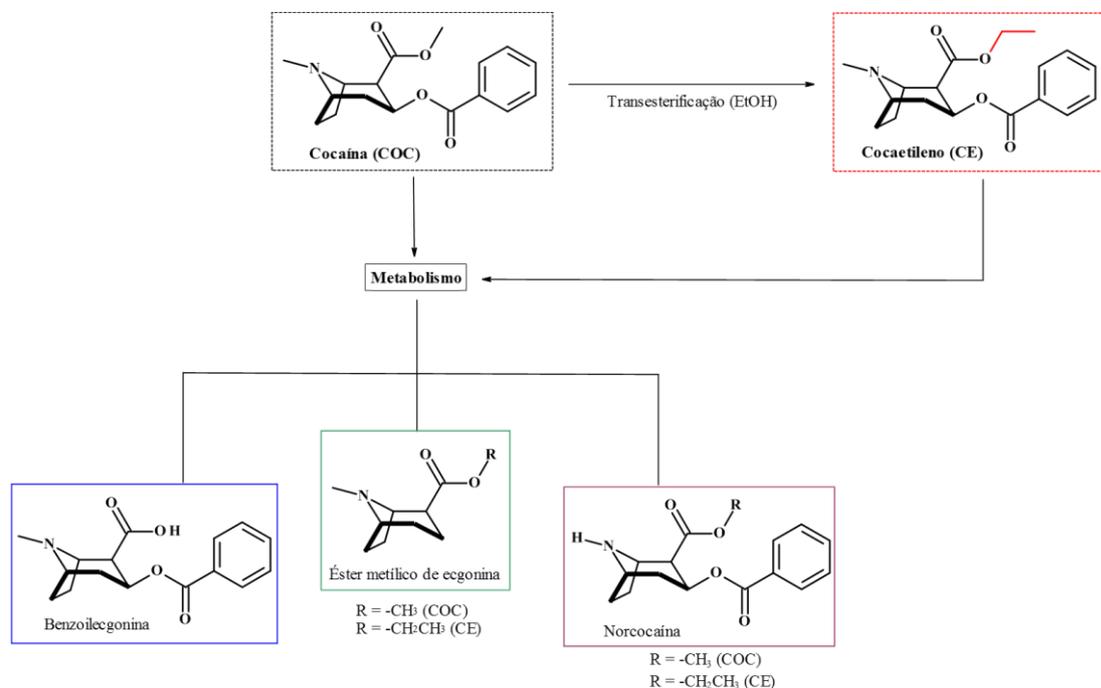
A maioria dos usuários de cocaína também ingere etanol na forma de bebidas alcóolicas. Esta combinação resulta em uma diminuição da depuração da cocaína e na formação do metabólito farmacologicamente ativo, o cocaetileno (CE), resultante da reação de transesterificação (carboxilesterase) no fígado, entre cocaína e etanol em oposição à reação normal com água (hidrólise) que produz os metabólitos inativos (benzoilecgonina, éster metílico de ecgonina e norcocaína), como mostrado na Figura 8 (DAVID & BAILEY, 2016)

O usuário de drogas utiliza essas associações para prolongar o quadro eufórico, uma vez que o CE tem alta taxa de distribuição no cérebro/sangue, seguido por cocaína, norcocaína e benzoilecgonina. Sua meia-vida plasmática é 3 a 5 vezes maior que a da cocaína, que é em média de 50 min. Além disso, o cocaetileno diminui o quadro psicomotor causado pelo álcool (GINSBUREG, et al., 2005).

Estruturalmente, cocaína e cocaetileno diferem somente na substituição do grupo etil no lugar do metil éster (HOU et al., 2014). Porém Barreiro e colaboradores (2011) já reportaram que o grupo metil pode alterar profundamente as propriedades farmacológicas de uma molécula, uma vez que o mesmo promove mudanças estereo-eletrônicas e isso, por exemplo, explica a diferença entre o DNA e o RNA, os quais são bases de pirimidina, que diferem um do outro pela presença de um grupo metil na posição 5 do anel da piridina, por exemplo. Outro exemplo seriam os diferentes perfis de atividades da cafeína,

teobromina e teofilina, que são alcaloides hidrossolúveis que dependem do padrão de metilação (BARREIRO, KÜMMERLE, FRAGA, 2011).

Figura 8- Metabólitos da cocaína formados durante o metabolismo da droga, reações de hidrólise e transesterificação *in vivo*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Uma vez que a afinidade de ligação entre composto bioativo e proteína afeta a sua distribuição, metabolismo e eficácia, estudos sobre a ligação entre proteína e compostos com atividade biológica são importantes. Dentro dessa vertente, a avaliação da afinidade e a caracterização da interação entre COC-HSA e CE-HSA, pode explicar os efeitos diferenciados desses compostos bioativos quanto a farmacocinética e efeito da droga.

Estudos dessa natureza já foram realizados por Alsamamra e colaboradores (2018) para procaína, um anestésico local, com albumina do soro humano, com o objetivo de esclarecer a estrutura, função e propriedades do complexo drogas - HSA. Outro trabalho realizado por Fanali e colaboradores (2011), avaliou a ligação entre 9-tetra-hidrocanabinol (THC) e HSA, e a influência do diazepam nesse processo, considerando que os usuários de maconha tendem a usar outros medicamentos psicoativos com mais frequência do que os não usuários. Porém apesar da importância, na literatura, os estudos nessa temática com drogas ilícitas, ainda são muito escassos (KHAN, MUZAMMIL, MUSARRT, 2002).

1.5 Técnicas para avaliação do processo de interação proteína-ligante

Para avaliar a interação proteína-ligante, *in vitro*, diversas estratégias empregando técnicas instrumentais ou não, podem ser utilizadas, tais como: equilíbrio de diálise, fluorescência molecular, UV-visível, infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), eletroforese (em gel de poliacrilamida e capilar), espectrometria de massas, dicroísmo circular, cromatografia de afinidade, ressonância magnética nuclear (RMN), ressonância de plasma de superfície, modelagem molecular, entre outras (DONG, MA, LIU, 2013).

Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas espectroscópicas de absorção no UV-visível e fluorescência molecular para avaliação do processo de interação entre a HSA com a cocaína e o cocaetileno, seu metabólito, e a urease e três metabólitos secundários de líquens (isômeros do ácido úsnico e ácido fumarprotocetrárico). Por meio destas técnicas foi possível calcular os valores das constantes de ligação, número de sítios de ligação, dados termodinâmicos, distâncias intermoleculares, sítios preferenciais de ligação, entre outros parâmetros. Desta forma, as técnicas empregadas nos estudos de interação macromolécula-ligante são brevemente descritas a seguir, considerando os principais aspectos quanto às informações que podem ser obtidas decorrentes da interação entre proteína e ligante de interesse *in vitro*.

1.5.1 Espectroscopia de absorção no UV-visível

A espectrofotometria visível e ultravioleta é uma das técnicas analíticas mais usadas para quantificações de diferentes espécies em diversas áreas. Esta técnica permite a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos, sendo amplamente aplicada no controle de qualidade quanto ao princípio ativo de fármacos (DONG, MA, LIU, 2013; RANJBAR et al., 2013).

Esta técnica é baseada na incidência de radiação contínua (feixe de luz) sobre uma amostra resultando em absorção de parte da radiação. O processo de absorção é medido pela absorvância (A) definida matematicamente como $\log(P_0/P)$, enquanto que a luz que não foi absorvida é transmitida através da amostra. Este processo é denominado de transmitância (T), sendo mensurado por meio da razão de P/P_0 (SKOOG, et al, 2014).

A energia absorvida na forma de radiação luminosa corresponde à energia necessária para promover o elétron da camada de valência do estado de menor energia

(estado fundamental) para um estado de maior energia (estado excitado). Portanto, nem todos os comprimentos de onda da luz são absorvidos igualmente por uma amostra. Vale ressaltar que a radiação eletromagnética absorvida é quantizada, ou seja, tem um valor igual à diferença de energia entre o estado excitado e fundamental (HARRIS, 2017).

A região do espectro que ocorre a absorção (seja na região visível ou ultravioleta) depende, em primeiro lugar, do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. A região ultravioleta do espectro é geralmente considerada na faixa de 200 a 380 nm, enquanto que a região do visível entre 380 a 800 nm.

De um ponto de vista prático, o aspecto mais importante do cálculo quântico é a determinação da quantidade de luz que é absorvida pela amostra. Isto é descrito pela lei de *Beer-Lambert*, que estabelece a relação entre a intensidade da luz máxima que incide na solução (P_0), e a intensidade de luz final, após passar pela solução (P). Essa relação também permite determinar a concentração de uma espécie absorvente simplesmente medindo sua absorvância (SKOOG, CROUCH, HOLLER, 2009).

$$\log (P_0/P) = A = \epsilon \times c \times l \quad \text{Equação (2)}$$

A = absorvância

ϵ = coeficiente de absorvidade molecular ou coeficiente de extinção

c = concentração molar do material absorvedor

l = largura da camada de amostra através da qual a luz passa.

A espectroscopia de absorção no UV-visível permite monitorar a formação do complexo proteína-ligante, bem como avaliar possíveis mudanças na estrutura da macromolécula após a interação com o ligante (RAUF et al., 2016). Neste sistema, é possível monitorar o ligante ou a proteína, se não ocorrer sobreposição espectral, contudo, é preferível avaliar a proteína, uma vez que as mudanças na estrutura nativa da mesma podem ser avaliadas por meio de variações na intensidade e no perfil espectral (RANJBAR et al., 2013). Isto é possível porque as proteínas possuem duas bandas de absorção eletrônicas particulares que podem sofrer mudanças a depender do estado de oxidação, ligação e conformação dos seus cromóforos¹, bem como devido a alterações nas suas cadeias polipeptídicas (RAUF et al., 2016; TIAN et al., 2015). A banda de absorção referente as ligações polipeptídicas entre os aminoácidos ocorrem na faixa de

¹ Um cromóforo ou grupo cromóforo é a parte ou conjunto de átomos de uma molécula responsável por sua cor ou região de absorção. Também se pode definir como uma substância que tem muitos elétrons capazes de absorver energia ou luz visível (YU et al., 2014)

210 a 220 nm), a outra banda referente as transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ de aminoácidos aromáticos Trp (280 nm), Tir (278 nm) e Phe (257 nm) apresentam absorção entre 240-300 nm (YU et al., 2014; KHAN et al., 2012; CHI et al., 2010).

Assim, a formação do complexo proteína-ligante pode ser confirmada por meio do monitoramento das alterações das propriedades de absorção da proteína livre e ligada. Para confirmar a formação do complexo proteína-ligante na região do UV, deve-se avaliar se não houve efeito aditivo da lei de Beer, uma vez que no complexo supramolecular formado, o ligante dificulta a rotação ao redor das ligações peptídicas e pode alterar a estrutura da proteína, levando a alterações espectroscópicas em ~ 210 e ~ 280 nm (KHAN et al., 2002; CHI, et al., 2010).

Outro tipo de alteração das propriedades de absorção da proteína é o deslocamento da banda de absorção que traz informações acerca da polaridade do microambiente dos resíduos dos aminoácidos Trp e Tir. Um deslocamento para maiores comprimentos de onda (efeito batocrômico) indica que o microambiente destes aminoácidos se tornou mais polar e para menores comprimentos de onda (efeito hipsocrômico) o ambiente tornou-se menos polar (CHI et al., 2010).

Essa técnica apresenta vantagens como baixo custo e simplicidade, além permitir a avaliação qualitativa da formação de complexo e de mudanças na conformação da proteína. Porém, a espectrofotometria visível e ultravioleta apresenta algumas limitações como a baixa seletividade e sensibilidade (WANG & NI, 2014) Dessa forma, é necessário utilizar outras técnicas como suporte, que possibilite realizar estudos eficientes, confiáveis, com alta sensibilidade, além de permitir avaliar tanto qualitativamente como quantitativamente outros parâmetros importantes das interações proteína-ligante, como: constante de ligação, número de sítios de ligação, forças intermoleculares, distâncias intermoleculares e monitoramento em 3D (YAN & MARRIOT, 2003). Dentro desse contexto, a espectroscopia de fluorescência molecular é uma técnica que permite obter tais informações (WANG & NI, 2014).

1.5.2 Espectroscopia de fluorescência molecular

A espectroscopia de emissão molecular ou espectrofluorimetria consiste na técnica que utilizada quali- e quantitativamente substâncias capazes de fluorescer (TIAN et al., 2015). A fluorescência é resultado da absorção de energia radiante e da posterior emissão de parte dessa energia, ocorrendo no intervalo de tempo, entre a captação do fóton e a

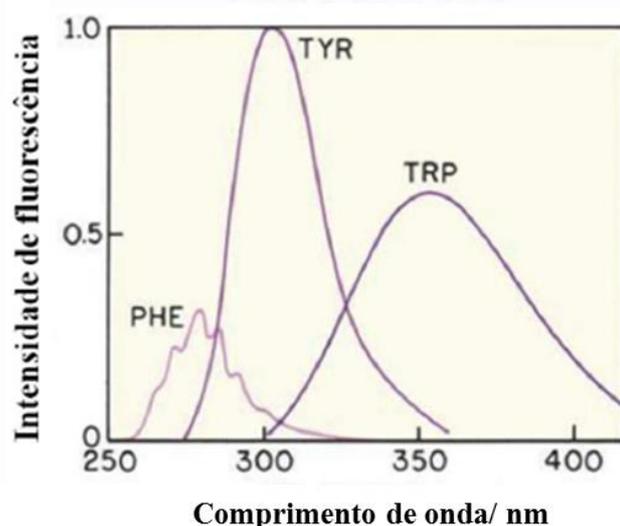
emissão da energia captada, extremamente curto (de 10^{-12} a 10^{-5} s) (SIDDIQUI, ALOTHMAN, RAHMAN, 2017). Nesse processo, a energia é emitida rapidamente devido a molécula encontrar-se no estado excitado singlete, no qual os orbitais eletrônicos estão emparelhados, e os *spins* dos elétrons em direções opostas. Com a liberação de parte da energia absorvida, a molécula sofre uma transição do estado excitado singlete para o estado fundamental, ocorrendo a emissão de fluorescência (SANTOS & GIL, 2010).

Essa técnica tem como vantagens a alta sensibilidade, fácil operação e a maior seletividade, uma vez que nem todas as substâncias que absorvem radiação eletromagnética são capazes de emitir fluorescência (GHASEMI, 2016). Devido as suas vantagens, a espectrofluorimetria tem sido muito usada em estudos de interação entre moléculas pequenas como medicamentos, inibidores enzimáticos, espécies tóxicas, corantes, pesticidas entre outros, e macromoléculas como as proteínas (TIAN et al., 2015; MADRAKIAN et al., 2014). Dessa forma é possível avaliar vários aspectos do processo de interação proteína-ligante, monitorando o sinal (intensidade) de fluorescência, o qual deve ser alterado (aumentar ou diminuir) considerando a presença e ausência do ligante no meio proteico (SANTOS & GIL, 2010). O sinal monitorado pode ser o da fluorescência intrínseca da proteína ou do ligante (quando o mesmo for capaz de emitir fluorescência), porém se o ligante e proteína emitirem no mesmo comprimento de onda, emprega-se uma sonda que interaja com a proteína, fazendo com que a proteína emita em um comprimento de onda diferente da proteína isolada. Vale ressaltar que é sempre preferível monitorar o sinal direto da proteína, uma vez que a partir do mesmo é possível avaliar alterações na macromolécula em função da presença do ligante (MUNISHKINA & FINK, 2007)

A fluorescência intrínseca das proteínas se deve ao fato da presença de aminoácidos aromáticos em sua cadeia polipeptídica: triptofano (Trp), tirosina (Tir) e fenilalanina (Phe), sendo o triptofano o principal responsável pela fluorescência, por causa do seu maior rendimento quântico ($\Phi = 0,20$), em pH fisiológico, quando comparado com Tir ($\Phi = 0,14$) e Phe ($\Phi = 0,04$) e também, pelo fato da fluorescência da tirosina ser parcialmente desativada quando está ionizada e próxima de um grupo amino, carboxílico, ligação dissulfeto ou resíduo de triptofano (GHISAIDOOBE & CHUNGS, 2014; TIAN, et al., 2015). Cada resíduo de aminoácido aromático emite fluorescência em um determinado comprimento de onda, sendo possível observar na Figura 9. A tirosina livre mesmo possuindo o rendimento quântico menor que o Trp na mesma concentração, possui maior intensidade e espectro mais estreito comparado com o triptofano. Este fato

está associado a sensibilidade do Trp a solventes polares (como a água), uma vez na estrutura da proteína, fica mais protegido, e apresenta maior intensidade de fluorescência (TIAN et al, 2015)

Figura 9- Espectro de emissão de aminoácidos aromáticos livre tirosina, triptofano e fenilalanina.



Fonte: Adaptado de Lakowicz, 2006.

Para as proteínas as medidas da intensidade do sinal de fluorescência podem fornecer informações sobre a interação com moléculas pequenas, como: o mecanismo de ligação se ocorre por *quenching* (dinâmico, estático ou ambos), número de sítios de ligação (estequiometria), constantes de ligação (K_b), parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG), tipo de forças intermoleculares envolvidas no processo de interação proteína-ligante, distâncias intermoleculares, entre outros parâmetros (KANDAGAL et al., 2006; WANI, et al, 2017).

Neste estudo, utilizaram-se as seguintes estratégias empregando espectrofluorimetria: medidas de fluorescência no estado estacionário, estudo do mecanismo de *quenching*, fluorescência tridimensional (fluorescência 3D), fluorescência sincronizada (*synchronous fluorescence*), estudos de competição, transferência de energia ressonante (FRET, *Förster Resonance Energy Transfer*) e ensaio de hidrofobicidade, as quais são descritas nos próximos tópicos.

Todas as estratégias empregadas se baseiam no processo de supressão de fluorescência (*quenching*), o qual tem sido amplamente estudado tanto como fenômeno fundamental, quanto como fonte de informação sobre sistemas bioquímicos.

1.5.2.1 Supressão de fluorescência – *quenching*

O processo de *quenching* é definido como a redução da intensidade de fluorescência que ocorre devido à: rearranjos moleculares, transferência de energia ou elétrons, formação de complexo no estado fundamental e extinção por colisões. A molécula ou espécie que entra em contato com o fluoróforo (F) (espécie capaz de emitir fluorescência) no estado excitado e o desativa, inibindo sua fluorescência, é denominada *quencher* (Q) (WANG et al., 2015; SURYAWANSHI et al., 2016)

A partir da avaliação do processo de *quenching* de fluorescência é possível compreender o mecanismo de interação que ocorre entre o fluoróforo, que no caso das proteínas, seriam os resíduos dos aminoácidos aromáticos Trp, Tir e Phe e o *quencher* (ligante). Os mecanismos de *quenching* são classificados como *quenching* dinâmico (colisional) ou estático, podendo, em alguns casos, ocorrer os dois mecanismos simultaneamente. O *quenching* dinâmico ocorre quando o fluoróforo no estado-excitado (F*) é desativado ao entrar em contato com outra molécula (Q). O contato entre ambos é momentâneo, ocorrendo apenas durante a existência do estado excitado (tempo da ordem de ns). O *quenching* estático refere-se à formação de um complexo não-fluorescente (F–Q). Este mecanismo ocorre no estado fundamental e não depende de processos de difusão ou colisões moleculares (MOLINA-BOLÍVAR et al, 2014; WANI et al., 2017). A redução da intensidade de fluorescência é descrita matematicamente

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] \text{ ou } \frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] \quad \text{Equação (3)}$$

em que, F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do ligante, respectivamente; K_q é a constante de velocidade de *quenching* bimolecular difusional ($2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), τ_0 é o tempo de vida médio (10^{-8} s), $[Q]$ é a concentração do ligante que atua como *quencher* e K_{SV} é a constante de *quenching* Stern-Volmer. A equação de Stern-Volmer indica a sensibilidade do fluoróforo frente a sua interação com o ligante quanto a capacidade deste em suprimir o processo de emissão de radiação (ALANAZI & ABDELHAMEED, 2016; SURYAWANSHI et al., 2016).

Para avaliar qual o mecanismo preferencial de *quenching*, deve-se realizar o experimento em diferentes temperaturas, e a seguir, calcular os valores da constante (K_{SV}). Quando o valor de K_{SV} aumenta em função da elevação da temperatura se associa ao processo de *quenching* dinâmico, uma vez que temperaturas mais elevadas levam a um maior coeficiente de difusão, e por consequência aumenta-se o número de choques

entre o fluoróforo e o *quencher*. Quando os valores da constante diminuem com o aumento da temperatura é indicativo de *quenching* estático, visto que temperaturas elevadas afetam a estabilidade do complexo fluoróforo-*quencher* no estado fundamental (WANI et al., 2017; SURYAWANSHI et al., 2016). Porém, é preferível avaliar o mecanismo preferencial calculando-se o valor de K_q em diferentes temperaturas, uma vez que o mecanismo preferencial de *quenching* é inferido comparando o valor de K_q calculado com um valor de referência, de forma que quando o valor da constante for maior que o referencial $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ é indicativo de *quenching* estático, e se for menor é indicativo de *quenching* dinâmico.

1.5.2.2 Constantes de ligação (K_b) e parâmetros termodinâmicos

A partir da variação do sinal de fluorescência na presença do ligante é possível calcular o valor da constante de ligação (K_b) e determinar a estequiometria do complexo macromolecular formado entre proteína e ligante (n). Esses parâmetros podem ser calculados a partir da seguinte equação (SANTOS & GIL, 2010):

$$\log \left[\frac{(F_0 - F)}{F} \right] = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{Equação (4)}$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência do doador na ausência e na presença do ligante, n é proporção estequiométrica do complexo macromolecular formado entre proteína e ligante, K_b é a constante de ligação e $[Q]$ é a concentração do ligante, que neste caso atua como *quencher*.

A espectroscopia de fluorescência também é utilizada para determinar parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação proteína-ligante, podendo inferir, a partir desses parâmetros, as ligações intermoleculares predominantes nesse processo de interação, sendo as ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas as principais interações.

Os parâmetros termodinâmicos são determinados a partir do estudo que avalia a formação do complexo proteína-ligante, em diferentes temperaturas, de forma que os valores de ΔH e ΔS são calculados pela linearização de ($\ln K_b$ vs T^{-1}), da equação de Van't Hoff (ALANAZI & ABDELHAMEED, 2016; BARAKAT & PATRA, 2013):

$$\ln K_b = - \frac{\Delta H}{R} \cdot \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação (5)}$$

onde R é a constante dos gases, T é a temperatura experimental (em K) e K_b é a constante de ligação a uma dada temperatura. De acordo com os resultados para ΔH e ΔS referente ao processo de interação, pode-se relacionar quais as forças intermoleculares estabilizam o sistema formado, assim quando: i) $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ preferencialmente forças hidrofóbicas estão associadas ao processo de interação; enquanto que para ii) $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ são forças de van der Waals e ligações de hidrogênio, e iii) $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ preferencialmente são interações eletrostáticas (ALANAZI & ABDELHAMEED, 2016; WANI et al., 2017). A partir dos valores de ΔH e ΔS obtidos, é possível obter o valor de ΔG por meio da equação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (6)}$$

O ΔG , por sua vez irá inferir sobre a espontaneidade do processo de interação: quando $\Delta G > 0$ indica que o processo de interação não é espontâneo e quando $\Delta G < 0$ indica espontaneidade (BARAKAT & PATRA, 2013; WANI et al., 2017).

1.5.2.3 Fluorescência tridimensional (3D)

A fluorescência tridimensional é uma técnica de análise de fluorescência amplamente empregada em estudos de interação, uma vez que pode fornecer informações mais detalhadas sobre a alteração da configuração de proteína resultante do processo de interação (TAN et al., 2012). Este estudo é importante, pois, uma vez que a função de muitas proteínas está diretamente relacionada com sua estrutura (SHARMA, ANANDAKUMAR, ILANCHELIAN, 2014; XU et al., 2012).

O espectro de fluorescência 3D é composto por três picos emissão: o primeiro refere-se ao espalhamento da radiação, chamado de efeito *Rayleigh*, no qual se tem a igualdade entre o comprimento de onda de excitação e o de emissão ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$); o segundo pico é referente aos resíduos de triptofano e tirosina ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$), enquanto que o terceiro pico refere-se às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ da carbonila presente na ligação peptídica, permitindo avaliar possíveis alterações na conformação nativa da proteína (GUO et al., 2014; ZHANG et al., 2008).

1.5.2.4 Fluorescência sincronizada

A fluorescência sincronizada é uma técnica que permite analisar mudanças no microambiente dos fluoróforos Trp e Tir decorrentes do processo de interação, as quais

são relacionadas com variação da polaridade da proteína (CHAKRABORTY & LEDWANI, 2016). Na fluorescência convencional o espectro de emissão é obtido pela varredura em uma determinada faixa de comprimentos de onda (λ_{em}) quando uma amostra é irradiada em um comprimento de onda de excitação fixo (λ_{ex}) (KABOUDIN et al., 2013). Contudo, na fluorescência sincronizada obtém-se o espectro de emissão mantendo-se constante o intervalo entre o comprimento de onda de emissão e excitação ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$) e a partir desta diferença é possível obter informações acerca dos resíduos de Trp e Tir separadamente (SOTOMAYOR, 2008; ALANAZI & ABDELHAMEED, 2016).

Quando $\Delta\lambda$ é igual a 60 nm, monitora-se o microambiente dos resíduos de Trp, enquanto que para $\Delta\lambda = 15$ nm, se avalia o microambiente dos resíduos de Tir (BARAKAT & PATRA, 2013). Por meio do monitoramento do deslocamento do comprimento de onda de máxima emissão do espectro de fluorescência da proteína livre e ligada é possível analisar a ocorrência de mudanças em cada microambiente de forma independente. Quando há um deslocamento para maiores comprimentos de onda, é um indicativo que o microambiente da região do fluoróforo (ou seja, dos resíduos de aminoácido Tir ou Trp) tornou-se mais polar ao interagir com o ligante. Contudo, quando o deslocamento é para menores comprimentos de onda indica que o microambiente da região do fluoróforo tornou-se mais apolar ao interagir com o ligante (TAN et al., 2012; SUN et al., 2012).

Além do deslocamento do máximo de emissão, a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) é o principal parâmetro usado para avaliar os resultados deste estudo. A partir de uma titulação, mantendo-se fixa a concentração da proteína e variando o ligante, o resíduo que apresentar maior valor de K_{sv} é aquele mais afetado pelo processo de interação, sendo possível inferir se ocorreram alterações na estrutura original da proteína após a interação com o ligante, usando os resíduos de aminoácidos aromáticos Tir e Trp como fluoróforos marcadores (SUN et al., 2012).

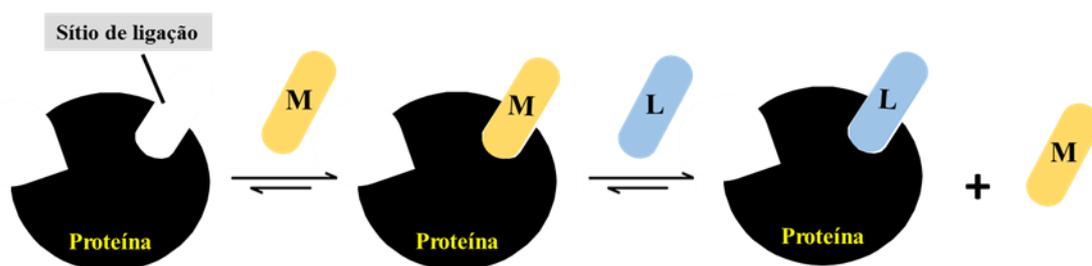
1.5.2.5 Avaliação do sítio preferencial de ligação

Estudo de competição tem a finalidade de identificar o local de ligação preferencial de moléculas pequenas na proteína e verificar a influência de possíveis competidores no sítio de ligação, como mostrado na Figura 10 (CHAVES, 2015). Para realizar o estudo de identificação do sítio preferencial de ligação são usados marcadores, ou seja, moléculas que se ligam seletivamente a um local ou região conhecida da proteína (NI, SU, KOKOT,

2006). As moléculas que são frequentemente utilizadas como marcadores são: varfarina para o sítio I e ibuprofeno ou diazepam para o sítio II. Contudo, Sudlow e colaboradores (1976) afirmam que o ibuprofeno além de se ligar ao subdomínio IIIA (sítio II), pode migrar para uma região intermediária localizada entre os sítios IIA e IIB. Assim, é preferível o emprego do diazepam como marcador do sítio II, pelo fato de ser mais seletivo e assim, fornecer um resultado mais representativo (ZSILA, 2013).

Para avaliar qual sítio de ligação preferencial do ligante se compara os valores da constante de ligação (K_b) proteína-ligante na ausência e presença do marcador seletivo a uma determinada região da proteína. Aquele marcador que levar à menores valores da constante de ligação é o que está influenciando mais efetivamente no sítio de ligação (ZHANG et al., 2013).

Figura 10- Esquema dos estudos de competição para determinação do sítio de ligação, onde M é o marcador de sítio e L é o ligante.



Fonte: Adaptado de Silva, 2017.

1.5.2.6 Influência de espécies biológicas no processo de interação

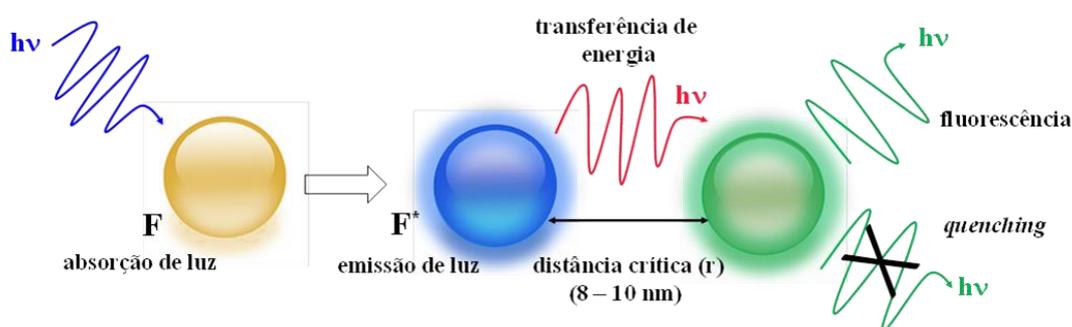
Os íons metálicos, ânions, ácidos graxos, vitaminas, açúcares, entre outras espécies desempenham papel importante como nutrientes, cofatores enzimáticos e participando de outras funções nos sistemas biológicos (ROY et al., 2013). A presença destas diferentes espécies pode afetar a interação entre o ligante e a proteína, uma vez que eles também são transportados pela HSA. O parâmetro utilizado para avaliar se a interação entre o ligante e a proteína foi afetada na presença de íons metálicos é a constante de ligação K_b (XIAO et al., 2007). Este estudo é realizado por fluorescência molecular, onde avalia-se a constante de ligação (K_b) entre a proteína e o ligante na ausência e na presença de possíveis espécies competidoras comuns ao sistema biológico de interesse (BARAKAT & PATRA, 2013). Quando o valor de K_b aumenta em relação ao sistema controle é indicativo que a presença da espécie favorece o processo de interação, contudo, quando

o valor da constante de ligação reduz, ocorre um desfavorecimento, devido possivelmente a competição entre ligante a espécie biológica avaliada.

1.5.2.7 Transferência de energia por ressonância de Förster (FRET)

O processo de FRET é um fenômeno mecânico quântico que ocorre com a transferência de energia de um doador (fluoróforo) no estado excitado a um receptor (ligante), e este após absorver energia pode emití-la (fluorescência) em um comprimento de onda maior que do sistema doador ou atuar como *quencher* (ALANAZI & ABDELHAMEED, 2016). Este processo está representado no esquema da Figura 11. De acordo com a teoria de Förster acerca da transferência de energia não radiativa (FRET), este processo entre o doador e receptor depende dos seguintes fatores: (i) orientação relativa dos dipolos dos doadores e receptores, (ii) grau de sobreposição do espectro de emissão do doador com o espectro de absorção do receptor, e (iii) da distância entre o doador e o receptor (r_0) (BARAKAT & PATRA, 2013).

Figura 11- Esquema geral de um sistema com transferência de energia por ressonância de Förster com e sem (re)emissão de luz.



Fonte: Adaptado de JAMESON, 2014.

A distância entre o doador e o receptor deve ser menor que 8-10 nm para que ocorra transferência de energia diferente de zero. Por meio deste método pode-se avaliar a interação proteína–ligante e calcular a distância entre o ligante e o(s) resíduo(s) de Trp da proteína (NAVEENRAJ et al., 2013; NASERI et al., 2015). A distância (r_0) entre o doador e o receptor pode ser calculada através da equação:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6} \quad \text{Equação (7)}$$

em que, E é a fração de energia transferida do doador para o receptor, r_0 é a distância entre o ligante e o doador, e R_0 é a distância crítica de Förster, quando 50% da energia de emissão do doador é transferida para o receptor (TAN et al., 2012). A equação da distância crítica (R_0) pode ser descrita como:

$$R_0^6 = \frac{8.8 \times 10^{-12} k^2 \Phi J}{N^4} \quad \text{Equação (8)}$$

em que, K^2 é fator de orientação que está diretamente relacionado com a geometria do dipolo entre o doador e o receptor, sendo igual a $2/3$, para orientação aleatória em solução, N é o índice de refração médio do meio no comprimento de onda onde a sobreposição dos espectros é significativa, Φ é o rendimento quântico do doador, J , é a área de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência normalizado do doador e em relação ao espectro de absorção do receptor (MEHRANFAR et al., 2013). A área de sobreposição (J) pode ser calculada pela equação:

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda}{\sum F(\lambda) \Delta \lambda} \quad \text{Equação (9)}$$

Nesta equação, $F(\lambda)$ é a área integrada da fluorescência do doador, e $\varepsilon(\lambda)$ é área integrada em função do coeficiente de absorção molar do receptor, o qual pode ser obtido empregando a lei de Beer (MEHRANFAR et al., 2013).

1.5.2.8 Índice de hidrofobicidade

Hidrofobicidade é definido como a tendência dos solutos não polares se aglomerarem em ambientes aquosos. No caso das proteínas, esse termo se aplica à porção da superfície não polar que faz contato com a água circundante, sendo as interações hidrofóbicas de suma importância para a determinação da conformação de uma proteína (CARDAMONE & PURIT, 1992)

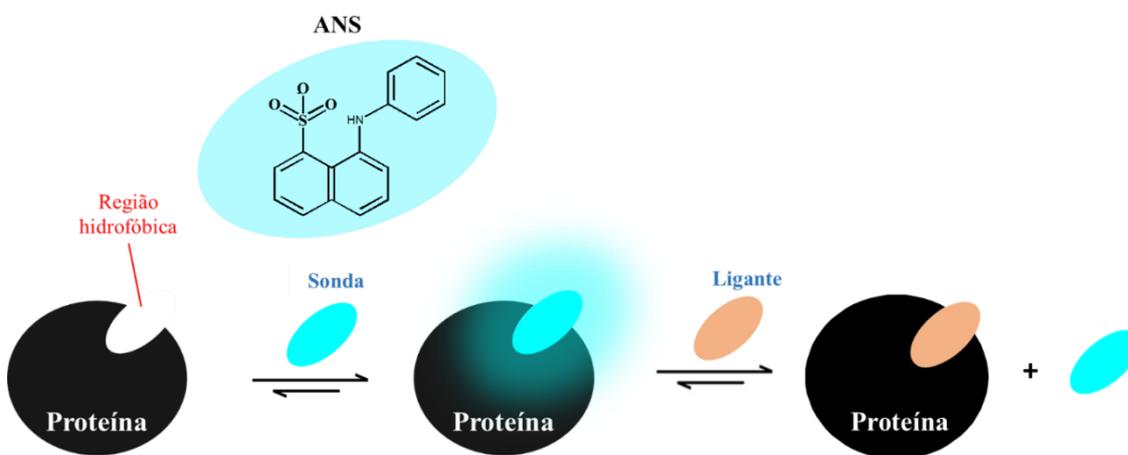
Geralmente, se determina o índice de hidrofobicidade ao se medir a quantidade de uma sonda fluorescente hidrofóbica, que pode se ligar a proteína, permitindo verificar possíveis mudanças na conformação da proteína (MÖLLER; DENICOLA, 2001; BARAKAT & PATRA, 2013).

A sonda fluorogênica mais usual para avaliação da hidrofobicidade de proteína é o 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS), a qual é extremamente sensível à polaridade do ambiente, de forma que quando ligada a regiões apolares da proteína, tem seu rendimento quântico aumentado substancialmente, como mostrado na Figura 12 (RANJBAR et al.,

2013). Os parâmetros da interação HSA-ANS podem ser investigados por parâmetros como a constante de dissociação aparente (K_d) e a fluorescência máxima ($F_{m\acute{a}x}$) do complexo HSA-ANS, na ausência e na presença de um ligante. Neste contexto, $1/K_d$ representa a afinidade de ligação do ANS para a proteína na ausência e na presença de um ligante (Figura 12). Por fim, $F_{m\acute{a}x}$ é a intensidade de fluorescência na máxima concentração de ANS, o que indica a saturação dos sítios hidrofóbicos na superfície da proteína. O índice de hidrofobicidade superficial de proteínas (PSH) na ausência e na presença de um ligante pode ser calculado pela aplicação da seguinte equação:

$$PSH = \frac{F_{m\acute{a}x}}{[HSA] \cdot K_d} \quad \text{Equação (10)}$$

Figura 12- Esquema da sonda ANS na presença da proteína e do ligante.



Fonte: elaborada pela autora, 2019.

1.5.3. Dicroísmo circular

Uma vez que as proteínas possuem diversos centros quirais, elas podem interagir com a luz polarizada. Assim, a técnica de dicroísmo circular (DC) utiliza esse princípio para determinar a estrutura secundária de proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos, uma vez que essa técnica consiste na absorção por uma molécula de uma luz circularmente polarizada (MURAKAMI & RULLER, 2016; KELLY et al., 2005). A luz circularmente polarizada é composta por um componente que gira em sentido anti-horário (L) e outra que gira no sentido horário (R), as duas de mesma magnitude. Quando essa luz passa pela amostra e as componentes R e L são absorvidas na mesma proporção, não é gerado nenhum sinal. Porém, quando existe uma diferença de absorção das duas componentes R e L, o sinal de DC é diferente de zero (KELLY et al., 2005)

Diferentes sinais podem ser obtidos pelo espectro de DC para uma proteína devido às diferentes estruturas existentes nessa macromolécula quiral, na qual há diferentes tipos de estrutura secundária. A estrutura em α -hélice, apresenta duas bandas negativas em 208 e 222 nm (transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente) e uma banda positiva em 198 nm. Uma estrutura em β antiparalela apresenta um pico positivo em 195 nm e um negativo em 217 nm (SHARON; PRICE; PRICE, 2000) Além de ser uma das técnicas mais aplicadas para determinar a estrutura secundária das proteínas, o DC também é usado em estudos conformacionais/estruturais de proteína em diferentes condições de temperatura, força iônica e presença de ligantes (CHAVES et al., 2016).

Alterações na estrutura secundária da proteína quando a mesma interage com um ligante é monitorada, avaliando-se principalmente o conteúdo de α -hélice presente. O conteúdo de α -hélice na ausência e na presença do ligante pode ser calculado em termos da elipticidade molar média (EMR), de acordo com a equação 11 (MURAKAMI & RULLER, 2016)

$$EMR = \frac{DC(\text{med})_{\text{observado}}}{(C_p \times n \times L \times 10)} \text{ (deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}) \quad \text{Equação (11)}$$

C_p é a concentração molar da proteína, n é o número de resíduos de aminoácidos (585 para HSA) e L é comprimento do percurso (no caso foi 0,1 cm). Assim, a quantidade de α -hélice da HSA pôde ser calculada utilizando as equações 12 e 13:

$$\alpha\text{-hélice (\%)} = \frac{-EMR_{208} - 4000}{33000 - 4000} \times 100 \quad \text{Equação (12)}$$

$$\alpha\text{-hélice (\%)} = \frac{-EMR_{222} - 2340}{33000 - 4000} \times 100 \quad \text{Equação (13)}$$

EMR_{208} e EMR_{222} representam o valor de EMR a 208 e 222 nm, respectivamente. O valor de 4000 corresponde a EMR da forma beta na conformação randômica a 208 nm, enquanto que 33000 é o valor de EMR da α -hélice pura a 208 e 222 nm (SHARON; PRICE; PRICE, 2000). Além disto, uma série de programas estão disponíveis para calcular as a composição da estrutura secundárias das proteínas.

1.5.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As técnicas de espectroscopia de absorção molecular e de fluorescência molecular avaliam o processo de interação proteína-ligante monitorando as modificações da proteína a partir da formação do complexo proteína-ligante.

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), por sua vez, avalia o processo de interação tanto a partir do monitoramento do ligante, comparando os espectros do ligante nos estados livre e ligado a macromolécula, como também permite a determinação das propriedades estruturais e dinâmicas de macromoléculas biológicas como proteínas, DNA e RNA, lipídios, entre outras (CABRITA, et al., 2011).

Uma das informações obtidas é o mapeamento do epítipo da macromolécula ou ligante. Epítipo é a superfície de contato da macromolécula ou do ligante envolvido no processo de interação, este parâmetro é obtido a partir dos hidrogênios localizados na interface do processo de interação (CALA; GUILLIERE; KRIMM, 2014).

Diversos parâmetros físicos da RMN podem ser utilizados para determinar a interação entre o ligante e a proteína tais como: as alterações do deslocamento químico (δ), as diferenças dos tempos de relaxação (T_1), as variações das constantes de difusão (D), as mudanças do efeito Overhauser nuclear (NOE), e a diferença de transferência de saturação (STD), entre outras (GOLDFLAM, et al., 2011). O deslocamento químico é o mais utilizado, o qual é expresso em ppm e corresponde à medida da diferença entre a frequência de ressonância entre a amostra (ν) e um padrão interno (ν_0).

O deslocamento químico (δ) é um parâmetro físico da RMN empregado para avaliação das alterações estruturais ocorridas na proteína quando um ligante é adicionado ou para monitorar as variações dos sinais do ligante na presença da proteína (GONSALVES; MELO, 2007). Por meio deste parâmetro pode-se determinar a localização do sítio de ligação, a afinidade do ligante e a possível estrutura do complexo. Este estudo pode ser efetuado pela medida dos deslocamentos químicos em cada ponto de uma titulação, e da medida da variação da posição dos picos. Vale ressaltar que é preferível monitorar o deslocamento químico referente ao ligante em relação a macromolécula, pois o ligante fornece espectros de RMN mais simplificados e resolvidos (ROUESSAC; ROUESSAC, 2007; GOLDFLAM, et al., 2011).

Assim, o mapeamento do epítipo é determinado a partir de uma análise comparativa entre os deslocamentos químicos do ligante livre e ligado após a interação com a proteína.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO TRABALHO

Uma vez que avaliação da afinidade envolvida no processo de interação entre compostos bioativos e proteínas é um modelo que consegue mimetizar os sistemas biológicos de interesse, fornecendo informações relevantes, é possível, por meio dos estudos biofísicos, compreender os processos que ocorrem *in vivo*. Portanto, considerando as potencialidades este trabalho se estabeleceu em duas hipóteses:

- (i) os metabólitos secundários de líquen, como os isômeros do ácido úsnico e o ácido fumarprotocetrárico são inibidores eficientes de urease e ativos contra *H. pylori* em estudos *in vitro*;
- (ii) a interação da cocaína e cocaetileno com albumina do soro humano simulando condições fisiológicas, explica a diferença da farmacocinética destes dois compostos *in vitro*.

3 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Geral

Avaliar por meio de estudos biofísicos *in vitro* a afinidade e parâmetros da interação entre alcaloides (COC e CE) e metabólitos secundários de líquens (isômeros do AU e FUM), com modelos de proteínas transportadora (HSA) e a enzima urease, respectivamente, empregando técnicas espectroscópicas e simulando condições fisiológicas.

3.2 Específicos

- i) determinar a estequiometria dos complexos proteína-ligante, assim como, parâmetros de ligação (K_{SV} , K_q e K_b) e termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS);
- ii) avaliar o mecanismo preferencial de *quenching* e as mudanças na conformação da proteína/enzima por fluorescência sincronizada, fluorescência tridimensional e UV-vis;
- iii) estabelecer o sítio de ligação preferencial para os sistemas avaliados utilizando competidores e marcadores químicos;
- iv) calcular as distâncias intermoleculares entre COC e CE e a HSA, além do índice de hidrofobicidade;
- v) correlacionar os parâmetros de ligação entre COC e CE com HSA frente aos dados farmacocinéticos e dos compostos derivados dos líquens com urease em relação os valores de MIC contra *H. pylori*.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e preparo das soluções

A Albumina do Soro Humano (*Human serum albumin*, HSA), urease (*Canavalia ensiformis*, *Jack bean*), (+)-USN, Tris ((HOCH₂)₃CNH₂), D-glicose, cloreto de férrico (FeCl₃), digoxina (C₄₁H₆₄O₁₄), varfarina (C₁₉H₁₆O₄), hidroxíureia (CH₄N₂O₂), omeprazol (C₁₇H₁₉N₃O₃S), ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato (ANS, C₁₆H₁₃NO₃S.NH₃) e meio MegaCell™ RPMI-1640 foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA).

A cocaína e cocaetileno foram fornecidos pelo professor Ângelo de Fátima da Universidade Federal de Minas Gerais, o qual possui autorização judicial para realizar estudos com esta classe de compostos, sendo a cocaína obtida de amostras da Polícia Federal de Minas Gerais e o cocaetileno sintetizado a partir da reação de transesterificação da cocaína. Os compostos (-)-USN e FUM foram e fornecidos pelo Prof. Dr. Sérgio Fernandes da Universidade Federal de Viçosa, os quais foram isolados e caracterizados a partir do líquen *Cladonia rappii* A. Evans, o qual foi colhido em julho (2012) na Serra do Parque Estadual do Brigadeiro localizado em Araponga, Minas Gerais, Brasil (20°41'26.85''S, 42°28'20.41''W, 1644 m). A espécie de líquen foi identificada pela Dra. Suzana M. A. Martins, das Ciências Naturais Museu do Rio Grande do Sul (Pelotas, RS, Brasil) e depositada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Viçosa (MG, Brasil) sob o número do cupom VIC 35,603. A colheita de *Cladonia rappii* para este estudo foi autorizada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Desenvolvimento (CNPq; processo # 010026/2014-2).

Fosfato de potássio tribásico (K₃PO₄), cloreto de cálcio (CaCl₂), ácido oleico (C₁₈H₃₄O₂), ácido linoleico (C₁₈H₃₂O₂), ácido esteárico (C₁₈H₃₆O₂), ácido palmítico (C₁₆H₃₂O₂), tioureia (CH₄N₂S) e ureia (CH₄N₂O) foram obtidos da Vetec (Brasil). Bicarbonato de potássio (KHCO₃) e acetato de magnésio (Mg(CH₃COO)₂) foram obtidos da Merk (EUA) e diazepam (C₁₆H₁₃C₁N₂O) da Pharma Nostra). Outros reagentes empregados nos ensaios foram de grau analítico com pureza acima de 98%. Em todos os experimentos foi utilizada água ultrapura (condutividade < 0,1 µS cm⁻¹) obtida pelo sistema Master System- 2000 (Brasil, Gehaka).

A solução tampão empregada nos estudos com Albumina do Soro Humano foi preparada a partir de Tris 10 mM, sendo o pH foi ajustado para 7,4 ± 0,1 com HCl 1 mol

L⁻¹. A solução tampão empregadas nos estudos com a urease foi tampão fosfato 20 mM com 1 mM de EDTA a pH = 7,4 ± 0,1. As mesmas foram armazenadas em um frasco de vidro sob refrigeração (4 °C). A solução estoque da HSA a 25 µM foi preparada por pesagem da proteína seguida de solubilização direta em tampão 10 mM (pH 7,4). A solução estoque da urease a 10 µM foi prepara pela pesagem direta da enzima e solubilização em tampão fosfato 20 mM contendo 1 mM de EDTA (pH 7,4). Para os ensaios de interação, a solução estoque dos alcaloides COC (1,65 mM) e CE (1,42 mM) e dos compostos extraídos de líquen (+)-USN, (-)-USN e FUM a 1,0 mM foram preparados dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, todas as soluções foram armazenadas em frascos de vidro com proteção da luz. A concentração máxima de DMSO nos sistemas avaliados com as proteínas não foi superior a 2% (v/v).

Para o ensaio de competidores foram empregados no estudo com HSA: bicarbonato de potássio, acetato de magnésio, fosfato de potássio tribásico, D-glicose, cloreto de cálcio, cloreto de férrico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido esteárico e ácido palmítico Preparou-se a solução estoque em relação a concentração de HCO₃⁻, Mg(II), HPO₄²⁻, Ca(II), Fe(III) e D-glicose em água ultra pura, enquanto para o ácido oleico, linoleico, esteárico e palmítico se utilizou etanol. As diluições seguintes foram realizadas em solução tampão 10 mM (pH 7,4). No ensaio de competição pelo sítio de ligação na HSA, prepararam-se soluções dos marcadores diazepam, digoxina e varfarina. O marcador diazepam foi solubilizado em etanol, a digoxina em DMSO e a varfarina em acetona. Nos ensaios de competição pelo sítio catalítico na urease, prepararam-se soluções estoques dos competidores: hidroxiiureia, tioureia, omeprazol e do substrato ureia. O omeprazol foi solubilizado em DMSO, enquanto os demais em água. A avaliações do índice de hidrofobicidade da HSA foi realizado na presença e ausência dos ligantes COC e CE empregando-se uma solução estoque da sonda analítica, o ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato (ANS) o qual foi pesada e em seguida solubilizada diretamente em tampão Tris 10 mM (pH 7,4).

4.2. Equipamentos utilizados

Para as medidas espectrofluorimétricas empregou-se espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico, equipado com lâmpada de xenônio de 150 W. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX-

6100PC, Brasil) equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico. Os espectros por RMN ^1H foram obtidos a partir de espectrômetro Bruker Avance 600 MHz 600 MHz ($B_0 = 14\text{T}$). As medições dos espectros de dicroísmo circular foram registradas em um espectropolarímetro Jasco (modelo J-815) equipado com sistema de ajuste de temperatura tipo Peltier. As medidas de pH foram realizadas com eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro Gehaka (PG 1800, Brasil). As massas dos reagentes foram medidas em balança analítica eletrônica Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de 0,1 mg.

4.3. Procedimentos experimentais

4.3.1 Ensaio enzimáticos

Os ensaios enzimáticos foram realizados pelo grupo de pesquisa da professora Luzia Modolo da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A urease purificada de *Canavalia ensiformis* (Jack bean) foi utilizada para avaliar a capacidade dos metabólitos de líquen em inibir a atividade ureolítica, a qual tem sido frequentemente usada como modelo (UPDHYAY, 2012). Os ensaios foram realizados em tampão fosfato 20 mM com 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (pH 7,0), sendo adicionado uma concentração fixa de ureia (10 mM) e urease (12,5 mU), na ausência e na presença de cada composto avaliado, (+)-USN, (-)-USN e FUM, a 1,6 mM. Os sistemas foram incubados por 10 min a 25°C e em seguida adicionou-se fenol a 1% m/v contendo 5 mg L^{-1} de nitroprussiato de sódio (SNP), NaOH a 0,5% m/v contendo NaOCl a 0,1% v/v. Após 5 min de incubação das amostras a 50°C, a absorvância foi medida em 630 nm para determinar a quantidade de amônia formada, sendo esse parâmetro usado para determinar a capacidade dos compostos de inibir a urease. Três experimentos independentes foram realizados, cada um com quatro repetições (LAGE et al., 2018).

4.3.2 Medidas de fluorescência no estado estacionário

A titulação espectrofluorimétrica da HSA (2 μM) frente aos ligantes COC e CE (0-80 μM) foi realizada empregando medidas de fluorescência no estado estacionário explorando a fluorescência intrínseca da proteína. Para tanto, se empregou $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$ com *slit* de 10 e 5 nm para excitação e emissão, respectivamente. A

influência da força iônica no meio foi avaliada a partir da variação da concentração de NaCl (0-200 mM). No estudo de interação com urease foi realizado a titulação espectrofluorimétrica da urease (1 μM) frente a (+) - USN, (-) -USN e FUM (0-80 μM). Neste experimento, se empregou $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 334 \text{ nm}$ com *slit* de 10 e 5 nm para excitação e emissão, respectivamente (LAGE et al., 2018). Em todos os estudos de interação, se utilizou como critério analítico e parâmetro de avaliação os valores da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e da constante de ligação (K_{b}) relativo ao processo de interação proteína-ligante.

Para avaliação dos parâmetros termodinâmicos foram realizadas titulações espectrofluorimétricas a 23, 30 e 38°C, em seguida, os valores de K_{b} foram calculados para sistema e aplicando-se a equação de Vant't Hoff foram estabelecidos os valores de ΔH , ΔS e a posteriormente, ΔG (SILVA, 2017)

4.3.3 Fluorescência tridimensional (3D): alterações conformacionais

A concentração da HSA foi fixada em 2 μM enquanto que para COC e CE se usou 40 μM em tampão Tris 10 mM a pH 7,4. As medidas espectrofluorimétricas foram realizadas nas seguintes condições: $\lambda_{\text{ex}} = 220$ a 400 nm (variando de 10 em 10 nm), $\lambda_{\text{em}} = 250$ a 450 nm, com *slit* de excitação e emissão igual a 5 nm (LYRA, 2017). Para os estudos com urease se manteve a concentração da proteína a 1 μM , enquanto para os ligantes (+) - USN, (-) - USN e FUM se usou 20 μM a pH 7,4. Para a enzima as medidas espectrofluorimétricas foram realizadas nas seguintes condições: $\lambda_{\text{ex}} = 220$ a 350 nm (variando de 10 em 10 nm), $\lambda_{\text{em}} = 270$ a 450 nm, e *slit* de excitação e emissão igual a 5 nm (LAGE et al., 2018).

4.3.4 Fluorescência sincronizada: avaliação dos resíduos de Tir e Trp

Os resíduos de Trp foram monitorados utilizando-se $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ com abertura da fenda de excitação de 1,5 nm e emissão em 15 nm, enquanto que para os resíduos de Tir se empregou $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ com *slit* de excitação e emissão igual a 5 nm (SANTOS, 2017) Para ambos os resíduos se avaliou o processo de interação dentro da faixa espectral de 280 a 450 nm. As medidas foram realizadas na presença e na ausência dos ligantes (0-80

μM), e a concentração da HSA e da urease foram mantidas fixas a 2 e 1 μM , respectivamente.

4.3.5 Avaliação dos sítios de ligação e estudos de competição

Para avaliação do sítio preferencial de ligação da HSA foram empregados os marcadores: varfarina (marcador do sítio I), diazepam (sítio II) e digoxina (subdomínio IB, denominado também de sítio III), todos na proporção de 1:1 em relação a HSA (2 μM). Para a avaliação do sítio preferencial de ligação de cada ligante foi realizado uma titulação espectrofluorimétrica da proteína com COC e CE (0-80 μM) na presença e ausência de cada marcador (DANTAS, 2015) sendo utilizado *slit* de excitação de 5 e emissão de 10 nm.

Para o estudo de competição pelo sítio catalítico da urease foram empregados os inibidores competitivos hidroxureia, tioureia e omeprazol e do substrato ureia. Todos na proporção de 1:1 em relação a urease (1 μM). Em seguida, foi realizado uma titulação espectrofluorimétrica da enzima com (+) -USN, (-) -USN e FUM (0-80 μM) na presença e na ausência dos inibidores ou substrato (LAGE et al, 2018). Neste ensaio, foi usado *slit* de excitação e emissão igual a 5 nm.

Para a avaliação da influência de íons inorgânicos e ácidos graxos no processo de interação entre HSA-COC/CE foram realizados estudos de competição, empregando as proporções entre proteína e competidor de acordo com as condições fisiológicas. Foram avaliados os seguintes competidores: Ca(II), Fe(III), D-glicose, Mg(II), HPO_4^{2-} , HCO_3^- , ácido oleico, linoleico, palmítico e esteárico. A concentração da proteína foi fixada em 2 μM , sendo o estudo realizado na presença e na ausência de concentrações crescentes de COC e CE.

4.3.6 Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)

Para a avaliação da distância intermolecular entre fluoróforo e o *quencher* foram realizadas medidas de fluorescência molecular da proteína e do sistema proteína-ligante, assim como, do perfil de absorção molecular dos ligantes. Para tanto, foram mantidas as proporções da HSA e dos ligantes (COC e CE) em 1:2, sendo a concentração empregada HSA de 10 μM e dos ligantes em 20 μM (DANTAS, 2015).

4.3.7 Avaliação de regiões hidrofóbicas da proteína – sonda ANS

Para avaliar possíveis mudanças na hidrofobicidade da superfície da HSA partir da interação com os ligantes COC e CE foram realizados dois ensaios distintos. O primeiro, tem como objetivo monitorar se o ligante interage em regiões hidrofóbicas. Para isso, manteve-se a concentração da HSA (2 μM) e da sonda ANS (2 μM) fixas, variando a concentrações dos ligantes (0-80 μM), empregou-se $\lambda_{\text{ex}}= 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}= 380 \text{ nm}$, com abertura da fenda de excitação de 5 e emissão igual a 10 nm (SILVA, 2017)

Já o segundo ensaio, permite determinar o índice de hidrofobicidade da proteína na presença e ausência dos ligante. Para isso, manteve-se a concentração da HSA (2 μM) e dos ligantes (50 μM) fixos, variando-se a concentração da sonda ANS (0-50 μM). Para o segundo ensaio empregou-se $\lambda_{\text{ex}}= 380 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}= 471 \text{ nm}$, com abertura da fenda de excitação de 1,5 e emissão igual a 5 nm (LYRA, 2017).

4.3.8 Interação proteína-ligante empregando fluorescência e UV-vis

Para os estudos de UV-vis visando avaliar a formação do complexo e alterações na estrutura da HSA empregou-se 10 μM da proteína e 10 μM para os ligantes COC e CE em tampão Tris (pH 7,4) a 10 mM. Os espectros foram obtidos em módulo de absorvância de 200 a 300 nm (SANTOS, 2017).

4.3.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Foram realizados experimentos para determinação do valor de MIC frente a seis isolados clínicos de *H. pylori*, utilizando uma cepa de referência de *H. pylori* (ATCC 43504), em colaboração com a Profa. Dra. Francesca Sisto da Universidade de Milão (Itália). A concentração mínima de cada composto-teste necessária para inibir completamente o crescimento de *H. pylori* foi determinada de acordo com Lage e col. (2018). Diluições seriadas de cada composto foram preparadas e adicionadas a placas de 96 poços contendo 100 μL de meio de cultura MegaCell RPMI-1640 suplementado com soro fetal de bezerro a 3%. Suspensão de *H. pylori* foram preparadas em meio Wilkins Chalgren na concentração de 1 McFarland (3×10^8 bactérias / mL) e diluída em meio de cultura MegaCell RPMI-1640 contendo soro fetal de bezerro a 3%. A concentração final de *H. pylori* em cada poço foi de aproximadamente 5×10^5 UFC (unidade de formação de

colônia). Cada placa foi incubada a 37°C em atmosfera de CO₂ 10% por 72 h, seguida de avaliação do crescimento bacteriano.

4.3.10 Dicroísmo circular

As medições foram realizadas na região do UV no intervalo 190-240 nm. A concentração da proteína foi de 2 µM sendo titulada com incrementos de COC e CE (0, 5, 10 e 20 µM) utilizando tampão fosfato a 5 mM em pH 7,4 (SANTOS, 2017). Foi utilizada cubeta de quartzo de 0,1 mm de caminho óptico, sendo cada espectro a média de quatro *scans* a 50 nm min⁻¹. As medições foram realizadas na região do UV no intervalo 190-240 nm na presença de N₂ (99,99%) como gás inerte. O cálculo da composição da estrutura secundária da proteína na presença e ausência dos ligantes foi realizado com base no método Raussens (SATZER et al., 2016).

4.3.11 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Nos ensaios de RMN ¹H foi utilizado tampão fosfato 10 mM (pH 7,4) em água deuterada (D₂O). A solução estoque da HSA 0,1 mM foi preparada em tampão fosfato, enquanto que o estoque dos ligantes COC e CE a 10 mM foram preparadas em tampão fosfato com 10% (v/v) de DMSO-*d*₆. Foram obtidos espectros dos ligantes (1 mM) na ausência e presença de HSA, cuja concentração em relação aos ligantes foi 25, 50 e 100 vezes menor, para um volume final de 600 µL. Os espectros foram ajustados quando ao deslocamento químico utilizando o sinal do DMSO-*d*₆ como referência (SILVA, 2017).

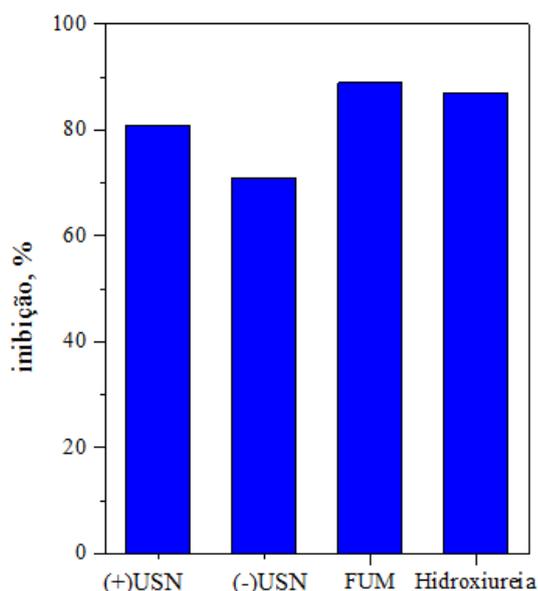
5 RESULTADOS

5.1 Estudos de interação entre metabólitos secundários de líquens e urease

5.1.1 Efeito dos metabólitos secundários de líquen na atividade enzimática da urease

Os resultados iniciais dos ensaios enzimáticos mostraram que todos os compostos foram tão eficientes quanto a hidroxiiureia, um inibidor de referência (Figura 13), de forma que o FUM inibiu cerca de 90% da atividade da enzima, enquanto que nas mesmas condições experimentais, (R) - (+) -USN e (S) - (-) -USN inibiram a atividade ureolítica em 81 e 72%, respectivamente. Uma vez que os compostos se mostraram efetivos quanto a inibição da urease, fez-se necessário avaliar o mecanismo de ação desses metabólitos, o que foi feito por ensaios cinéticos. Os resultados desta avaliação indicaram que (R) - (+) -USN e FUM são típicos inibidores competitivos.

Figura 13- A atividade enzimática foi avaliada a partir de reações contendo os metabólitos secundários de líquen (1 mM), ureia (10 mM) e urease de *Canavalia ensiformis* (12,5 mU).



Fonte: disponibilizado pelo Prof. Ângelo de Fátima (UFMG).

Muitos compostos têm sido reportados na literatura como inibidores competitivos, como por exemplo, fluoreto (UPDHYAY, 2012), fosforamidatos (REGO et al, 2018) e baicolina (TAN et al., 2013), entre outros. Por outro lado, (S) - (-) -USN funciona como um inibidor misto. Outros produtos naturais, como o aldeído protocatecuico, siringaldeído (3,5-dimetoxi, 4-hidroxibenzaldeído) e vanilina também mostraram ser inibidores mistos para urease (REGO et al, 2018). Inibidores competitivos competem com

o substrato pelo o sítio ativo da enzima e estão relacionados com a formação do complexo (enzima-inibidor). Os inibidores do tipo misto, por sua vez, são capazes de se ligar tanto à enzima livre, formando o complexo (enzima-inibidor), como ao complexo enzima-substrato. A afinidade dos compostos (R) - (+) -USN para o sítio ativo da urease foi determinada como sendo 3,1 vezes superior à do (S) - (-) -USN.

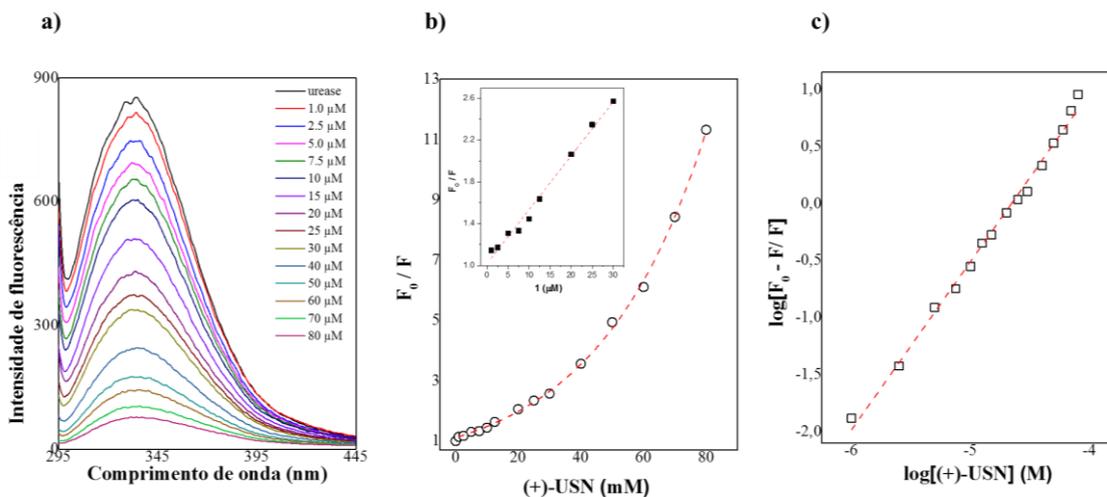
Considerando a eficiência dos metabólitos secundários de líquen para inibir a urease baseado no perfil cinético foram realizados estudos biofísicos do processo de interação para um melhor entendimento do sistema em estudo.

5.1.2 Avaliação dos parâmetros de ligação e termodinâmicos

Inicialmente realizou-se uma titulação espectrofluorimétrica, onde variou-se a concentração dos três metabólitos secundários de líquen ((+) -USN, (-) -USN e FUM) e manteve-se fixa a concentração da urease de *Canavalia ensiformis*, que contém quatro resíduos Trp nas posições 495, 648, 708 e 728. Dessa forma a fluorescência intrínseca da urease é mais ou menos um resultado da contribuição dos resíduos de Trp.

Por meio deste estudo observou-se que a urease apresentou uma banda de fluorescência intensa em 334 nm, indicando que os resíduos de Trp estão parcialmente protegidos do solvente, quando a enzima é excitada em 280 nm (ZHANG et al, 2001). Foi também observado que a adição de concentrações crescentes dos inibidores, levou a uma redução da intensidade de fluorescência e a um deslocamento do comprimento de onda de máxima emissão para menores comprimentos de onda (deslocamento para o azul) de 334 para 332 nm, conforme ilustrado na Figura 14 para o (R) - (+) -USN. Isso pode estar relacionado a mudanças conformacionais induzidas pela interação com os inibidores. Além disso, o deslocamento para menores comprimentos de onda indica também que houve uma diminuição da polaridade do microambiente dos resíduos de Trp (ALBANI, 2007). Resultados semelhantes foram observados para (S) - (-) -USN, no qual o deslocamento para menores comprimentos de onda foi de 334 para 333 nm. O ácido fumarprotocetrárico, por sua vez, apresentou um deslocamento para maiores comprimentos de onda (deslocamento para o vermelho) de 334 para 335 nm e isto se deve ao aumento da polaridade no microambiente em torno dos resíduos de Trp (ALBANI, 2007). Os resultados para os (S) - (-) -USN e FUM são apresentados no Apêndice I.

Figura 14- Perfil espectral de emissão da urease (1,0 μM) na presença de diferentes concentrações de (R)-(+)-USN a pH 7,4 e 30°C (a). Gráfico de Stern-Volmer (b). Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação (c).



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Como a interação entre os três inibidores e a urease resultou na redução da fluorescência intrínseca desta enzima, fez-se necessário determinar por qual mecanismo esse processo ocorreu: *quenching* estático ou dinâmico. Essa determinação é feita analisando a relação entre a constante de Stern Volmer (K_{sv}), calculada pela equação 3, e a temperatura. Quando o valor da constante aumenta em função da elevação da temperatura, é um indicativo que o processo ocorre por *quenching* dinâmico, uma vez que temperaturas mais elevadas levam a um maior coeficiente de difusão, e por consequência um maior número de choques entre o fluoróforo (proteína) e o *quencher* (ligante) (SURYAWANSHI et al., 2016). A diminuição dos valores das constantes de ligação com o aumento da temperatura, por sua vez, indica a ocorrência do processo por *quenching* estático, visto que temperaturas elevadas afetam a estabilidade do complexo proteína-*quencher*. (WANI et al., 2017). Adicionalmente, o perfil exponencial do gráfico de K_{sv} (Figura 14b) indica que todos os resíduos de Trp estão acessíveis ao *quencher* ou que um dos resíduos Trp é o único responsável pela fluorescência intrínseca da urease (ALBANI, 2007)

Com base nos resultados da Tabela 2 podemos observar que os valores de K_{sv} diminuíram com o aumento da temperatura, para todos os inibidores. Assim, o processo de interação entre os três inibidores e a urease ocorreu predominantemente por meio do mecanismo de *quenching* estático com formação de um complexo não-fluorescente.

Tabela 2- Parâmetros de ligação e termodinâmicos referentes a interação entre os metabólitos secundários de líquen e urease.

Compostos	T (°C)	Parâmetros de ligação						Parâmetros termodinâmicos		
		K_{sv} ($10^4 M^{-1}$)	r	K_q ($10^{12} M^{-1}$)	K_b ($10^5 M^{-1}$)	n	r	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
(+) -USN	23	5,25 ± 0,18	0,9948	5,25	52,5 ± 3,7	1,41 ± 0,07	0,9898	-33,37		
	30	5,05 ± 0,16	0,9955	5,05	35,5 ± 4,9	1,42 ± 0,06	0,9823	-33,80	-15,00	+61,96
	38	4,60 ± 0,17	0,9936	4,60	18,6 ± 2,4	1,32 ± 0,07	0,9862	-34,27		
(-) -USN	23	5,48 ± 0,30	0,9870	5,48	18,3 ± 4,2	1,30 ± 0,09	0,9836	-35,58		
	30	4,86 ± 0,28	0,9848	4,86	15,7 ± 4,5	1,29 ± 0,08	0,9804	-35,92	-21,02	+ 49,10
	38	5,00 ± 0,28	0,9859	5,00	12,3 ± 4,4	1,27 ± 0,07	0,9795	-36,30		
FUM	23	3,29 ± 0,18	0,9861	3,29	0,28 ± 0,01	0,96 ± 0,02	0,9955	-25,24		
	30	3,52 ± 0,19	0,9871	3,52	0,25 ± 0,01	0,95 ± 0,01	0,9979	-25,50	-14,28	+ 36,98
	38	3,81 ± 0,23	0,9830	3,81	0,21 ± 0,01	0,92 ± 0,02	0,9978	-25,78		

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Uma vez definido o mecanismo de *quenching*, faz-se necessário avaliar o grau de interação, sendo este um parâmetro relevante, pois, ajuda a entender o mecanismo pelo qual os metabólitos secundários de líquen inibem a atividade da urease. Assim, a constante de ligação (K_b) é usada como parâmetro, uma vez que expressa a força de interação entre um ligante e uma dada proteína. No caso dos metabólitos de líquen foi observado que as constantes de interação estavam na ordem de 10^4 , sendo a interação entre (R) - (+) -USN e a urease mais forte que os demais (Tabela 2).

Além disso, foi observado na literatura que os valores de K_b para os compostos de líquen em relação à urease estavam no mesmo intervalo daqueles relatados para a interação entre pentaclorofenol ($3,85 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ a $32 \text{ }^\circ\text{C}$) (QING & HONG-MEI, 2012) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($1,96 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ a $29 \text{ }^\circ\text{C}$) (ZHANG, ZHANG, WANG, 2011) e Cu (II) ($3,89 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ para $[\text{Cu (II)}] < 16 \text{ } \mu\text{M}$) (WANG, ZHANG, ZHANG, 2011) e a urease de *Jack bean*. No entanto, esses autores não avaliaram o potencial do pentaclorofenol, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e do Cu (II) como inibidores da urease.

O fato de o (R) - (+) -USN interagir mais efetivamente com a urease que (S)-(-)-USN provavelmente está relacionado a capacidade da molécula em se acomodar melhor ao sítio ativo da urease, indicando que a enzima é enantioesletiva para este isômero do ácido úsnico. Outras proteínas enantioesletivas são descritas na literatura, como por exemplo, a albumina de soro humano (HSA) que se mostrou enantioesletiva para o anti-inflamatório (R) -ibuprofeno (YAMASAKI et al., 2013) e para o pesticida (S)-diclofopmetil (ZHANG et al., 2014). Desta forma, os valores de K_b permitem estabelecer quando a proteína pode ser enantioesletiva a um determinado isômero.

Similarmente ao observado para os valores de K_{SV} , a constante de ligação (K_b) com os compostos de líquen e a urease reduziram com o aumento da temperatura, confirmando a ocorrência de *quenching* estático. De acordo com a equação 1, n corresponde ao número de sítios ocupados pelo ligante na estrutura da urease, os valores de n variaram de 0,92 a 1,42; indicando que as interações ligante-urease ocorram na proporção de 1: 1.

Os parâmetros termodinâmicos indicados na Tabela 2 foram obtidos usando a equação linearização da equação de Van't Hoff (equação 5) nos ensaios de interação realizados em diferentes temperaturas, cujos gráficos estão expostos no Apêndice II e III (SARWAR et al., 2015), evidenciando que o processo de interação foi entropicamente favorável. O cálculo desses parâmetros permite relacionar o tipo de forças envolvidas na interação entre os metabólitos secundários de líquens e a urease. A energia livre de Gibbs (ΔG), por sua vez foi calculada de acordo com a equação 6. Os valores negativos para ΔG

indicam que a interação entre os compostos de líquen e a urease é termodinamicamente espontâneo.

As principais forças que podem estar envolvidas no processo de interação entre os metabólitos secundários de líquens e a urease são: forças hidrofóbicas (e entalpia e a entropia positivas $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$); forças eletrostáticas ($\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$) e ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals ($\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$) (ROSS & SUBRAMANIAN, 1981). Como os valores de ΔH foram negativos e os valores de ΔS foram positivos para os metabólitos avaliados, o processo de interação ocorre preferencialmente por meio de interações eletrostáticas, sendo um processo espontâneo, pois os valores de ΔG foram negativos. Assim, uma vez que a interação entre os compostos e a urease for estabelecida, as moléculas de água associadas às proteínas foram deslocadas, sendo essa condição responsável pelos valores positivos da entropia.

5.2 Estudos de alterações conformacionais da urease

5.2.1 Avaliação da alteração da estrutura da urease por fluorescência 3D

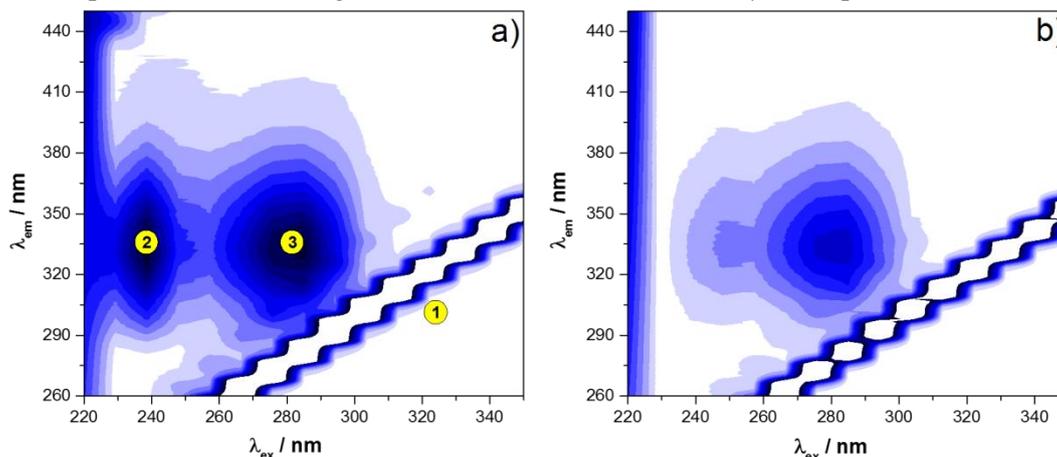
É bem conhecido que o espectro de fluorescência tridimensional pode fornecer informações mais detalhadas sobre a alteração da configuração da proteína, quando a mesma se encontra ligada a molécula, pelo fato das forças intramoleculares envolvidas na manutenção da estrutura secundária serem alteradas (SURYAWANSHI et al., 2016)

Por meio dessa técnica, as alterações conformacionais na estrutura da proteína podem ser investigadas a partir das mudanças características das bandas de emissão referentes à cadeia polipeptídica e dos resíduos de triptofano e tirosina, que estão relacionadas com alterações na conformação do esqueleto péptico associado transformação helicoidal.

O espectro de fluorescência tridimensional para a urease livre e complexada com isômeros do USN e o FUM estão apresentados na Figura 15. Neste estudo, o pico 1 corresponde ao espalhamento da radiação (*scattering Rayleigh*) caracterizado pela reemissão da radiação ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$) pela água (solvente), ou seja, uma pequena fração da radiação absorvida é espalhada em todas as direções em determinado comprimento de onda (QING & HONG-MEI; 2012); o pico 2 corresponde à emissão dos resíduos Trp e Tir, enquanto a emissão da cadeia polipeptídica da estrutura da urease está representada pelo pico 3 (DANTAS et al., 2017). Os principais parâmetros associados aos espectros

3D obtidos quanto à posição e intensidade dos picos de máxima emissão de fluorescência e efeito Stokes foram compilados na Tabela 3.

Figura 15- O espectro de fluorescência 3D para (a) urease livre e (b) complexada com (*R*) - (+) - USN, em pH 7,40. Enzima e ligante foram utilizados em 1,0 e 10 μ M, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A Figura 15 mostra diminuição significativa na fluorescência referente aos picos 2 e 3. Foi obtido um perfil espectral semelhante para os sistemas contendo (*S*) - (-) -USN e FUM (Apêndice IV). Analisando os valores da Tabela 3 é possível inferir que a intensidade de fluorescência dos picos 2 e 3 foi reduzida em 35 e 74%, respectivamente, na presença do (*R*) - (+) -USN; 58% e 29% na presença do (*S*) - (-) -USN e de 23 e 46%, na presença do FUM. A redução na intensidade de fluorescência 3D correspondente ao pico 2 indica alterações no microambiente dos resíduos de Tir e Trp, enquanto que para o pico 3 estão relacionadas a modificações na estrutura nativa da proteína.

As variações mais significativas na intensidade de fluorescência foram observadas quando o ligante foi adicionado ao meio, indicando que ocorreram alterações na cadeia polipeptídica e no dobramento da enzima, sendo essas alterações mais significativas na presença do (*R*) - (+) -USN (WANG et al., 2015). Além disso, pôde-se observar o descolamento Stokes para maiores comprimentos de onda, para o pico 2, na presença de (*R*) - (+) -USN e (*S*) - (-) -USN, indicando alterações conformacionais na microrregião dos resíduos de Tir e Trp, a qual se torna mais polar (exposição ao solvente). Por outro lado, não foi observado deslocamento Stokes na presença do FUM. Com relação ao pico 3, também se observou deslocamento Stokes, porém, para menores comprimentos de onda, na presença cada composto avaliado, indicando mudanças conformacionais na estrutura da enzima.

Tabela 3- Parâmetros de fluorescência tridimensional para urease livre (pH 7,4) ou na presença de compostos de líquen. Proteína e ligantes foram usados em 1,0 e 10 μ M, respectivamente, sendo o pico 1 referente ao espalhamento da radiação (*scattering Rayleigh*); pico 2 referente à emissão dos resíduos Trp e Tir e o pico 3 referente à emissão da cadeia polipeptídica da estrutura da urease.

Pico	Urease			Urease + (R)-(+)-USN			Urease + (S)-(-)-USN			Urease + FUM		
	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes ¹ $\Delta\lambda$ (nm)	F (a. u.)	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F (a. u.)	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F (a. u.)	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F (a. u.)
1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	> 1000	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	> 1000	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	> 1000	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	> 1000
2	285 / 333	48	577 (100%) ²	285 / 334	49	374 (65%)	285 / 335	50	337 (58%)	285 / 333	48	443 (77%)
3	238 / 333	95	596 (100%)	248 / 332	84	157 (26%)	248 / 333	85	171 (29%)	248 / 336	88	336 (56%)

¹Deslocamento Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$)

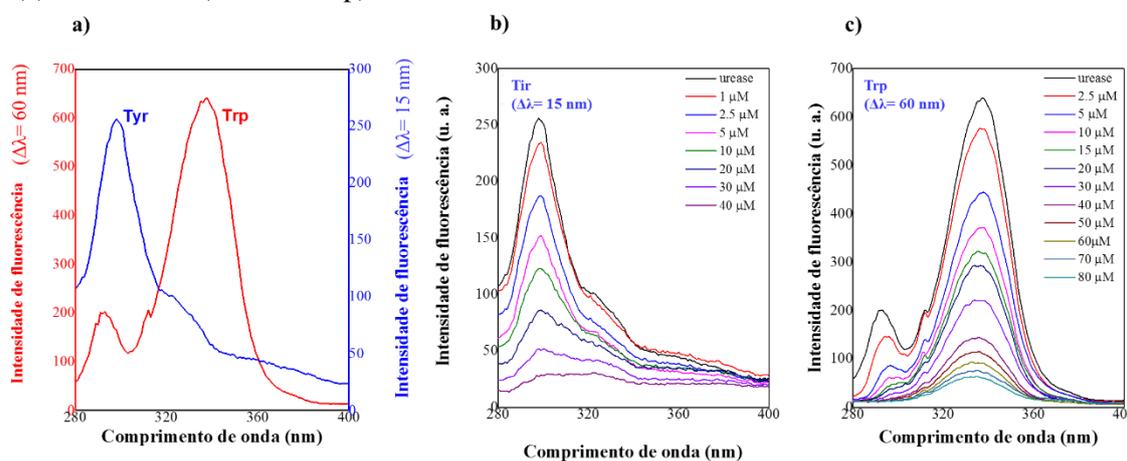
²Números entre parênteses representam a porcentagem relativa do sinal de fluorescência. Valores menores indicam maior variação em relação ao controle (urease livre).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

5.2.2 Fluorescência sincronizada

A fluorescência sincronizada é uma técnica muito sensível, capaz de avaliar mudanças na polaridade do microambiente dos resíduos de tirosina e triptofano (BOBONE, VAN DE WEERT, STELL, 2014). As constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) para um $\Delta\lambda = 15$ nm (Tir) e $\Delta\lambda = 60$ nm (Trp) foram usadas como parâmetro para averiguar as interações entre os metabólitos secundários de líquen e a urease. O espectro de fluorescência sincronizada da urease na presença de (R) - (+) -USN é mostrado na Figura 16. O mesmo perfil foi obtido para os demais inibidores avaliados (Apêndice V), e os parâmetros de ligação entre os compostos de líquen e a urease constam na Tabela 4.

Figura 16- Espectros de fluorescência sincronizado da urease (1,0 μ M) após a adição de concentrações crescentes de (R)-(+)-USN em pH 7,4, monitorando (b) $\Delta\lambda = 15$ nm (resíduos Tir) e (c) $\Delta\lambda = 60$ nm (resíduos Trp).



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Analisando os espectros da Figura 16(b) e 15(c) foi observado um desvio no máximo comprimento de onda de emissão da urease mais significativa para os resíduos de Trp do que para a Tir na presença do (R) - (+) -USN. O mesmo comportamento foi observado para o (S) - (-) -USN (Apêndice V) enquanto que nenhuma diferença foi detectada na presença do FUM (Apêndice V). Isto provavelmente ocorre pelo fato de que os resíduos de Tir são menos sensíveis a mudanças de polaridade no meio quando comparados com os resíduos de Trp (SUN et al., 2010). Um aumento na polaridade do microambiente está relacionado à variação positiva no λ_{max} , enquanto uma redução da polaridade está associada à variação negativa no λ_{max} . A partir deste perfil de variação, quando houver, permite descrever mudanças na estrutura da proteína nativa.

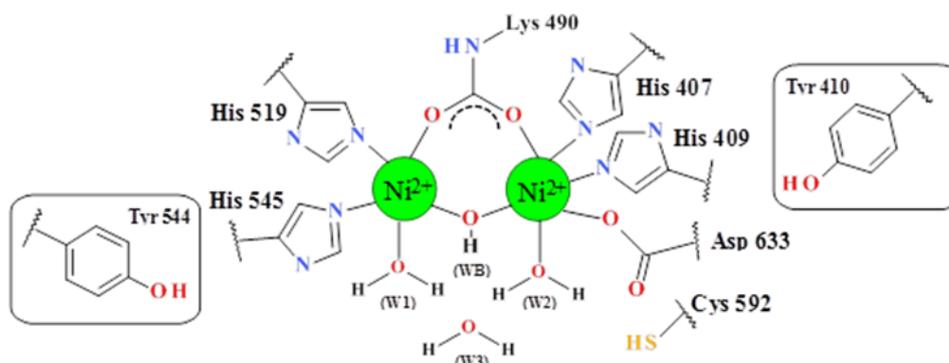
Tabela 4- Parâmetros de ligação de fluorescência sincronizada para os compostos secundários de líquen e urease.

Composto	$\Delta\lambda$ (nm)	Stern-Volmer		$\Delta\lambda_{\max}$ (nm)
		K_{SV} ($10^4 M^{-1}$)	r	
(+) -USN	15	$18,61 \pm 0,18$	0,9938	+1
	60	$6,34 \pm 0,08$	0,9947	- 4
(-) -USN	15	$14,94 \pm 0,22$	0,9939	+ 1
	60	$6,01 \pm 0,11$	0,9932	- 2
FUM	15	$4.81 \pm 0,07$	0,9923	+1
	60	$4,09 \pm 0,04$	0,9938	+1

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Com base nos valores de K_{SV} , os resíduos de Tir foram sistematicamente mais afetados quando comparados aos de Trp (Tabela 4). Nossa hipótese é que este resultado está associado à presença de Tir nas posições 410 e 544, próximo aos principais resíduos de His (posições 409 e 545) conhecidos por coordenar os átomos de Ni no sítio ativo da urease de *Jack bean* (Figura 17). Já os resíduos de Trp, que estão nas posições 495 e 648, estão distantes do sítio catalítico da urease (Figura 17), sugerindo que os resíduos de Tir tiveram seu microambiente alterado mais significativamente que os Trp. Além disso, o valor de K_{SV} para Tir ($\Delta\lambda = 15$ nm) no sistema contendo (R) - (+) -USN foi superior ao da urease na presença de seu enantiômero e ao FUM. Isto sugere que o (R) - (+) -USN interage de preferência com o sítio catalítico da urease em relação ao seu enantiômero. De fato, os resultados cinéticos indicaram que a afinidade do (R) - (+) -USN pelo sítio ativo de urease é 3 vezes maior que o do (S) - (-) -USN (LAGE et al., 2018).

Figura 17- Resíduos de tirosina (Tir410 e Tir544) próximos ao centro catalítico da urease na forma nativa. Os resíduos de Tir não fazem parte do sítio catalítico (W₁-W₃, moléculas de água no sítio ativo)

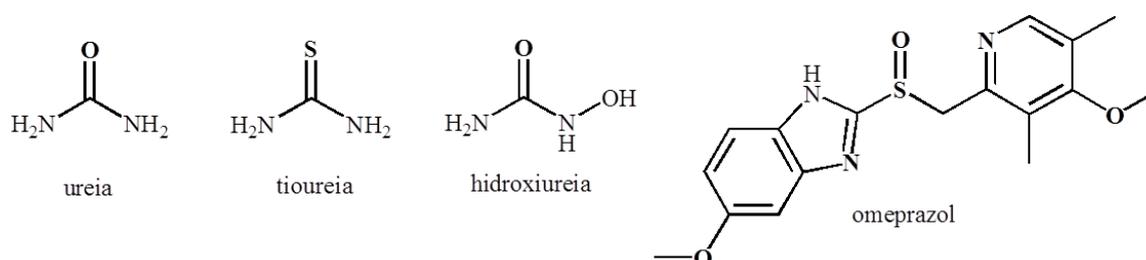


Fonte: Adaptado de LAGE et al., 2018.

5.3 Estudos de competição

Nesse estudo foi avaliado a influência do substrato (ureia) e de alguns inibidores clássicos (tiourea, hidroxitiourea e omeprazol) (Figura 18) na interação entre a urease e os compostos de líquen. Neste ensaio, foi usado a razão entre as constantes de ligação na presença e na ausência dos competidores e substrato, como parâmetro de avaliação, (K_b'/K_b), na qual K_b' e K_b são a constante de ligação na presença e ausência de um competidor, respectivamente.

Figura 18- Estrutura do substrato e dos inibidores (tiourea (TU), hidroxitiourea (HU) e omeprazol (OM)) avaliados.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A formação do complexo urease-metabólitos secundários de líquens é favorecida quando $K_b'/K_b > 1$ e quando essa razão for menor que 1, indica que a formação do complexo é desfavorecida. Os valores estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5- Relação das constantes de ligação da urease na ausência (K_b) e na presença (K_b') de substrato ou dos inibidores clássicos da urease, nas seguintes condições: urease 1,0 μM , 25 μM de substrato ou inibidor, compostos de líquen (1,0-80 μM). HU: hidroxitiourea (inibidor competitivo); OMP: omeprazol (inibidor não competitivo) e TU: tiourea (inibidor competitivo).

Composto	Relação das constantes (K_b'/K_b)			
	Substrato	Inibidores		
	Ureia	HU	OMP	TU
(+) -USN	0,06	0,69	0,06	0,08
(-) -USN	0,20	0,87	0,13	0,17
FUM	0,02	2,63	0,03	0,04

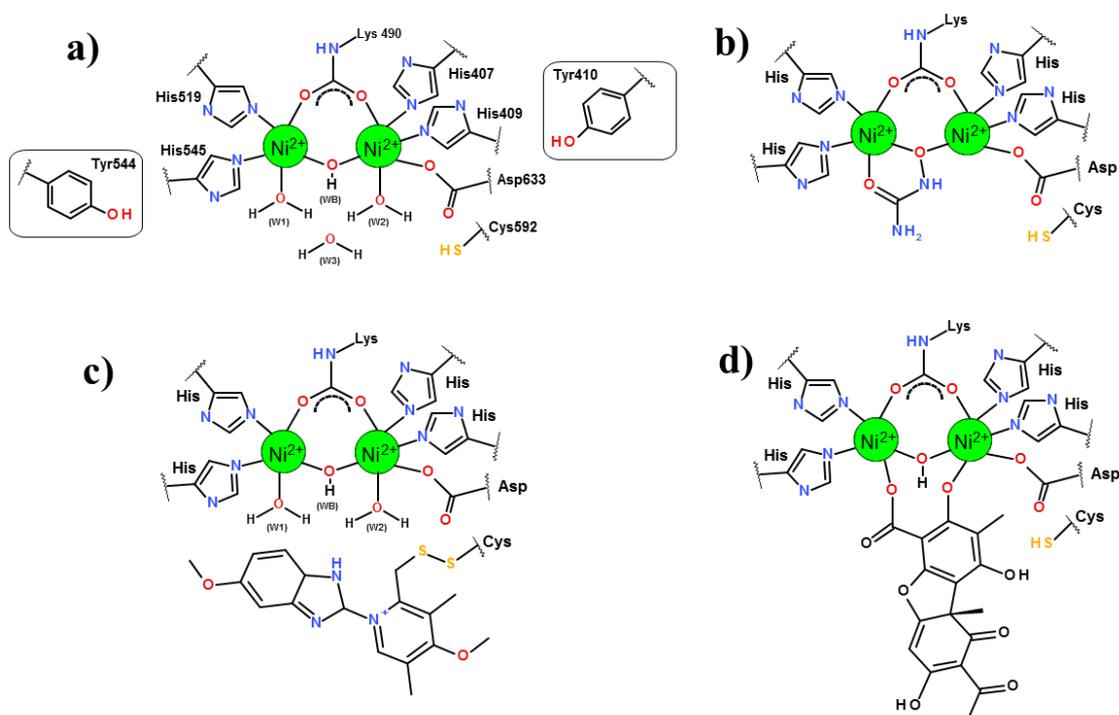
K_b' = constante de ligação na presença de 25 μM do substrato ou inibidor.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Analisando os dados da Tabela 5 é notório que a constante de ligação diminui tanto na presença do substrato como também dos inibidores clássicos ($K_b'/K_b < 1$), indicando que os metabólitos secundários de líquen interagem no sítio ativo da urease e competem com o substrato pelo mesmo. Este resultado está em concordância com as conclusões obtidas pelo estudo de fluorescência sincronizada (Figura 16; Tabela 4).

Além disso, vale ressaltar que tanto a tiourea como a hidroxitiourea são inibidores competitivos (OLIVEIRA et al., 2014), no entanto a tiourea foi um inibidor mais eficaz que a hidroxitiourea, além disto, na presença de hidroxitiourea houve aumento da interação entre o FUM e a urease. Esse comportamento pode estar relacionado à capacidade da urease de catalisar a hidrólise da hidroxitiourea (Figura 19(a)), mesmo em um nível baixo (MARLIER et al., 2010). O omeprazol, por sua vez é um inibidor da bomba de prótons das células parietais gástricas, que reduz a secreção ácida gástrica, sendo muito usado no tratamento contra *H. pylori*, no qual atua aditiva ou sinergicamente com amoxicilina, claritromicina e metronidazol. Além disso, o omeprazol também é pró-inibidor da urease (não competitivo). Seu mecanismo de inibição é baseado na sua reação com os resíduos de Cis592 livre da urease (Figura 19(b)), causando um bloqueio do acesso da ureia ao sítio catalítico da enzima (AMTUL et al., 2002; KUEHLER et al., 1995).

Figura 19- Representação esquemática do sítio ativo da urease nativa de *Jack bean* (a) (KRAJEWSKA & BRINDELL, 2016) e sua interação com a hidroxitiourea (b) (KRAJEWSKA, 2007) (omeprazol após reação com o resíduo Cis (c) (AMTUL et al., 2002) ou (R) - (+) - USN (d; modelo proposto). W₁-W₃, moléculas de água no sítio ativo; W_B, ponte de água (forma de hidróxido). Os resíduos Tyr410 e Tyr544, que não pertencem ao sítio ativo da urease foram afetados pelo processo de interação, conforme atestado por ensaio de fluorescência.



Fonte: LAGE et al., 2018.

O que provavelmente explica o fato de o (R) - (+) -USN interagir de forma mais efetiva no sítio ativo da urease quando comparado ao seu enantiômero (S) - (-) -USN, primeiramente é o fato da ligação com o (S) - (-) -USN inativar a urease por induzir a

formação de agregados enzimáticos com o grupo -SH da urease, bloqueando-os, e não por interagir, necessariamente, com o sítio ativo da enzima (VICENTE & CIFUENTES, 1979). Essa condição pode ser revertida por meio de uma adição nucleofílica a carbonila em C₁ do ácido úsnico (Figura 7) na presença de Cis ou ditiotreitól (KRAJEWSKA & BRINDELL, 2016). Assim, o mecanismo de inativação e reativação da urease na presença do (S) - (-) -USN pode também ser semelhante à do omeprazol (AMTUL et al., 2002) (KUEHLER et al., 1995), sendo ele, portanto, um inibidor misto.

O outro motivo que explica o fato de o (R) - (+) -USN interagir de forma mais efetiva é a enantioseletividade da urease, que pode ser atribuída à configuração espacial de -CH₃ do C_{9b} (Figura 7) que o impede de reagir com os resíduos de Cis592 e, conseqüentemente, interagir preferencialmente com urease no sítio ativo, por forças eletrostáticas, como demonstrado na Figura 19(c), de uma maneira comparativa a outros inibidores.

5.4 Efeito dos metabólitos secundários de líquen no crescimento da *H. pylori*

Os valores da concentração inibitória mínima (MIC) desse estudo estão na Tabela 6 e mostraram que o (R) - (+) -USN foi o composto mais eficiente contra as cepas bacterianas testadas, com exceção da estirpe de referência NCTC11637 e da estirpe clínica R40 / 442, cuja potência foi comparável à do (S) - (-) -USN. Os valores da MIC para o composto (R) - (+) -USN foram de 3,8 a 7,8 vezes menores do que os valores para o omeprazol (OMP; medicamento de referência) e de 74 a 286 vezes menores do que os valores para hidroxiiureia (HU) ou tioureia (TU). Da mesma forma, os outros produtos naturais de líquen, o (S) - (-) -USN e o FUM foram mais potentes do que o medicamento de referência ou inibidores de urease testados. O composto (S) - (-) -USN foi de 2 a 4 vezes mais eficiente que o OMP, de 25-99 vezes mais eficiente que HU e de 39-154 vezes mais potente que TU. Enquanto a potência para o FUM, foi de até 2,7 vezes, 25-99 vezes e 52-104 vezes, respectivamente.

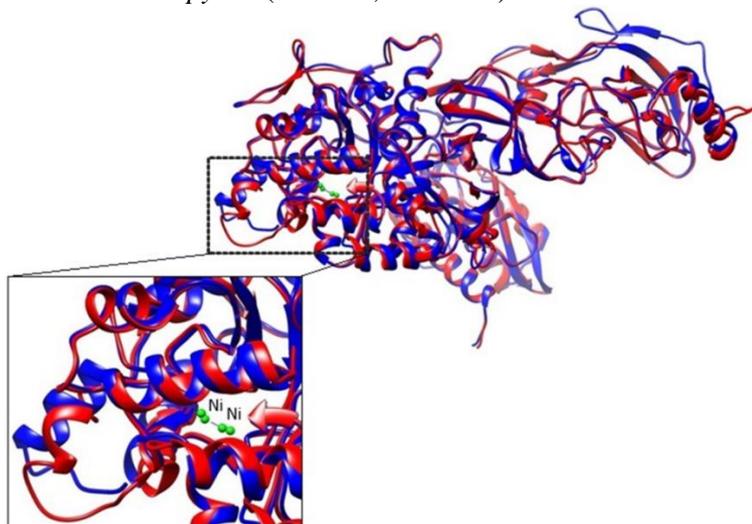
Tabela 6- Concentração inibitória mínima (MIC; μM) de metabólitos secundários de líquen necessários para inibir o crescimento de *H. pylori*. Hidroxiureia (HU), omeprazol (OMP) e tiourea (TU) foram usados como referências de inibidores de urease.

Cepas bacterianas	(R) -(+)-USN	(S) -(-)-USN	FUM	HU	OMP	TU
190	0,012	0,046	0,068	1,683	0,093	3,550
E17	0,012	0,023	0,034	1,683	0,093	3,550
23	0,023	0,046	0,068	3,366	0,185	3,550
110 R	0,012	0,023	0,034	3,366	0,046	0,887
11637	0,023	0,023	0,068	3,366	0,093	3,550
R40/499	0,012	0,023	0,034	3,366	0,046	3,550
R40/442	0,023	0,023	0,034	3,366	0,093	3,550

Fonte: LAGE et al., 2018.

No geral, a ordem de potência para inibir o crescimento da *H. pylori* foi (R) -(+) - USN > (S)-(-)-USN > FUM > OMP > HU > TU (Tabela 6). Esses resultados estão de acordo com os estudos de interação com a urease, onde se observa a mesma ordem em relação aos valores de K_b para os metabólitos de líquen. Vale ressaltar que o sítio ativo da urease de *Jack bean* e da urease da *H. pylori* compartilham elevada semelhança (Figura 20), embora a urease da *H. pylori* seja constituída por duas subunidades, enquanto a urease de *Jack bean* seja composta por uma única cadeia de aminoácido, o que pode levar a diferenças no (s) sítio (s) alostérico(s) visado(s) para o (S)-(-)-USN.

Figura 20- Superposição estrutural das ureases no sítio ativo. Urease nativa de *Jack bean* (590-607, azul) e urease nativa de *H. pylori* (319-336, vermelho) mostram a alta semelhança estrutural.



Fonte: LAGE et al., 2018.

Uma comparação entre diferentes compostos derivados de produtos naturais com atividade anti-ureolítica e os metabólitos secundários de líquen estão listadas na Tabela 7.

Tabela 7- Valores de IC₅₀ para várias classes de inibidores de urease.

Composto	Condições experimentais	Urease	IC ₅₀ (µM)		Referência
			Composto	Padrão de referência	
Andrografolide	Tampão fosfato 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7, 25°C	<i>H. pylori</i>	3170	-	MO et al., 2015
		<i>C. ensiformis</i>	3280	-	
Quercetina (flavonoide)	Tampão fosfato 20 mM, pH 7 a 25°C	<i>H. pylori</i>	11,2	Ácido acetohidroxâmico (19)	XIAO et al., 2012
Orientin (C-glucosiflavonoide)	Tampão fosfato 20 mM, pH 7,0	<i>C. ensiformis</i>	28	Tioureia (21,5)	PERVEEN et al., 2011
Baicalin (polifenol)	Tampão fosfato 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7, 25°C	<i>C. ensiformis</i>	2700	-	TAN et al., 2013
Sculetina (polifenol)	Tampão fosfato 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7, 25°C	<i>C. ensiformis</i>	1400	-	WU et al., 2013
Galeato de metila	Tampão fosfato com EDTA, pH 7,3	<i>H. pylori</i>	1300	Tioureia (500)	NGAN et al., 2012
Derivados da cumarina	Tampão fosfato 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7,3	<i>H. pylori</i>	47,8	Ácido acetohidroxâmico (45)	JADHAV et al., 2013
Atranorina	Tampão fosfato, pH 6,8, 30°C	<i>C. ensiformis</i>	18,2	Tioureia (21)	RAMSAY et al., 2012
Ácido boswélico	Tampão fosfato, pH 6,8	<i>C. ensiformis</i>	6,8	Tioureia (21)	GOLBABEI et al., 2013
Palmatina	Tampão HEPES 20 mM, pH 7,5, 37°C	<i>H. pylori</i>	530	Ácido acetohidroxâmico (70)	ZHOU et al., 2017
		<i>C. ensiformis</i>	30	Ácido acetohidroxâmico (20)	
Epiberberina	Tampão HEPES 20 mM, pH 7,5, 37°C	<i>H. pylori</i>	3,0	Ácido acetohidroxâmico (83)	TAN et al., 2017
		<i>C. ensiformis</i>	2,3	Ácido acetohidroxâmico (22)	
(R)-(+)-ácido úsnico	Tampão fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4, 25°C		976		Este trabalho
(S)-(-)-ácido úsnico		<i>C. ensiformis</i>	983	-	
Ácido fumarprotocetrárico			827		

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Foi possível observar que os compostos estudados nesse trabalho, (R)-(+)-ácido úsnico, (S)-(-)-ácido úsnico e ácido fumarprotocetrárico apresentaram melhores resultados quando comparado a andrografolide, baicalin (polifenol), esculetina (polifenol) e galeato de metila, uma vez que tiveram menores valores de IC₅₀. Contudo, outros compostos apresentaram reduzido valor de IC₅₀.

Neste contexto, alguns pontos devem ser considerados. A diversidade estrutural dos compostos é variada, a qual tem influência sobre a capacidade dos mesmos em inibir o crescimento celular, explicando as diferenças de valores. Outro ponto importante é que o valor de IC₅₀ não pode ser definitivo para inferir se um determinado composto é efetivo ou não, uma vez que o mesmo pode atuar de maneira diferente nos sistemas *in vitro* e *in vivo*, necessitando de ensaios completos que avaliem a toxicidade, além da capacidade de agir efetivamente na enzima em um sistema mais complexo, como é o caso dos metabólitos secundários de líquen avaliados nesse trabalho, os quais mesmo não tendo valores menores de IC₅₀ comparados a outros compostos naturais, mostraram-se efetivos frente a cepas bacterianas resistentes.

Diante da potencial utilização dos metabólitos secundários de líquen na indústria farmacêutica, sua aplicação a nível comercial deve ser analisada cuidadosamente, pois, geralmente, é necessário destruir uma grande quantidade de biomassa, para a obtenção do composto bioativo de interesse (BOUSTIE & GRUBE, 2005). Além disso, a baixa taxa de crescimento dos líquens impossibilita a reposição rápida da biomassa ao meio ambiente, o que pode levar ao desequilíbrio ecológico ou até a extinção da espécie (LEGAZ et al., 2008). Assim, tem-se buscado alternativas de produzir metabólitos de interesse em larga escala usando quantidades mínimas de biomassa, como a utilização de culturas axênicas, ou seja, culturas livres de qualquer organismo vivo.

Porém, os líquens só produzem quantidades significativas de substâncias em condições fisiológicas permissivas e como consequência disso, a produção em culturas livres de qualquer organismo vivo pode ser muito diferente da condição natural, podendo induzir a biossíntese de novos compostos, que não ocorrem naturalmente ou podendo levar a inibição da síntese de determinados metabólitos (BOUSTIE & GRUBE, 2005), por exemplo, o líquen *Lecanora dispersa* contém o composto 2,7-dicloro-hexanona como o principal composto secundário, mas quando cultivado isolado, crescendo sem a alga, produziram também panarina e depsidonas relacionadas (LEUCKERT et al., 1990). Outro exemplo é a produção de atranorina em *Usnea hirta*, quando cultivada em meio LB modificado (KINOSHITA et al., 1993), uma vez que este composto não está presente em

todo o gênero *Usnea*. Além disso, Kon e colaboradores (1997) encontraram apenas quantidades muito baixas de ácido usnico e ácido salazínico, que são metabólitos típicos em culturas de *Usnea orientalis*, ao passo que estes produziram os dibenzofuranos, ácido hipostrepsílico e ácido isostrepsílico.

Além disso, seu lento crescimento, tanto na natureza como em culturas livres de qualquer organismo vivo, pode ser considerado um grande problema para produção de metabólitos. No entanto, as condições de cultura podem ser otimizadas para favorecer a síntese de compostos secundários de interesse (BOUSTIE & GRUBE, 2005). Neste caso, a síntese em laboratório pode ser uma alternativa a cultura axênica, uma vez que já é possível de ser realizada para alguns compostos de líquen (HUNECK et al., 1993; NICOLAOU & GRAY, 2004), além da modificação estrutural, visando melhorar alguma atividade, que foi iniciada com o ácido úsnico acoplado a várias amins e poliaminas usando síntese orgânica em fase sólida (BOUSTIE & GRUBE, 2005). Porém, ainda são poucos os trabalhos que reportam a síntese orgânica desses compostos e isso se deve a complexidade estrutural dos mesmos.

Por fim, uma outra alternativa para produção dos metabólitos secundários é o uso da imobilização celular ou enzimática. Na imobilização celular as células encontram-se aprisionadas em espaço definido, tendo sua atividade total ou parcialmente mantida para uso continuado (PEREIRA, 1998). É uma atraente alternativa ao uso de sistemas enzimáticos purificados, uma vez que a própria célula organiza e fornece as condições ideais de funcionamento, além das vantagens de reutilização e economia de tempo (YAMAMOTO, 2000)

5.5 Estudos de interação entre cocaína, seu metabólito cocaetilenol e HSA

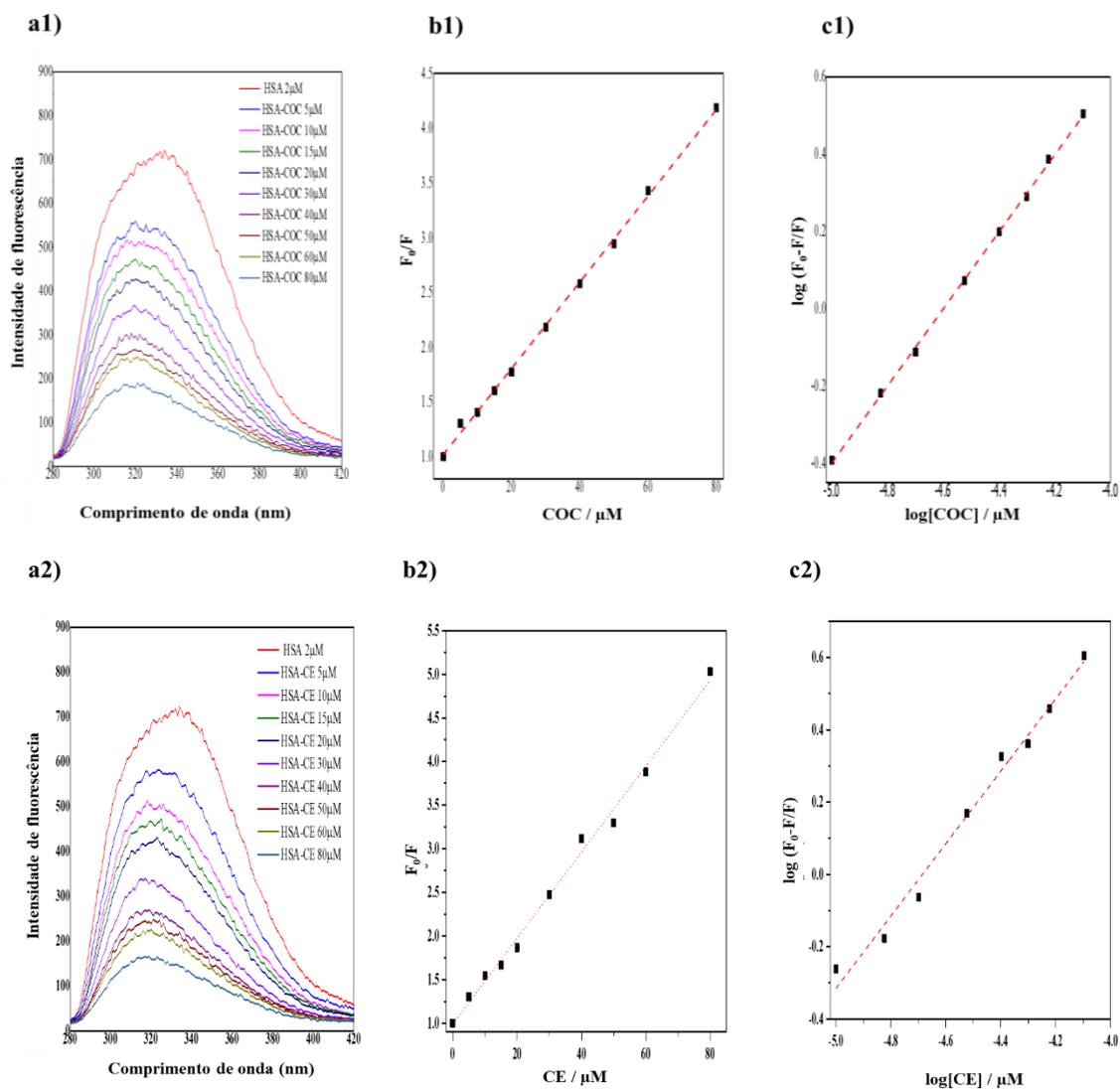
5.5.1. Avaliação dos parâmetros de ligação e termodinâmicos

Para avaliar o processo de interação entre HSA e os alcaloides COC ou CE, realizou-se uma titulação espectrofluorimétrica, onde foi monitorada a fluorescência intrínseca da HSA, proveniente dos resíduos de Trp e Tyr. Desta forma, a fluorescência da HSA foi monitorada em 340 nm, na ausência e na presença da COC e do CE (0-80µM). Como visto na Figura 21, conforme aumentava-se as concentrações dos ligantes, ocorreu redução gradual da intensidade de fluorescência. Este processo se deu em função da diminuição da concentração livre da proteína, indicando qualitativamente que os

compostos apresentam interação com a HSA por meio da formação do complexo supramolecular não fluorescente (YAN & MARRIOT, 2003). Foi observado também que a adição de concentrações crescentes dos compostos, levou ao deslocamento do comprimento de onda de máxima fluorescência para menores comprimentos de onda (deslocamento para o azul) de 340 para 320 nm, conforme ilustrado na Figura 21(a1) para a COC e de 340 para 310 nm conforme a Figura 21(a2) para o CE. Isso pode estar relacionado a mudanças conformacionais induzidas pela interação com os alcaloides (ZHANG, et al., 2011). Além disso, o deslocamento para menores comprimentos de onda indica também que houve uma diminuição da polaridade do microambiente dos resíduos de Trp (ALBANI, 2007).

No entanto, somente pela avaliação do perfil dos espectros de emissão de fluorescência da titulação da HSA com os ligantes avaliados não se pode indicar o mecanismo preferencial de *quenching*, o qual é definido como sendo a redução do rendimento quântico da fluorescência de um fluoróforo induzido por uma variedade de interações moleculares com o *quencher* (ligante), como rearranjo molecular, transferência de energia, entre outras (MOLINA-BOLÍVAR et al., 2014; WANI et al., 2017). Esse mecanismo de supressão da fluorescência depende da colisão entre a molécula da proteína excitada e a espécie supressora (Q) e da constante de velocidade de supressão bimolecular (K_q) (MOREIRA et al., 2015). Assim, para determinar o mecanismo de supressão, analisou-se os valores constante K_q em diferentes temperaturas, calculados a partir da equação 3, os quais estão expostos na Tabela 8.

Figura 21- Titulação espectrofluorimétrica da HSA (1,0 μM) em pH 7,4 (30 $^{\circ}\text{C}$) com COC e CE: a1) perfil espectral para a COC; b1) perfil linear do gráfico de K_{SV} referente a COC; c1) Constante de ligação para a COC; a2) Titulação espectrofluorimétrica da HSA com CE; b2) perfil linear do gráfico de K_{SV} para o CE; c2) Constante de ligação para o CE.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Tabela 8- Parâmetros de ligação e termodinâmicos referentes a interação entre a COC, seu metabólito o CE e a HSA.

Compostos	T (°C)	Parâmetros de ligação				Parâmetros termodinâmicos			
		K_{sv} ($\times 10^4 M^{-1}$)	r	Kq ($\times 10^{12} M^{-1} s^{-1}$)	K_b ($\times 10^4 M^{-1}$)	r	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
COC	23	3,94 ± 0,05	0,9992	7,88	3,77 ± 0,05	0,9997	-25,85	-64,78	-131,52
	30	4,09 ± 0,09	1,0000	8,18	1,86 ± 0,10	0,9981	-24,93		
	37	4,46 ± 0,01	1,0000	8,92	1,15 ± 0,15	0,9950	-24,01		
CE	23	4,78 ± 0,16	0,9952	9,56	2,92 ± 0,08	0,9499	-25,28	57,10	278,32
	30	4,93 ± 0,13	0,9971	9,86	4,85 ± 0,11	0,9935	-27,23		
	37	5,92 ± 0,14	0,9975	11,8	8,33 ± 0,21	0,9940	-29,18		

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

De acordo com Shu e colaboradores (2015), valores de K_q menores que $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, indicam a ocorrência preferencial do mecanismo de *quenching* dinâmico, enquanto que valores de K_q superiores, é indicativo de mecanismo de *quenching* estático. Os valores de K_q obtidos no estudo de *quenching* (Tabela 8) variaram de 7,88 a $8,92 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, para sistema contendo COC e de 9,56 a $11,8 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o sistema contendo CE, indicando que o processo de interação entre ambos os ligantes e a HSA ocorreu por meio do mecanismo de *quenching* estático com formação de complexo supramolecular no estado fundamental.

Os valores da constante de interação (K_b) variaram de 1,15 a $3,77 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para COC e de 2,92 a $8,30 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para CE (Tabela 8). Esses valores de constante estão próximos aos obtidos por Bailey (1995) que avaliou a afinidade desses compostos com a HSA empregando equilíbrio de diálise, sendo obtido uma constante de ligação de $4,47 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para COC e $4,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para CE. Por outro lado, Parker e colaboradores (1995) avaliaram os fatores que poderiam afetar a ligação entre cocaína e proteínas séricas empregando ultrafiltração. Nesse estudo obteve-se uma constante de ligação para a COC de $2,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ o que pode ser explicado pelo uso de uma técnica baseada em princípios diferentes da fluorescência molecular. Vale ressaltar que não foi calculada a constante para o CE.

Analisando o valor da constante de interação a 37°C (próximo a temperatura corpórea) observa-se que as constantes de interação foram maiores para o sistema HSA-CE. Este fato pode estar relacionado com a substituição do grupo etil no lugar do metil éster. Essa pequena mudança já é o suficiente para mudar as propriedades farmacológica de uma molécula, como já reportado por Barreiro e colaboradores (2011), podendo mudar também as principais forças atuantes no processo de interação com a HSA, o número de interações não covalentes que podem ocorrer e, conseqüentemente, a magnitude dessa interação.

Vale destacar que os compostos bioativos podem se ligar a várias proteínas do sangue, como a HSA, a $\alpha 1$ -ácida glicoproteína, as lipoproteínas e as imunoglobulinas (SUKBUNTHERNG et al., 1996). No caso específico da cocaína e do cocaetileno, tem sido relatado duas principais proteínas: $\alpha 1$ -ácida glicoproteína, que compreende de 1-3% (COLOMBO et al., 2006) das proteínas plasmáticas e a albumina, que compreende de 50-60% (KRATZ & ELSADEK, 2012). Bailey (1995) avaliou a ligação da COC e do CE diretamente no soro humano, por equilíbrio de diálise, não sendo obtidas informações de

como este processo de interação ocorre, apenas o grau de afinidade. Assim a partir desse estudo, foi sugerido que a COC se ligava com alta afinidade a α 1-ácida glicoproteína ($K_b = 2,56 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) e com baixa afinidade a albumina ($K_a = 4,47 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). Para o CE apresentava alta afinidade tanto para a α 1-ácida glicoproteína ($K_b = 5,21 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) como para albumina ($K_b = 4,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), corroborando com os resultados do presente trabalho. Mesmo a COC tendo baixa afinidade pela HSA, essa proteína está em grande concentração no plasma, assim ela estará envolvida significativamente no processo de interação, além disso a diferença entre as constantes de ligação na presença de ambas as proteínas não foi expressiva para o CE. Adicionalmente, foi verificado que a cocaína e o cocaetileno se ligam com alta afinidade a albumina do leite materno humano e com baixa afinidade a fração lipídica (BAILEY, 1998).

A avaliação das forças intermoleculares preferenciais no processo de interação foi realizada a partir dos cálculos dos parâmetros termodinâmicos para os complexos HSA-COC e HSA-CE a partir da linearização da equação de van't Hoff (equação 5) cujos resultados estão listados na Tabela 8. Uma vez que se obteve valores negativos de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) para COC ($\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$) é possível deduzir que as forças de van der Waals e ligações de hidrogênio são as interações preferenciais (não exclusivas) que estabilizam o complexo. O valor negativo de ΔS para esse sistema indica que o mesmo está mais organizado, explicando a existência das ligações de hidrogênio e de van der Waals, de forma que o aumento da temperatura desfavorece o processo de interação (K_b diminui com o aumento da temperatura), uma vez que o aumento da temperatura tende a torna o sistema mais desorganizado. Para o complexo HSA-CE se obteve valores positivos para variação de entalpia e entropia ($\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$), o que implica que interações hidrofóbicas estabilizam o complexo (ALANAZI & ABDELHAMEED, 2016). O valor positivo de ΔS , indica que esse sistema está mais desorganizado, o que é devido ao deslocamento das moléculas de água (solvente) da estrutura da proteína para fora da biomolécula, quando as interações hidrofóbicas são formadas com o ligante. Assim, o aumento da temperatura tende a favorecer esse processo de interação (K_b aumenta com o aumento da temperatura (BARAKAT & PATRA, 2013).

Sabendo que a HSA é uma proteína com regiões hidrofóbicas, que transporta ácidos graxos, é esperado que ela tenha maior afinidade por espécies mais hidrofóbicas (CARDAMONE & PURIT, 1992). Assim, como para o complexo HSA-CE, as interações hidrofóbicas são as principais forças que estabilizam essa interação, desta forma, podemos inferir que a inserção do grupo etil no lugar metil éster (COC) faz com que o

CE tenha um caráter mais hidrofóbico que a COC. Para comprovar isso, foi necessário avaliar o coeficiente de partição na forma neutra ou protonada, uma vez que este parâmetro é uma medida quantitativa da lipofilicidade de compostos orgânicos (MEYLAN, 1994). Considerando que em condição de pH fisiológico estariam presentes no meio as espécies neutras e protonadas de COC e CE ($pK_a = 8,6$) calculou-se o parâmetro de lipofilicidade para todos os sistemas. Assim, o valor de $\log P$ para COC é 1,82 e para CE é 2,15, já para as formas protonadas, tem-se $C\log P = 3,03$ para COC e 3,57 para CE, indicando em ambos os casos que houve um aumento na lipofilicidade para o CE causado pela adição da metila, da ordem de 18%. Quanto maior o valor de $\log P$ (ou $C\log P$), mais hidrofóbico é o composto, assim, verifica-se que o CE realmente tem um maior caráter hidrofóbico, quando comparado a COC (MEYLAN, 1994).

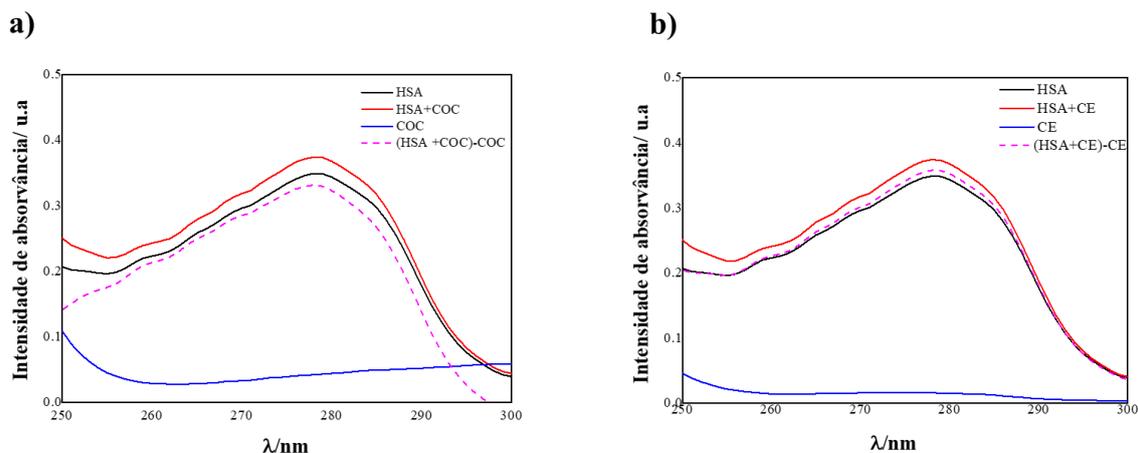
Avaliando os valores da energia livre de Gibbs, também é possível observar que o complexo HSA-CE tem sua formação mais favorecida quando comparado ao complexo HSA-COC, pois os valores de ΔG foram mais negativos no sistema contendo o CE.

5.6 Avaliação da interação entre os alcaloides COC e CE com HSA por UV-vis

A espectroscopia por UV-vis foi empregada para confirmar a formação do complexo HSA-ligante por meio do monitoramento de mudanças estruturais da proteína, e também para inferir sobre o mecanismo de *quenching* que está envolvido no processo de interação (HE et al., 2016). Os espectros de absorção molecular do sistema HSA-COC são mostrados na Figura 22(a), enquanto que HSA-CE na Figura 22(b).

A partir dos espectros da Figura 22, pôde-se observar que a HSA apresenta uma banda máximo de absorção em 280 nm, característico principalmente devido aos resíduos de aminoácidos aromáticos Tir e Trp responsáveis pelas transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ (YU et al., 2014). Ao se adicionar COC a solução de HSA (HSA+COC), ocorreu efeito hipercrômico. Além disso, o espectro resultante da subtração dos espectros do sistema HSA+COC pelo ligante (COC) resultou em um espectro não sobreponível ao espectro da HSA, indicando que não houve efeito aditivo da lei de Beer, logo confirmando a formação do complexo supramolecular HSA-COC (KHAN et al., 2002; CHI, et al., 2010). Para o sistema contendo CE também se observou que a adição do ligante CE causou o efeito hipercrômico. Além disso, o espectro de absorção resultante da subtração entre o espectro do complexo supramolecular (HSA + CE) e o do CE livre não é sobreponível ao espectro da HSA livre, confirmando que ocorre o processo de interação (SAEIDIFAR et al., 2015).

Figura 22- Espectros de absorção molecular no UV-vis para os sistemas contendo HSA com a) COC e b) CE. Condições: HSA (2 μ M), COC e CE (2 μ M), em tampão Tris 10 Mm, pH 7,40 e 30°C.



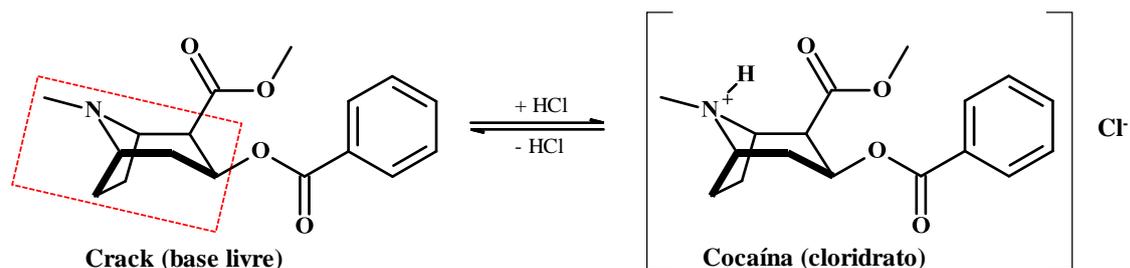
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Esse estudo pode ser empregado também para inferir sobre o mecanismo preferencial de *quenching*. Dentro desse contexto, Tian e col (2010) afirmaram que quando o mecanismo de interação macromolécula-ligante ocorre por *quenching* dinâmico, o espectro de absorção por UV-vis da proteína não é alterado na presença do ligante, uma vez que este é causado em grande parte por colisões entre o fluoróforo no estado excitado (presente na proteína) e o ligante (*quencher*). Entretanto, quando a interação entre a proteína e o ligante ocorre preferencialmente por *quenching* estático, ocorrem alterações na estrutura da proteína na presença do ligante, pois, mudanças associadas à formação dos complexos supramoleculares no estado fundamental são observadas no espectro de absorção por UV-vis. Como foram observadas mudanças no espectro de absorção da HSA na presença de ambos os ligantes (COC e CE), o mecanismo de *quenching* preferencialmente é estático, corroborando com os resultados obtidos por fluorescência molecular.

5.7 Influência da força iônica no processo de interação entre COC e CE com HSA

As principais formas de consumo da cocaína são na forma de sal, o cloridrato de cocaína, ou base livre, o crack. A Figura 23 mostra a fórmula estrutural da cocaína na forma de cloridrato e base livre, destacando-se o núcleo tropano.

Figura 23- Fórmula estrutural da cocaína na forma de base livre e cloridrato.

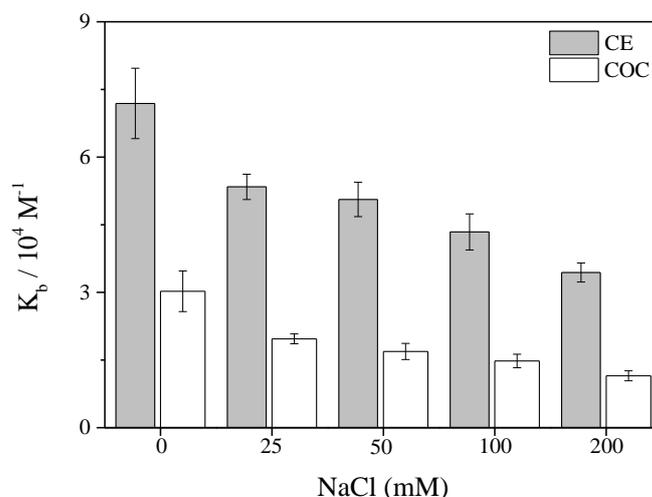


Fonte: Adaptado de DE SOUZA, 2014.

Uma vez que o pK_a da cocaína é 8,61 (SUKBUNTHERNG et al., 1996) em condição de pH fisiológico ($\text{pH} = 7,4$) cerca de 94% do nitrogênio tropanico estará com carga positiva. Além disso, em condições normais fisiológicas a HSA estará com carga negativa, uma vez que seu ponto isoeletrônico (pI) é 4,7 (VLASOVA & SALETSKY, 2009). Dessa forma, foi necessário avaliar como a concentração salina do meio poderia influenciar no processo de interação, para esclarecer a natureza das forças envolvidas e racionalizar a possibilidade de um componente eletrostático, uma vez que a força iônica afeta diretamente sistema com cargas (OTZEN, 2002).

O processo de interação entre HSA com COC ou CE foi avaliado na ausência e na presença de várias concentrações de NaCl (0-200 mM). A partir dos resultados (Figura 24) é possível observar que houve redução do K_b à medida que a concentração de NaCl aumentava para formação de ambos os complexos (HSA-COC e HSA-CE) desfavorecendo o processo de interação para estes sistemas, indicando componente eletrostático nas forças de interação com a proteína.

Figura 24- Avaliação do efeito do NaCl (0-200 mM) no processo de interação para os sistemas HSA-COC e HSA-CE. Condições: tampão Tris 10 mM, pH 7,4 a 30°C.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

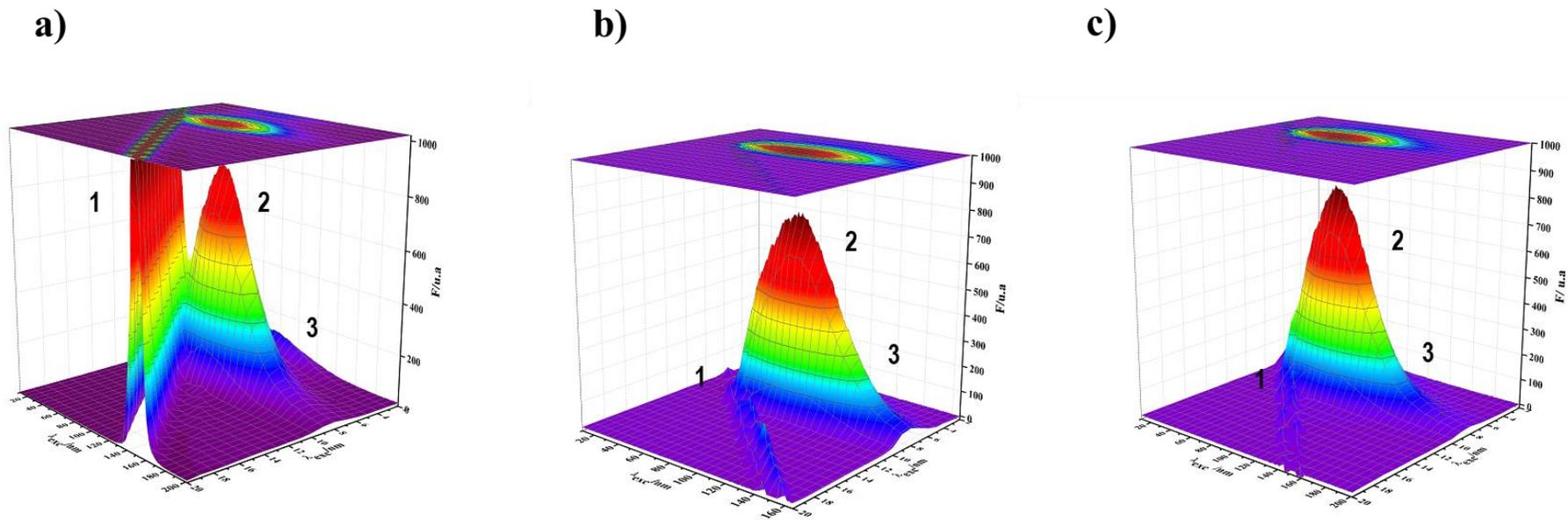
Este resultado está relacionado com aumento da força iônica, e por conseguinte redução das atividades das espécies, devido a formação de uma esfera de interação entre os íons Na^+ e Cl^- com a HSA (carga preferencial negativa) e alcaloides (carga preferencial positiva), levando a uma maior separação entre as cargas, o que dificulta o processo de interação. Contudo, ressalta-se que outras forças estão envolvidas no processo as quais foram determinadas baseadas nos parâmetros termodinâmicos.

5.8 Avaliação da conformação da HSA

5.8.1 Avaliação do processo de interação por fluorescência 3D

Alterações conformacionais na estrutura da HSA ao interagir com a COC ou CE foram avaliadas por fluorescência tridimensional (3D) por meio de mudanças características nas bandas de emissão relacionados à cadeia polipeptídica e aos resíduos de Trp e Tir (CHENG, LIU, JIANG, 2013). A Figura 25(a) apresenta o espectro de fluorescência em 3D para a HSA, onde se destacam três picos de emissão. O primeiro é referente ao espalhamento Rayleigh em que o comprimento de excitação é igual ao de emissão ($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$), associado ao espalhamento inelástico de radiação. Os resíduos de Trp e Tir são responsáveis pela banda de emissão do pico 2 ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 285 / 340 \text{ nm}$). O pico 3 é referente a cadeia polipeptídica da proteína ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 238 / 335 \text{ nm}$) que apresenta transição $\pi \rightarrow \pi^*$ devido a ligação RC-ONHR (carbonila da ligação peptídica) característico da estrutura secundária da proteína (CHENG, LIU, JIANG, 2013; ARIGA et al., 2015). A compilação destes resultados está disposta na Tabela 9.

Figura 25- Espectros de fluorescência 3D para os sistemas contendo a) HSA; b) HSA-COC; c) HSA-CE. Condições: HSA (2 μ M), COC e CE (40 μ M), em tampão Tris 10 mM a pH 7,40 e 30°C.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Tabela 9-Parâmetros de fluorescência tridimensional para HSA livre (pH 7,4) ou na presença de compostos COC e CE. Proteína e ligantes foram usados em 2,0 e 40 μ M, respectivamente, sendo o pico 1 referente ao espalhamento da radiação (scattering Rayleigh); pico 2 referente à emissão dos resíduos Trp e Tir e o pico 3 referente à emissão da cadeia polipeptídica da estrutura da HSA.

Picos	HSA			HSA +COC			HSA+ CE		
	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes ¹ $\Delta\lambda$ (nm)	F (a. u.)	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F (a. u.)	Posição ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$)	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	F (a. u.)
1	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	>1000	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	>1000	$\lambda_{ex} = \lambda_{em}$	0	>1000
2	285/340	55	870 (100%)	285/340	55	774 (89%)	285/340	55	805 (92%)
3	238/335	97	145 (100%)	238/335	97	37 (26%)	238/335	97	43 (30%)

¹ Deslocamento Stokes ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$). ² Números entre parênteses representam a porcentagem relativa do sinal de fluorescência. Valores menores indicam maior variação em relação ao controle (HSA livre).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

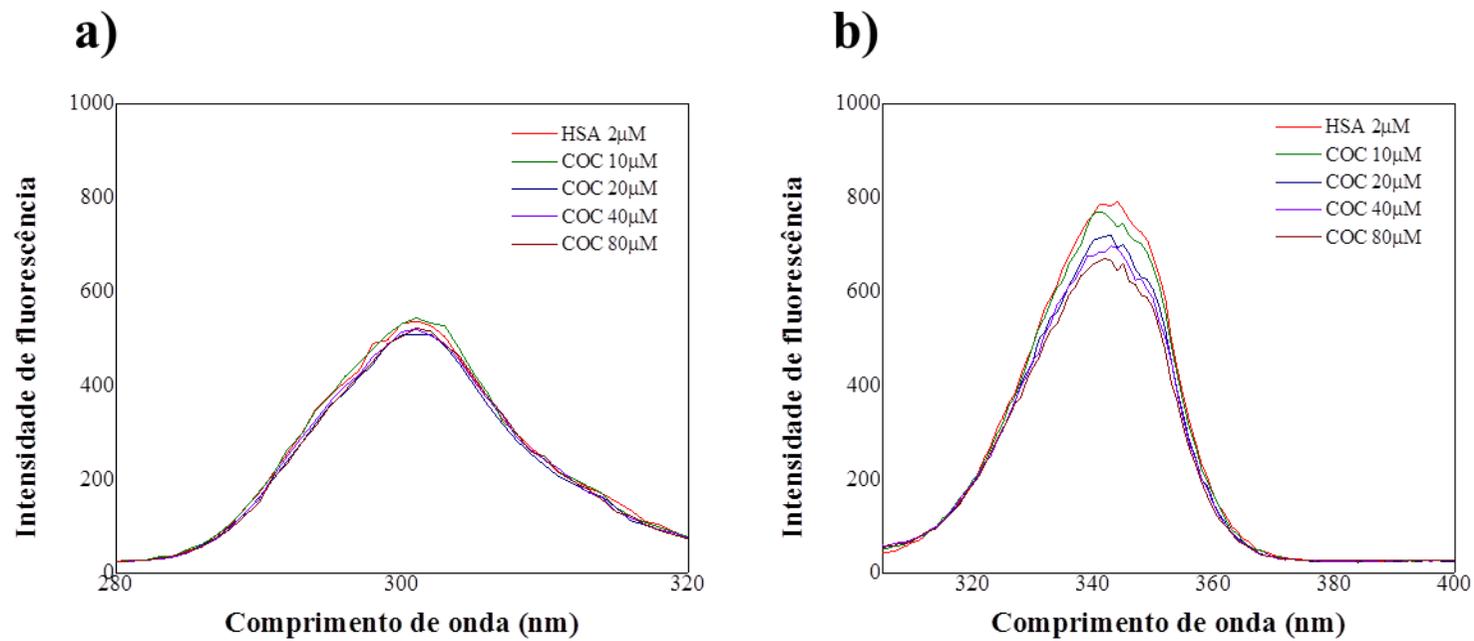
De acordo com os resultados da Tabela 9 observou-se que os picos 2 e 3, reduziram suas intensidades em 11 e 74% para a COC e 8 e 70% para o CE (Figura 25(b) e 25(c)). Estes resultados indicam que houve mudanças na estrutura secundária e terciária da HSA (GUO et al., 2014; ZHANG et al., 2008). causadas pela ligação COC-HSA e CE-HSA, comparando-se com a estrutura nativa da HSA.

5.8.2 Fluorescência sincronizada

Como já mencionado, a técnica de fluorescência sincronizada é usada para monitorar separadamente os resíduos de Trp e Tir presentes na HSA, e verificar possíveis alterações no microambiente destes aminoácidos na presença de diferentes concentrações dos ligantes (COC e CE). Os estudos foram realizados mantendo-se constante um determinado intervalo de comprimento de onda entre os monocromadores de excitação e emissão ($\Delta\lambda$), empregando-se 15 e 60 nm, os quais são variações características para avaliar separadamente os resíduos de Tir e Trp, respectivamente (CHAKRABORTY & LEDWANI, 2016).

Os resultados para este estudo estão apresentados nas Figura 26 e Tabela 10. Na Figura 26, observou-se que ao aumentar as concentrações de COC e de CE, houve uma redução mais significativa na intensidade de fluorescência dos resíduos de Trp, quando comparado aos resíduos de Tir, para ambos os ligantes, sendo observado também um deslocamento no máximo comprimento de onda para menores valores. Um aumento na polaridade do microambiente está relacionada à variação positiva no $\lambda_{\text{máx}}$ (maiores comprimentos de onda), enquanto uma redução da polaridade está associada à variação negativa no $\lambda_{\text{máx}}$ (menores comprimentos de onda). Estes fenômenos permitem descrever mudanças na estrutura da proteína nativa (TAN et al., 2012).

Figura 26- Espectros de fluorescência sincronizado da HSA (2,0 μM) após a adição de concentrações crescentes de COC em pH 7,4, monitorando (a) $\Delta\lambda = 15$ nm (resíduos Tir) e (b) $\Delta\lambda = 60$ nm (resíduos Trp).



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Tabela 10- Parâmetros relacionados aos estudos de fluorescência sincronizada para os resíduos Trp e Tyr quanto a interação da HSA com COC e CE.

Composto	$\Delta\lambda$ (nm)	Stern-Volmer		$\Delta\lambda_{\max}$ (nm)
		K_{SV} ($10^4 M^{-1}$)	r	
COC	15	$0,85 \pm 0,06$	0,80004	0
	60	$2,37 \pm 0,63$	0,90804	0
CE	15	$0,56 \pm 0,05$	0,99574	0
	60	$2,98 \pm 0,94$	0,97282	0

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A partir dos valores de K_{SV} calculados (Tabela 10) é observado que a interação HSA-CE afeta mais os resíduos de triptofano do que a interação HSA-COC, uma vez que o valor de K_{SV} quando foi aplicando um $\Delta\lambda = 60$ nm foi maior para o CE, indicando assim, que estes resíduos devem estar mais próximos ao sítio de ligação do complexo entre a proteína e CE (LI et al., 2016; STEIN et al., 1991).

5.9 Sítios de ligação na HSA

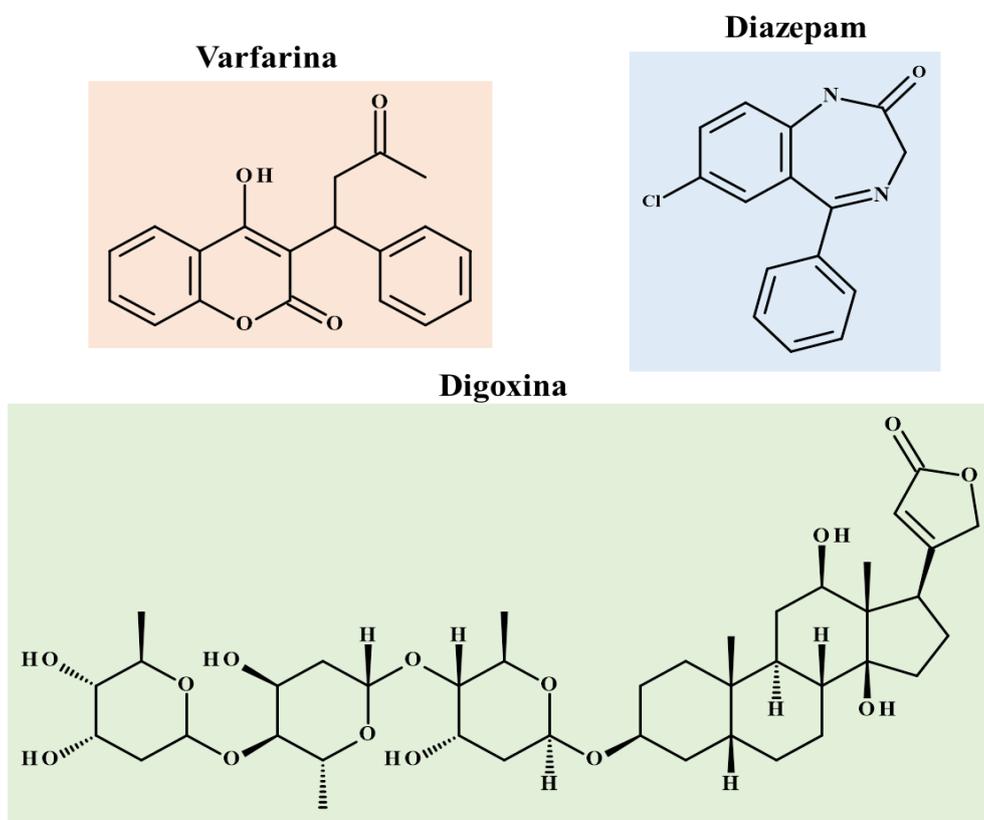
5.9.1 Avaliação do sítio preferencial de ligação entre COC e CE com HSA

HSA é uma proteína globular composta por três domínios homólogos (I, II e III). Cada domínio contém dois subdomínios (A e B). As principais regiões dos sítios de ligação de moléculas pequenas na albumina estão localizadas em cavidades hidrofóbicas em subdomínios II e III, com constantes de ligação na faixa de 10^4 – $10^6 M^{-1}$. Muitos ligantes interagem preferencialmente à albumina sérica, por exemplo, varfarina e fenilbutazona para o sítio I (subdomínio IIA), ácido flufenâmico (FA), ibuprofeno e diazepam para o sítio II (subdomínio IIIA), e a digitoxina para o sítio III (provavelmente subdomínio IIIB) (ZHANG et al., 2013).

A avaliação do sítio de ligação preferencial para a COC e CE explorou-se estudos de competição com marcadores de posição, que são compostos que se ligam seletivamente a um local ou região conhecida da proteína. Assim, por meio do monitoramento das alterações da fluorescência da proteína após a ligação com moléculas pequenas, na presença/ausência dos marcadores, foram obtidas informações acerca do local de ligação. Os marcadores usados foram: varfarina (VAR, sítio I), diazepam (DIA,

sítio II) e a digoxina (DIG, sítio III), todos numa relação fixa de 1:1 em relação a concentração da HSA (Figura 27).

Figura 27- Estrutura molecular dos marcadores de sítio de ligação da HSA.

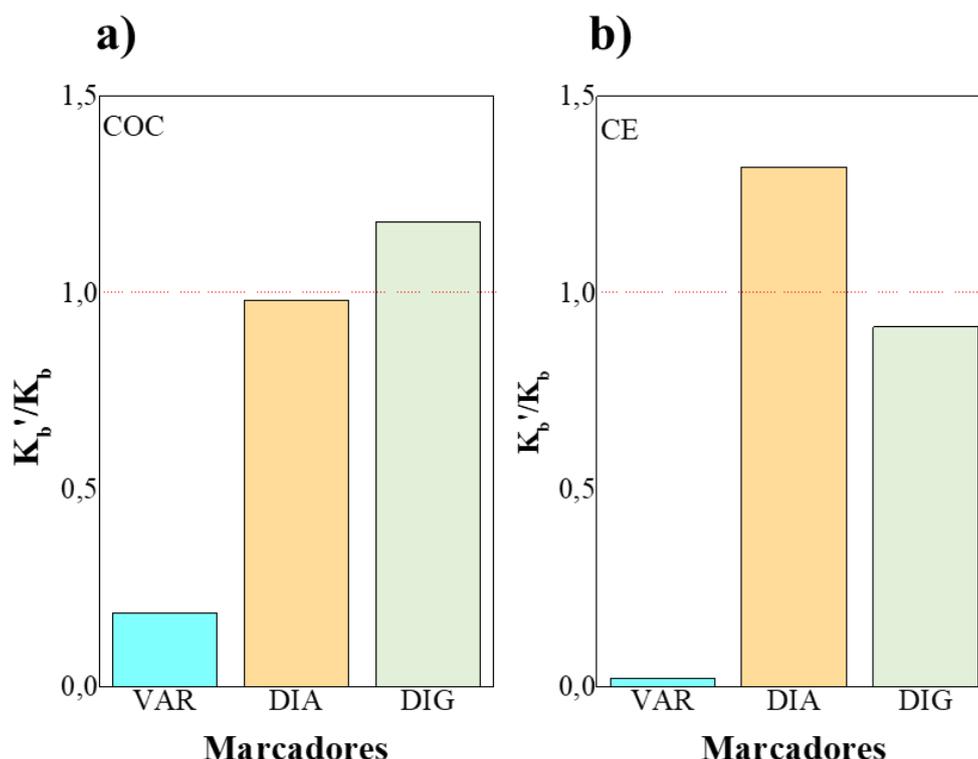


Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Na presença destes marcadores há uma competição pelo sítio de ligação na estrutura da proteína, o que leva a um desfavorecimento na interação entre HSA-ligante, indicando que o ligante está interagindo na mesma região que o marcador. O parâmetro usado para avaliar este processo é a razão das constantes na presença (K_b') e na ausência (K_b) destes marcadores. Caso esta razão seja menor que a unidade, indica que existe competição para o sítio de ligação.

O gráfico da Figura 28 mostra que para tanto varfarina como o diazepam deslocaram a molécula COC, porém a varfarina o fez de forma mais significativa. Já, no caso do CE, o mesmo só foi deslocado na presença da varfarina, sugerindo que sítio de ligação tanto da COC como do CE na HSA é o sítio I (IIA subdomínio).

Figura 28- Avaliação do sítio de ligação na HSA (2 μM) a partir da razão dos valores de K_b na ausência e presença dos marcadores (2 μM) varfarina, diazepam e digoxina para os ligantes (a) COC (b) CE.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019

O sítio I é uma região grande, flexível e compreende todas as seis hélices do subdomínio e resíduos adicionais dos subdomínios IB, IIB e IIIA, além de possuir uma maior região apolar, com uma menor região polar composta pelos resíduos Tir150, His242, Arg257 (ZSILA et al., 2011). Moléculas que se ligam a esse sítio geralmente possuem anéis aromáticos heterocíclicos planares, são volumosas, em grande parte não polar e com carga negativa deslocalizada. Outros fármacos que também se ligam no sítio I são: ácido salicílico (SJOHOLM et al., 1979), quercetina (ZSILA, BIKADI, SIMONYI, 2003), piroxican (BREE et al., 1990) e nimesulida (BREE et al., 1993).

5.9.2 Avaliação dos sítios hidrofóbicos e índice de hidrofobicidade (PSH)

O ácido 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) é uma sonda sensível à polaridade. Em água, possui baixa fluorescência intrínseca, mas a intensidade aumenta em ambientes

hidrofóbicos e por isso é usada para avaliar se o sítio preferencial de ligação ocorre em regiões hidrofóbicas da HSA (RANJBAR et al., 2013).

Para isso, avaliou-se o efeito da adição de diferentes concentrações de COC e CE no sistema HSA-ANS, avaliando-se possíveis alterações na intensidade de fluorescência do sistema, uma vez que se o sítio de ligação da COC ou CE na proteína forem próximos ou similar ao ANS, ocorrerá competição. E, conseqüentemente o ligante irá deslocar o ANS dos sítios hidrofóbicos, correndo dessa maneira, diminuição na intensidade de fluorescência do sistema HSA-ANS. Análises cristalográficas revelaram que as interações hidrofóbicas e eletrostáticas desempenham um papel importante no controle da afinidade em relação à ligação aos sítios I e II: para o sítio I, as principais interações são as hidrofóbicas, enquanto para o sítio II, a combinação de hidrofóbica, ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas (RANJBAR, et al., 2013)

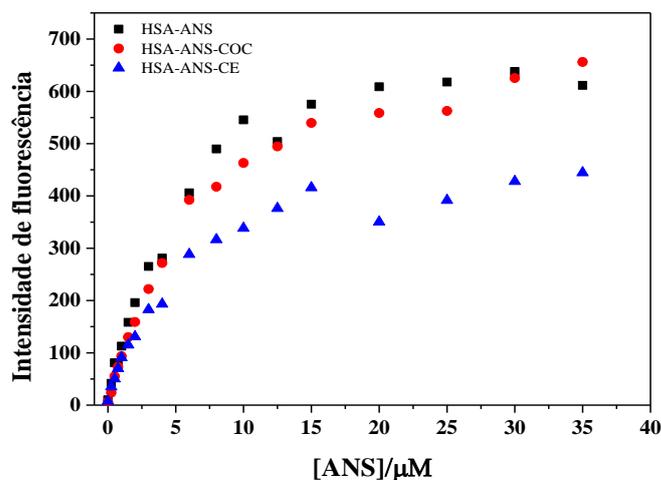
O parâmetro usado para avaliar a capacidade dos ligantes COC e CE em deslocar o ANS foi a constante de Stern-Volmer (K_{SV}), de forma que, quanto maior a constante de Stern-Volmer, maior a capacidade do ligante substituir o ANS da estrutura da HSA. Avaliando-se os valores de K_{SV} , percebe-se que essa constante é maior no sistema contendo a CE ($3,84 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) quando comparado ao sistema contendo COC ($2,73 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) indicando que esse ligante possivelmente desloca o ANS da região de ligação (GUAN; ZHANG; WANG, 2014). Este resultado confirmou as características mais hidrofóbicas da CE.

5.10 Índice de hidrofobicidade

Como já mencionado, o ANS é usado como sonda para avaliar mudanças na hidrofobicidade da superfície da proteína, a qual está associada a alterações conformacionais e na carga superficial da proteína, resultante do processo de interação proteína-ligante (CHI & LIU, 2011).

As propriedades de ligação do ANS à HSA podem ser investigadas mensurando a constante de dissociação aparente de fluorescência do complexo HSA-ANS (K_d) e pela intensidade de fluorescência máxima ($F_{m\acute{a}x}$) na concentração de ANS suficiente para saturação dos sítios da HSA. Este ensaio baseia-se na titulação da HSA com incrementos de ANS (0-50 μM) em sistemas contendo a proteína na presença e ausência dos ligantes (Figura 29).

Figura 29- Perfil da ligação do ANS (0- 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a HSA (2 μM) na ausência presença dos ligantes COC e CE. Condições: pH 7,4 e 30°C.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Para tanto, se utilizou a relação linear $F = C_{\text{ANS}}B$ que indica a proporcionalidade entre o sinal de fluorescência (F) e a concentração de ANS (C_{ANS} , 0 a 1,5 μM), sendo B o coeficiente de proporcionalidade. Para obtenção da quantidade de ANS ligado a HSA foi empregado a relação $[\text{ANS}_{\text{ligado}}] = F/B$. A quantidade de ANS livre foi obtida a partir de $[\text{ANS}_{\text{livre}}] = [\text{ANS}_{\text{total}}] - [\text{ANS}_{\text{ligado}}]$. O valor de K_d foi calculado por meio coeficiente angular da relação F vs $F/[\text{ANS}]_{\text{livre}}$. O índice de hidrofobicidade na superfície da proteína (PSH) para os diferentes sistemas avaliados e parâmetros relacionados são apresentados na Tabela 11, para tanto, foi aplicado a equação 10.

Tabela 11- Parâmetros relacionados ao índice de hidrofobicidade da superfície da proteína (PSH) para os sistemas HSA+ANS na ausência e na presença dos ligantes COC e CE.

Condições	Parâmetros		
	K_d (μM)	$\frac{F_{\text{max}}}{[\text{HSA}]}$	PSH
HSA-ANS	1,08	319,04	295,41
HSA-ANS + COC	1,21	172,10	147,20
HSA-ANS + CE	2,23	222,30	99,70

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

De acordo com os resultados da Tabela 11 percebe-se que a presença da COC leva ao aumento da constante de dissociação (K_d) de 12% em relação a proteína livre, e na presença de CE tem-se um aumento de 106%. Este aumento nos valores de K_d implica que o ANS fica menos ligado a superfície da HSA (RANJBAR et al., 2013). Isto pode ser refletido pela diminuição dos valores de PSH em 50 e 67%, respectivamente.

Provavelmente como o CE possui maior K_b e caráter lipofílico e com isso, maior afinidade para interação com a proteína e interações do tipo hidrofóbica mais efetivas do que para a COC, é de se esperar que consiga deslocar o ANS de forma mais efetiva.

5.11 Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)

A transferência de energia ressonante de Förster (FRET) é frequentemente empregada para calcular a distância no local de ligação entre a espécie doadora de energia (resíduo de Trp), e a molécula aceptora (ligante). Este processo entre o doador e receptor depende dos seguintes fatores: (i) orientação relativa dos dipolos dos doadores e receptores, (ii) grau de sobreposição do espectro de fluorescência do doador com o espectro de absorção do receptor, e (iii) da distância entre o doador e o receptor (r_0) (BARAKAT & PATRA, 2013). A distância entre o doador e o receptor deve ser menor que 8-10 nm para que ocorra transferência de energia diferente de zero.

Para tanto se avaliou os seguintes parâmetros: área de sobreposição (J , equação (9)) dos espectros de fluorescência da HSA livre e de absorção molecular da COC e do CE; a eficiência de transferência de energia, a distância crítica de Förster (R_0 , equação (8)) em que 50% da energia de excitação é transferida para o acceptor e, a distância entre o ligante e o triptofano da proteína (r_0 , equação (7)) Os resultados estão apresentados na Tabela 12 e Figura 30.

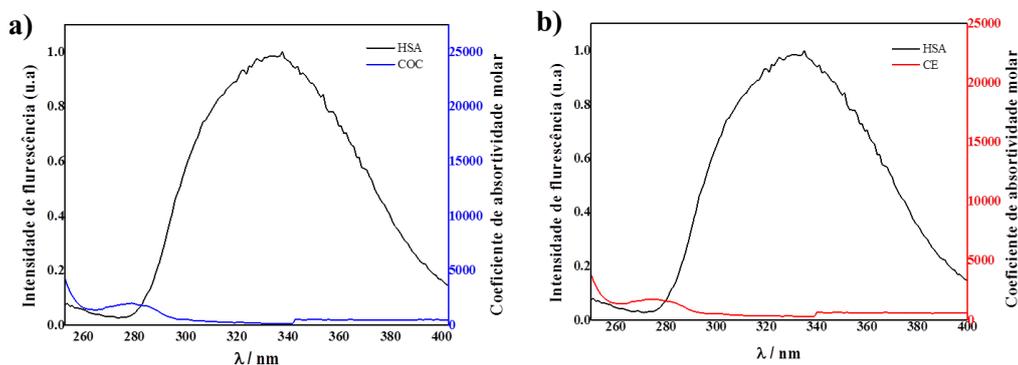
Tabela 12- Parâmetros calculados relacionados ao processo de FRET quanto a interação entre HSA-COC e HSA-CE.

Sistema	$J (10^{-16} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1})$	E (%)	R_0 (nm)	r_0 (nm)
COC	5,59	25,0	1,50	2,77
CE	6,70	22,0	1,89	2,43

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 12) verificou-se que a energia transferida (E) variou de 22,0 a 25,0%, indicando que houve transferência de energia menor que 50%, o que implica que $R_0 < r_0$ (TAN et al., 2012). Os valores das distâncias r_0 para COC e CE variaram de 2,43 a 2,77 nm. Assim, a distância crítica r_0 entre CE e o resíduo de triptofano da HSA foi inferior a 8-10 nm. Estes resultados indicaram que houve transferência de energia não-radioativa (SHU et al., 2015).

Figura 30- Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da HSA (10 μM) que atua como doador (D) de radiação e absorção molecular da COC (20 μM) (a) e do CE (20 μM) (b) que atuam como aceptores em pH 7,4.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019

Por fim, os valores de r_0 obtidos para a COC e CE foram próximos dos valores obtidos para outros alcaloides reportados na literatura, como mostrado na Tabela 13, diferindo de forma mais significativa dos valores para sanguarina, barberina e jatrorrizina. Com relação aos valores das constantes de ligação, observou-se ser da mesma ordem de grandeza dos compostos sanguarina, jatrorrizina e hermane, sendo observado também que o sítio I é o preferencial para a maioria dos alcaloides, porém ainda existem divergências quanto ao sítio preferencial da jatrorrizina.

Tabela 13- Parâmetros de ligação e FRET de alcaloides para fins de comparação.

Composto	Proteína	Condições experimentais	Parâmetros de ligação (25°C)		FRET				Referência
			K _b (M ⁻¹)	Sítio	J (10 ⁻¹⁴ cm ³ M ⁻¹)	E (%)	R _o (nm)	r _o (nm)	
Berberina	HSA (10 µM)	Tris 50 mM, pH 7,4	6,64×10 ²	I	3,13	31,6	2,71	3,10	HU; LIU; XIAO, 2009
Sanguarina	BSA (1 µM)	Citrato-fosfato 10 mM, pH 6,4	37,8×10 ⁴	I	2,13	27	2,85	3,37	HOSSAIN et al., 2011
Jatrorrizina	HSA (3 µM)	Tris 200 mM, pH 7,4	7,28×10 ⁴	I	-	-	-	-	LI et al., 2005
Jatrorrizina	BSA (10 µM)	Tris 50 mM, pH 7,4	4,68×10 ²	II	4,37	34	3,20	3,60	MI et al., 2013
Jatrorrizina	HSA (10 µM)	Tampão Tris 50 mM, 150 mM, pH 7,4	6,77×10 ²	II	--	--	--	--	MI et al., 2014
Jatrorrizina	HSA (10 µM)	Tampão Tris-HCl, pH 7,40	4,06×10 ³	I	1,71	22	2,59	3,19	LI et al., 2014
Palmatina	HSA (10 µM)	Tampão Tris 50 mM, 15 mM, pH 7,4	5,44×10 ²	I	2,92	37,9	2,68	2,91	HU et al., 2010
Harmane	HSA (3 µM)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7,0	5,16×10 ⁴	--	--	--	--	--	GAŁĘCKI et al., 2012
	BSA (3 µM)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7,0	4,32×10 ⁴	--	--	--	--	--	GAŁĘCKI et al., 2012
Indigotina	HSA (5 µM)	Tampão Tris-HCl, pH 7,4	60,0×10 ²	I	99,20	30,6	2,51	2,88	CHENG et al., 2013
	BSA (5 µM)	Tampão Tris-HCl, pH 7,4	21,86×10 ²	I	98,47	31,0	2,51	2,87	CHENG et al., 2013
Cafeína	HSA (2 µM)	Tampão fosfato 50 mM, pH 7,4.	3,77×10 ³	--	--	--	3,69	5,68	QIONG et al., 2009
Levomepromazina	BSA (10 µM)	Tampão fosfato 100 mM, 15 mM NaCl, pH 7,4	6,42×10 ²	--	(0,09-0,11)	20-28-	1,4-1,7-	2-2,1	KAMAT & SEETHARAMAPPA, 2004
Propionilpromazina	BSA (10 µM)	Tampão fosfato, 100 mM, 15 mM NaCl, pH 7,4	3,93×10 ²	--	(0,09-0,11)	20-28-	1,4-1,7-	2-2,1	
Etopropazina	BSA (10 µM)	Tampão fosfato, 100 mM, 15 mM NaCl, pH 7,4	4,12×10 ²	--	(0,09-0,11)	20-28-	1,4-1,7-	2-2,1	
Propericiazina	BSA (10 µM)	Tampão fosfato, 100 mM, 15 mM NaCl, pH 7,4	3,84×10 ²	--	(0,09-0,11)	20-28-	1,4-1,7-	2-2,1	
Procaína	HSA	Tampão fosfato 1,2mM	1,16×10 ³	--	--	--	--	--	LSAMAMRA et al., 2018
Piplartina	HSA (4 µM)	Tampão fosfato 50mM, 150mM NaCl, pH 7.0	1,81×10 ⁵	I	--	--	--	--	CONTESSOTO, 2017
Cocaína	HSA (2 µM)	Tampão Tris 10 mM, pH 7,4	1,86×10 ⁴	I	0,0559	25,0	1,50	2,77	Este trabalho
Cocaeleno	HSA (2 µM)	Tampão Tris 10 mM, pH 7,4	4,88×10 ⁴	I	0,0670	22,0	1,89	2,43	Este trabalho

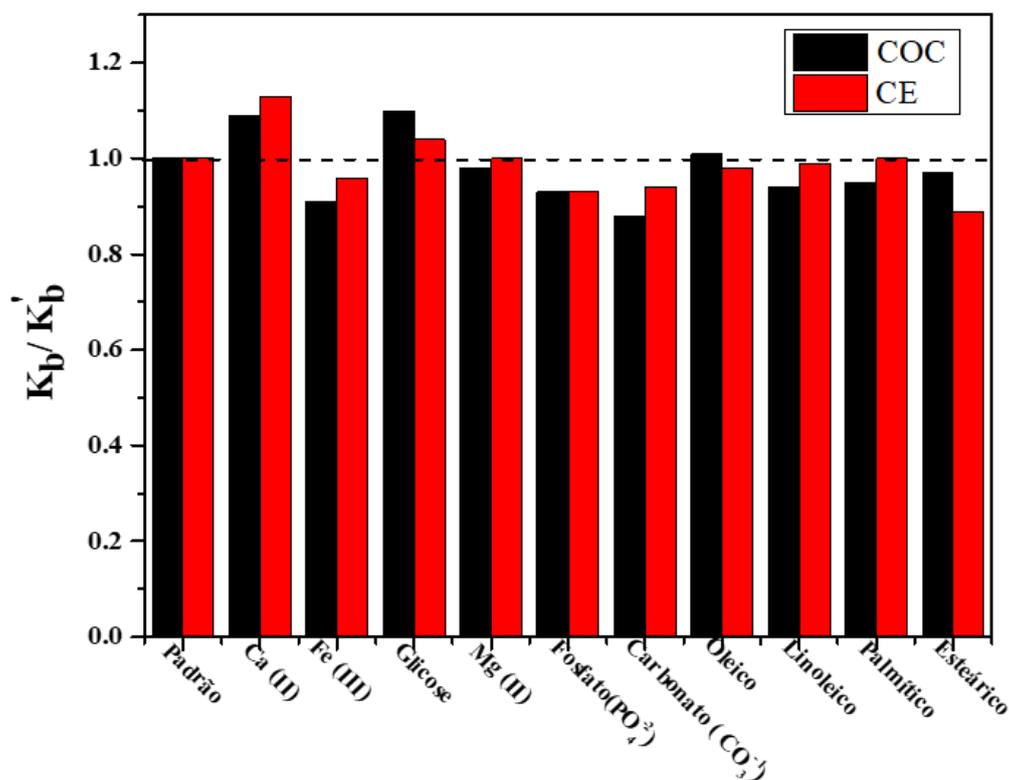
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

5.12 Avaliação da influência de competidores no processo de interação

A estrutura e dinâmica da HSA são influenciadas pelas condições do meio, dependendo de vários fatores como temperatura, pH, força iônica, entre outros, e isso tem um impacto direto na interação dessa macromolécula com um determinado ligante, podendo favorecer ou não esse processo (VARSHNEY et al., 2010). Além disso, diversos tipos de espécies que estão presentes no sangue humano possuem a capacidade de se ligar a HSA e desta forma também podem afetar a ligação de compostos bioativo com a proteína transportadora (RAHMAN; AFRIN; TABISH; 2018). Nesse contexto, os ácidos graxos podem interferir nas propriedades de ligação a HSA, induzindo mudanças conformacionais nos sítios de ligação I e II, uma vez que essa proteína atua no metabolismo e transporte dos mesmos (VARSHNEY et al., 2010). Ademais, como em condição de concentração hidrogeniônica fisiológico, a HSA tem uma carga líquida negativa, importante no transporte de cátions que são fisiologicamente relevantes e isso também pode ter um efeito nas interações droga-proteína (LIU; MEI; FANG, 2005).

Assim, o efeito dos íons e ácidos graxos que estão entre os mais abundantes, no plasma ou soro foi avaliado frente ao processo de interação entre HSA e COC/CE, sendo utilizado como parâmetro de avaliação a razão das constantes na presença (K_b') e na ausência (K_b) destes competidores. Caso esta razão seja menor que a unidade, indica que o competidor interfere no processo de interação e caso seja maior, indica que o competidor favoreceu o processo de interação. Os resultados estão apresentados no gráfico em barras da Figura 31.

Figura 31- Efeito da presença dos competidores no processo de interação entre HSA (2 μ M) e CO/CE (0-80 μ M) em pH 7,4 a 30°C.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

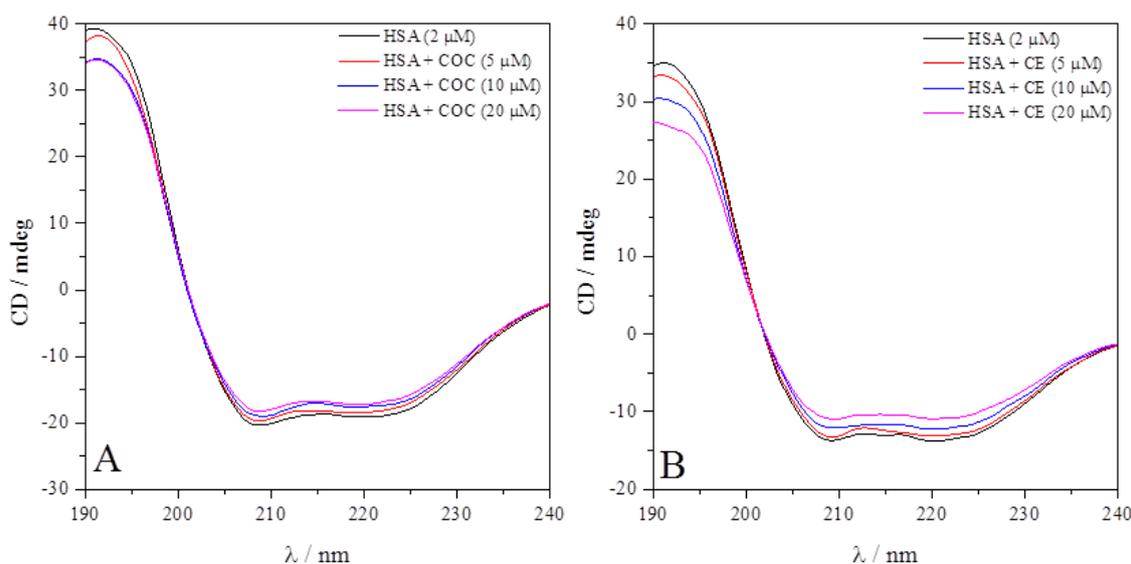
Como observado na Figura 31, os competidores não influenciaram de forma significativa no processo de interação simulando as condições fisiológicas, pois a razão das constantes foi próxima a unidade. Apenas na presença do íon Ca(II) houve um aumento na razão um de forma mais significativa, uma vez que a ligação desta cátion pode levar a alterações conformacionais na biomolécula, contribuindo para a interação da HSA com a COC e o CE (sendo mais acentuado para o CE). Segundo Wang e col (2008) esse efeito pode prolongar o período de um determinado composto no plasma sanguíneo e aumentar seus efeitos biológicos. Gowda & Nandibewoor (2014) também obtiveram resultados similares na presença de Ca(II) na interação entre a 4-aminoantipirina e HSA, bem como Santos e colaboradores (2018), que avaliou a interação entre timerosal e BSA.

5.13. Dicroísmo Circular (DC)

Nos estudos por dicroísmo circular, na região de 190 a 240 nm, observa-se a variação da configuração da estrutura secundária de uma proteína, que pode incluir arranjos de α -hélice, folha β e conformação randômica. A Figura 32 mostra o perfil do

espectro de DC da HSA em função do aumento das proporções de COC (Fig. 32A) e CE (Fig. 32B) e, como observado, os espectros exibem duas bandas negativas na região do UV a 208 e 222 nm e uma banda positiva em 195 nm, que são típicos da estrutura α -hélice de uma proteína.

Figura 32- Espectro de dicroísmo circular da HSA (2 μ M) na presença de COC (A) e CE (B) a 5, 10 e 20 μ M). Condições: tampão fosfato 5 mM (pH 7,4).



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

O aumento das concentrações de COC e CE levou a diminuição da intensidade das bandas em 208 e 222 nm, sem qualquer desvio significativo dos picos, sendo também observada uma diminuição da intensidade em 195 nm. Assim, o conteúdo quanto a conformação em α -hélice e folha- β da proteína foram calculados (Tabela 14). A medida que as concentrações de COC e CE aumentaram, houve uma redução do percentual de α -hélice de 56 para 53,2 (COC) e de 56 para 52,9% (CE); e um aumento do percentual de folha- β de 11,4 para 12,5% (COC) e uma diminuição de 11,4 para 10,1% (CE). A porcentagem da conformação randômica aumentou de 20,1 para 22,2% (COC) e de 20,1 para 24,4% (CE), não sendo observadas mudanças significativas no grau de enovelamento (*turn*), sendo evidente que a interação dos alcaloides com a HSA, causa alterações conformacionais na HSA.

Tabela 14- Estimativa da variação da estrutura secundária da HSA empregando CD na ausência e presença de COC e CE, Condições: tampão fosfato 5 mM (pH 7,4), HSA a 2 μ M, COC e CE avaliados a 5, 10 e 20 μ M.

Estrutura secundária	Composição (%)						
	HSA	HSA + COC			HSA + CE		
		COC (5 μ M)	COC (10 μ M)	COC (20 μ M)	CE (5 μ M)	CE (10 μ M)	CE (20 μ M)
α -hélice	56,0	54,9	53,9	53,2	55,1	54,2	52,9
Folha- β	11,4	12,1	12,5	12,1	10,1	10,3	10,2
Turn	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Randômico	20,1	20,5	21,1	22,2	22,3	23,0	24,4

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Por fim, Liu e colaboradores (2017) obteve comportamento semelhante, onde a adição de concentrações crescentes do alcaloide piperlongumina causou uma redução aparente no conteúdo de α -hélice na razão molar da HSA.

5.14. Ressonância magnética nuclear

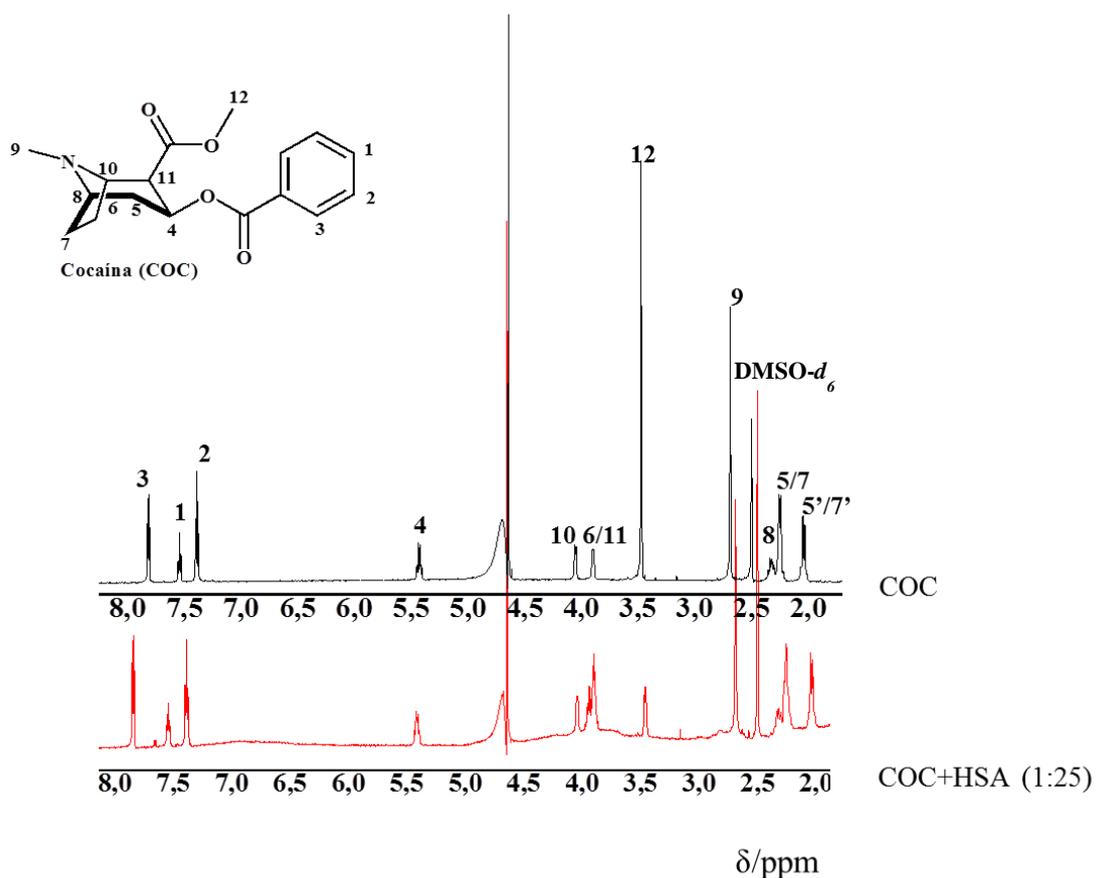
Com o emprego da espectroscopia de RMN ^1H é possível inferir, em alguns casos, a região de interação do ligante na proteína (epítipo) a partir da variação de deslocamento químico ($\Delta\delta$) de cada hidrogênio da molécula do ligante após a interação com a proteína (CALA; GUILLIÈRE; KRIMM, 2014).

A atribuição dos sinais aos respectivos hidrogênios presentes na COC (Figura 33) e no CE (Figura 34) e os deslocamentos químicos na ausência e na presença das diferentes concentrações da HSA, porém, não foi observada variação no deslocamento químico em menores concentrações da HSA (10 e 20 μ M) e por isso usou como referência o maior excesso (40 μ M), cujos valores são apresentados nas Tabelas 14 e 15, respectivamente. As atribuições dos sinais de hidrogênio para a COC foram realizadas de acordo com Benedito e colaboradores (2017) em condições químicas e instrumentais similares.

A partir dos valores de variação de deslocamento químico ($\Delta\delta$) calculados para a COC (Tabela 15) pôde-se observar que os hidrogênios que estão provavelmente mais envolvidos na interação HSA-COC são 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, indicando que possivelmente a região próxima ao nitrogênio e ao metil éster é a parte da molécula que preferencialmente interage com os resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica da HSA, e confirmando a existência de componente eletrostático no processo de interação. Para o CE, os deslocamentos químicos calculados estão na Tabela 16, sendo possível observar que os hidrogênios que estão envolvidos na interação com HSA são 6, 7', 8', 9,

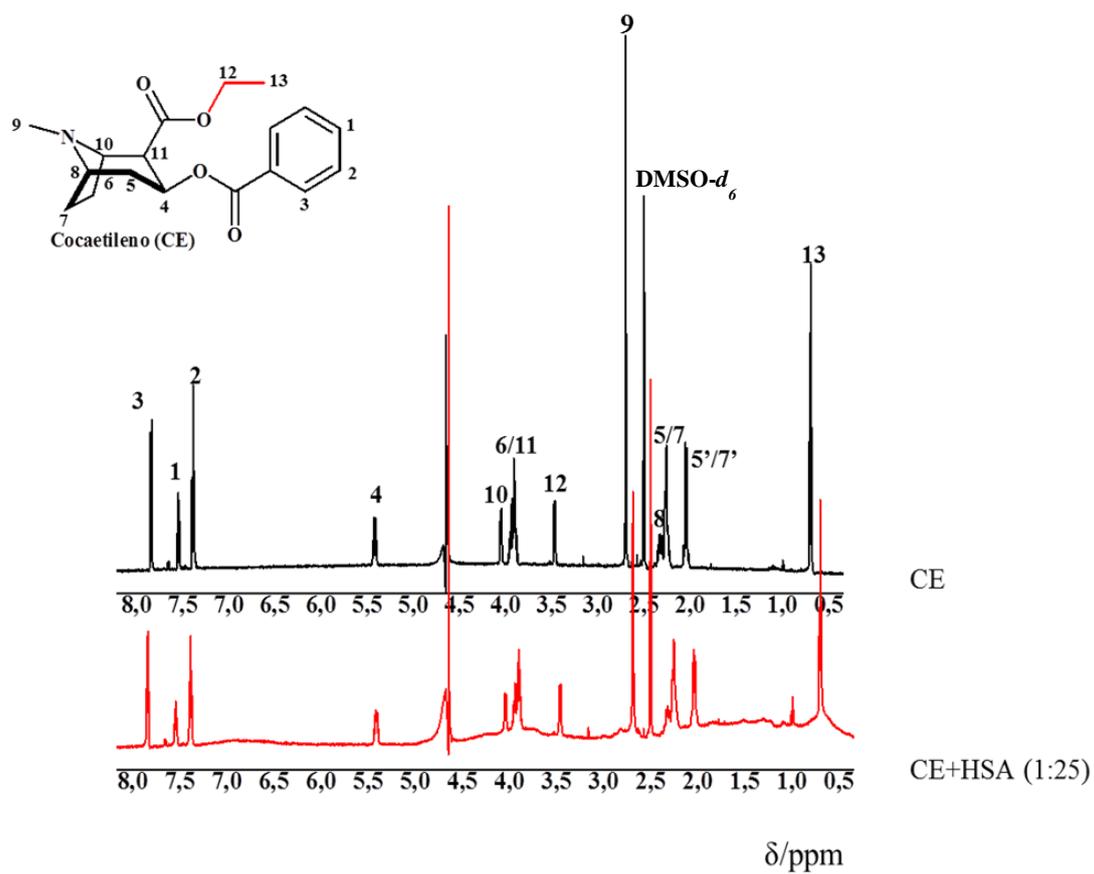
10, 11, 12 e 13. Similarmente a COC, indicando que a região próxima ao nitrogênio e ao etil éster corresponde ao epítipo da molécula.

Figura 33- Espectro de RMN ^1H (600 MHz) da COC (1 mM) na ausência e na presença de HSA (40 μM) em 10% (v/v) de DMSO- d_6 em tampão fosfato 10 mM com D $_2$ O a pH 7,4.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019

Figura 34- Espectro de RMN ^1H (600 MHz) da CE (1 mM) na ausência e na presença de HSA (40 μM) em 10% (v/v) de $\text{DMSO-}d_6$ em tampão fosfato 10 mM com D_2O a pH 7,4.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Tabela 15- Deslocamento químico (δ) de ^1H (600 MHz) da COC na ausência e presença de HSA (40 μM) em tampão fosfato 10 mM em D_2O a pH 7,4.

Hidrogênio	$\delta_{\text{COC}}^{\text{a}}$ / ppm	$\delta_{\text{COC}}^{\text{b}}$ / ppm	$\delta_{\text{COC-HSA}} (1:25) /$ ppm	$\Delta\delta^{\text{c}}$
1	7,74 (triplete)	7,54	7,54	-
2	7,57 (triplete)	7,38	7,38	-
3	7,96 (dubleto)	7,81	7,81	-
4	5,57 (dubleto de triplete)	5,43	5,42	0,01
5	2,45 (multiplete)	2,25	2,24	0,01
6	4,15 (multiplete)	3,89	3,87	0,02
7	2,57 (multiplete)	2,33	2,32	0,01
7'/8'	2,24 (multiplete)	2,04	2,02	0,02
8	2,48 (multiplete)	2,25	2,24	0,01
9	2,96 (singleto)	2,69	2,67	0,02
10	4,28 (dubleto)	4,05	4,03	0,02
11	3,64 (dubleto de dubleto)	3,89	3,87	0,02
12	3,69 (singleto)	3,47	3,48	0,01

Nota: ^a δ para COC em DMSO-d_6 por Benedito e colaboradores (2017) / ^b δ para COC obtido neste trabalho / ^c $\Delta\delta$ foi calculado baseado na diferença entre δ (COC) e δ (COC-HSA 1:25).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Tabela 16- Deslocamentos químico (δ) do RMN ^1H (600 MHz) do CE na ausência e na presença de HSA (40 μM) em tampão fosfato 10 mM em D_2O a pH 7,4.

Hidrogênio	δ_{CE} / ppm	$\delta_{\text{CE-HSA}} (1:25) /$ ppm	$\Delta\delta^{\text{a}}$
1	7,54	7,54	-
2	7,38	7,38	-
3	7,84	7,84	-
4	5,41	5,41	-
5	2,25	2,25	-
6	3,92	3,91	0,01
7	2,32	2,32	-
7'/8'	2,04	2,03	0,01
8	2,25	2,25	-
9	2,70	2,68	0,02
10	4,05	4,04	0,01
11	3,92	3,91	0,01
12	3,47	3,46	0,01
13	0,69	0,70	0,01

Nota: ^a $\Delta\delta$ foi calculado baseado na diferença entre δ (CE) e δ (CE-HSA 1:25).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que os compostos apresentaram inibição da atividade da urease *in vitro* e os resultados biológicos seguiram a mesma tendência das afinidades dos estudos de interação, sendo possíveis candidatos para o tratamento da *H. pylori*, uma vez que o composto mais ativo (+)-USN é um inibidor competitivo.

Com base nos resultados obtidos para COC e CE é possível concluir que o CE apresentou maior afinidade pela HSA e isso pode ser uma das razões para o metabólito da cocaína apresentar um maior tempo de vida no plasma quando comprado a COC, e desta forma, prolonga os efeitos da COC no organismo.

7 PERSPECTIVAS

As principais perspectivas deste trabalho são a realização dos estudos de interação diretamente com o plasma sanguíneo, além de expandir os estudos de interação para outras proteínas e enzimas, além de DNA, com moléculas bioativas (inibidores de urease) e outras drogas recreativas, como derivados do 25H-NBOH e 25H-NBOMe.

8. REFERÊNCIAS

ABDOLLAHPOUR, N.; SOHEILI, V.; SABERI, M. R.; CHAMANI, J. Investigation of the Interaction Between Human Serum Albumin and Two Drugs as Binary and Ternary Systems. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 41, p. 705-721, 2016.

ALANAZI, A. M.; ABDELHAMEED, A. S. A Spectroscopic Approach to Investigate the Molecular Interactions between the Newly Approved Irreversible ErbB blocker "Afatinib" and Bovine Serum Albumin. **PLoS ONE**, v. 11, 2016

ALBANI, J. R. Principles and applications of fluorescence spectroscopy; Wiley-Blackwell: Oxord, 2007.

ALBERTS, et al. **Biologia molecular da célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALSAMAMRA, H.; KHALID, I.; ALFAQEH, R.; FARROUN, M.; ABUTEIR, M.; DARWISH, S. Spectroscopic Investigation of Procaine Interaction with Human Serum Albumin. **Journal of Biomedical Sciences**, v. 7, 2018.

AMTUL, Z.; RAHMAN, A.; SIDDIQUI, R. A.; CHOUDHARY. M. I. Chemistry and Mechanism of Urease Inhibition. **Curr. Med. Chem.**, v. 9, p. 1323, 2002.

ARIGA, G.G. et al. Study of fluorescence interaction and conformational changes of bovine serum albumin with histamine H1-receptor–drug epinastine hydrochloride by spectroscopic and time-resolved fluorescence methods. *Biopolymers*, v. 103, p. 646–657, Jul., 2015.

ASERI, A., et al. Interaction of norfloxacin with bovine serum albumin studied by different spectrometric methods; displacement studies, molecular modeling and chemometrics approaches. **Journal of luminescence**, v.157, p.104–112, Jan., 2015.

BAČKOROVÁ, M. et al. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. **Toxicol In Vitro**, v. 26, p. 462-468, 2012.

BAILEY, D. N. Cocaine and Cocaethylene Binding in Human Serum. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 104, p. 180–186, 1995.

BAILEY, D. N. Cocaine and Cocaethylene Binding to Human Milk. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 110, p. 491-49, 1998.

BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, p. 274-283, Jul, 2010.

BARAKAT, C.; PATRA, D. Combining time-resolved fluorescence with synchronous fluorescence spectroscopy to study bovine serum albumin-curcumin complex during unfolding and refolding processes. **Luminescence**, v. 28, p. 149-155, 2013.

BARREIRO, E. J.; KÜMMERLE, A. E.; FRAGA, C. A. M. The Methylation Effect in Medicinal Chemistry. **Chem. Rev.**, v. 111, p 5215–5246, 2011.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BASU, A.; CHAKRABARTI, A. Hemoglobina interaction proteins and implications of spectrin hemoglobina interaction. **Journal of Proteomics**, v. 128, Out, 2015.

BOBONE, S.; VAN DE WEERT, M.; STELL, L. A reassessment of synchronous fluorescence in the separation of Trp and Tyr contributions in protein emission and in the determination of conformational changes. **J. Mol. Struct.**, v. 1077, p. 68- 76, 2014.

BOS, O. J. M.; FISCHER, M. J.; WILTING, J.; JANSSEN, L. H. Drug-binding and other physicochemical properties of a large tryptic and a large fragments of human serum albumin. **Biochimica et Biophysic Acta**, v. 953, p. 37-47, 1988.

BOUSTIE, J., GRUBE, M. Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 3, p. 273–287, 2005.

BREE, F.; NGUYEN, P.; URIEN, S.; ALBENGRES, E.; MACCIOCCHI, A.; TILLEMENT, J. Nimesulide binding to components within blood. **Drugs 46 Suppl**, v. 1, p. 83-90, 1993.

BREE, F.; URIEN, S.; NGUYEN, P.; RIAANT, P.; ALBENGRES, E.; TILLEMENT, J. A re-evaluation of the HSA-piroxicam interaction. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet**, v. 15, p. 303-307, 1990.

BUDDANAVAR, A. T.; NANDIBEWOOR, S. T. Multi-spectroscopic characterization of bovine serum albumin upon interaction with atomoxetine. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, p. 148-155, 2017.

BUSTINZA, F. Antibacterial substances from lichens. **Endeavour**, v. 10, p. 95-99. 1951.

CABRITA, E. J. et al. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *J. Chem. Educ.*, v. 88, p. 990-994, 2011.

CALA, O.; GUILLIERE, F.; KRIMM, I. NMR-based analysis of protein-ligand interactions. *Anal. Bioanal. Chem*, v. 406, p. 943-956, 2014.

CALCOTT, M. J. et al. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. **Chem Soc Rev.**, v. 47, p. 1730-1760, 2018.

CANTARELLA, H.; JOHNNY, R. O.; AIJÂNIO, R. S.; SILVA, G. B. Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review. *Journal of Advanced Research*, v. 13, p. 19-27, 2018.

CARDAMONE, M.; PURIT, N. K. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. **Biochem. J.**, v. 282, p. 589-593, 1992.

CASEY LAIZURE, S. et al. Cocaethylene metabolism and interaction with cocaine and ethanol: Role of carboxylesterases. **Drug metabolism and disposition**, v. 31, p. 16–20, 2003.

CHAKRABORTY, T.; LEDWANI, L. **Research methodology in chemical sciences: experimental and theoretical approach** Oakville: apple academic press, 2016.

CHAVES, O. A. et al. Fluorescence and docking studies of the interaction between human serum albumin and pheophytin. **Molecules**, v. 20, 2015.

CHAVES, O.A. et al. A Study of the interaction between trans-dehydrocrotonin, a bioactive natural 19-nor-clerodane, and serum Albumin. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.27, p. 1858-1865, 2016.

CHENG, Z.; LIU, R.; JIANG, X. Spectroscopic studies on the interaction between tetrandrine and two serum albumins by chemometrics methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 115, p. 92–105, Jun., 2013.

CHI, Z., et al. Toxic interaction mechanism between oxytetracycline and bovine hemoglobin. **Journal of Hazardous Materials**, Holanda, v.180, p.741–747, Ago., 2010.

CHOWDHRY, B. Z.; HARDING, S. E. **Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry**. Oxford University Press, EUA: Practical Approach, 2001.

CLYNE, M.; DRUMM, B. The Urease Enzyme of *Helicobacter pylori* Does Not Function as an Adhesin. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 2817–2820, Jul, 1996.

ÇOBANOĞLU ÖZYİĞİTOĞLU, G.; AÇIKGÖZ, B.; SESAL, C. Lichen secondary metabolites: Synthesis pathways and biological activities. **Acta Biologica Turcica**, v. 29, p. 150-163, 2016.

COLOMBO, S. et al. Orosomucoid (alpha1-acid glycoprotein) plasma concentration and genetic variants: effects on human immunodeficiency virus protease inhibitor clearance and cellular accumulation. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 80, p. 307-18, 2006.

DANTAS, M. D. A.; TENÓRIO, H. A.; LOPES, T. B. I.; PEREIRA, H. J. V.; MARSAIOLI, A. J.; FIGUEIREDO, I. M.; SANTOS, J. C. C. Interactions of tetracyclines with ovalbumin, the main allergen protein from egg white: Spectroscopic and electrophoretic studies. **Int. J. Biol. Macromol**, v. 102, p. 505, 2017.

DANTAS, M. D. A. Avaliação da interação das proteínas do ovo (ovalbumina e outras) com os antibióticos tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina empregando técnicas espectroscópicas e eletroforese. Universidade Federal de Alagoas, 2015, 98 f Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia)– Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia- Programa de pós-graduação em química e

DANTAS, M. D. A. et al. Interactions of tetracyclines with ovalbumin, the main allergen protein from egg white: Spectroscopic and electrophoretic studies. **Int J Biol Macromol**, v. 102, p. 505-514, 2017.

DAVID, N.; BAILEY, M.D. Cocaine and Cocaethylene Binding in Human Serum. **Clinical chemistry**, v. 104, 2016.

DE RICCO, R., et al. NMR investigations of metal interactions with unstructured soluble protein domains. **Coordination chemistry reviews**, v.269, p.1–12, Jun., 2014.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular Biotechnology**, v. 38, p. 41-55, 2008.

DENG, S. et al. Covalent modification of proteins by cocaine. **Proc Natl Acad Sci EUA**, v. 99, p. 3412-3416, 2002.

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

DUN, S. V.; OTTMANN, C.; MILROY, LECH-GUSTAV.; BRUNSVELD, L. Supramolecular Chemistry Targeting Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, p. 13960–13968, Set., 2017.

EUSEBI, L. H., et al. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 19 (Suppl. 1): 1-5, 2014.

FANALI, L.; CAO, Y.; ASCENZI, P.; TREZZA, V.; RUBINO, T.; PAROLARO, D.; FASANO, M. Binding of δ 9-tetrahydrocannabinol and diazepam to human serum albumin. **IUBMB Life**, v. 63, p. 446-51, 2011.

FEHSKE, K. J. SCHLAFER, U.; WOLLERT, U.; MULLER, W. E. Characterization of an importante drug binding area on human serum albumin including the high-affinity binding sites of warfarin and azapropazone. **Molecular Pharmacology**, v. 21, p. 387-393, 1982.

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

GHASEMI, J. B. et al. Experimental, computational and chemometrics studies of BSA-vitamina B6 interaction by UV-vis, FT-IR, fluorescence spectroscopy, molecular dynamics simulation and hard-soft modeling methods. **Bioorganic Chemistry**, v. 68, p. 124-136, Out, 2016

GHISAIDOOBE, A. B. T.; CHUNGS, S. J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the Detection and Analysis of proteins: a focus on forster resonance anergy transfer techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, p. 22518-22538, Dez, 2014.

GHUMAN, J.; ZUNSZAIN, P. A.; PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A.; OTAGIRI, M.; CURRY, S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **J. Mol. Biol.**, v. 353, p. 38–52, 2005.

GINSBUREG, B. C. et al. Interaction of cocaine and dopamine transporter inhibitors on behavior and neurochemistry in monkeys. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 80, p. 481-891, 2005.

GOLDFLAM, M. et al. NMR studies of protein-ligand interaction. **Methods Mol Biol.**, v. 831, p. 233-259, 2011.

GONÇALVES, R. MATEUS, N. DE FREITAS, V. Study of the interaction of pancreatic lipase with procyanidins by optical and enzymatic methods. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 11901-06, 2010.

GONSALVES, A. M. d' A. R.; MELO, T. M. Y. D. P. **Espectroscopia de ressonância magnética e nuclear**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2007.

GOULD, S. E. Urease: an anti-microbial target in bacteria and fungi. **Scientific American**, Jul, 2014.

GOWDA, J. I.; NANDIBEWOOR, S. T. Binding and conformational changes of human serum albumin upon interaction with 4-aminoantipyrine studied by spectroscopic methods and cyclic voltammetry. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 124, p. 397–403, 2014.

GRAHAMMA, D. Y.; MIFTAHUSSURUR, M. Helicobacter pylori urease for diagnosis of Helicobacter pylori infection: A mini review. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 51-57, 2018.

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

GUANGLIN, Kuang. Theoretical Studies of Protein-Ligand Interactions. 2016. 66 f. Tese (Doutorado em Química e Biologia teórica)– Escola de Biotecnologia, KTH-Instituto Real de Tecnologia. Estocolmo, Suécia.

GUIZADO, T. R. C. Analysis of the structure and dynamics of human serum albumin. **Journal of Molecular Modeling**, v. 20, p. 2450, Out, 2014

GULER, T. et al. Electrochemical study of pyrite-ovalbumin interaction in relations to flotation. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 23, Set, 2013.

GUO, X., et al. A spectroscopic study on the interaction between p-nitrophenol and bovine serum albumin. **Journal of luminescence**, v.149, p.353–360, Maio, 2014.

HA, NAM-CHUL. et al. Supramolecular assembly and acid resistance of Helicobacter pylori urease. **Nature Structural Biology**, v. 8, p. 505–509, 2001.

HALE-JR., M. E. The Biology of Lichens. 3ed. London. Edward Arnold Pub., 1983, 90p.

HALL, N., et al. **Neoquímica**. A química moderna e suas aplicações. Porto Alegre: Bookman, 2004

HARRIS,. **Análise Química Quantitativa**. 9.ed. São Paulo: LTC, 2017.

HAUCK, M. & HUNECK, S. Lichen substances affect metal absorption in Hypogymnia physodes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, p. 219–223, 2007.

HE, Ling-Ling et al. Studies on the interaction between promethazine and human serum albumin in the presence of flavonoids by spectroscopic and molecular modeling techniques, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, China, v. 145, p. 820-829, Jun., 2016

HOU, S. et al. Kinetic characterization of human butyrylcholinesterase mutants for the hydrolysis of cocaethylene. **Biochem. J**, v. 460, p. 447–457, 2014.

HUNECK, S.; PORZEL, A.; SCHMIDT, J. Structure and synthesis of arthonin, a lichen metabolite from Arthonia endlicheri. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 4, p. 303–311, 1993.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; CHUNG, G. A.; SKÚLASON, V. G.; GISSURARSON, S. R.;

JIA-HAN; ZHANG, Y.; LI, R.; DING, Xin-Liang; LIU, Y. Synthesis of a novel hydrazone derivative and biophysical studies of its interactions with bovine sérum albumin by spectroscopic, electrochemical, and molecular docking methods, *J. Phys. Chem. B, China*, v. 114, p. 14842-14853, Set., 2010.

Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 6, p. 141-144, 1998.

KABOUDIN, B.; MORADI, K.; FAGHIHI, M. R.; MOHAMMADI, F. The fluorescence spectroscopic studies on thei nteraction of novel aminophosphinic acids with bovine serum albumin. **Journal of luminescence**, v.139, p.104–112, 2013.

KAFARSKI, P.; TALMA, M. Recent advances in design of new urease inhibitors: A review. **Journal of Advanced Research**, Jan, 2018.

KANDAGAL, P.B.; ASHOKA, S.; SEETHARAMAPPA, J.; SHAIKH, S. M. T.; JADEGOUD, Y.; IJARE, O. B. Study of the interaction of anti-cancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach. **Journal of pharmaceutical and biomedical Analysis**, v.41, p.393–399, 2006.

KAPPAUNA, K.; PIOVESANA, A. C.; CARLINIA, C. R.; LIGABUE-BRAUNC, R. Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 3-17, 2018.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism.. **Biochim Biophy Acta (BBA). Proteins and Proteomics**, v. 1751, p.119-139, 2005.

KHAN, M. A. MUZAMMILA, S.; MUSARRAT, J. Differential binding of tetracyclines with serum albumin and induced structural alterations in drug-bound protein. **International Journal of biological Macromolecules**, v.30, p.243–249, Out., 2002.

KHAN, M. A; MUZAMMIL, S; MUSARRAT, J. Differential binding of tetracyclines with serum albumin and induced structural alterations in drug-bound protein. **Int J BiolMacromol**, vl. 3, p243-9, 2002.

KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y.; YOSHIMURA, I.; KUROKAWA, T.; YAMADA, Y. Production of usnic acid in cultured *Usnea hirta*. **Bibliotheca Lichenologica**, v. 53, p. 137 – 146, 1993.

KON, Y.; IWASHINA, T.; KASHIWADANI, H.; WARDLAW, J. D.; ELIX, J. A new dibenzofuran, isostrepsilic acid, produced by cultured mycobiont of the lichenized ascomycete *Usnea orientalis*. **Journal of Japanese Botany**, v. 72, p. 67– 71, 1997.

KONIECZNA, I. et al. Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. **Current Protein & Peptide Science**, v. 13, p. 789–806, Dez, 2012.

KOWALSKI, M.; HAUSNER, G.; PIERCEY-NORMORE, M. Bioactivity of secondary metabolites and thallus extracts from lichen fungi. **Mycoscience**, v. 52, p. 413-418, 2011.

KRAGH-HANSEN, U. Relations between high-affinity binding sites of markers for binding regions on human serum albumin. **Biochem. J**, v. 3, p. 629–638, 198

KRAJEWSKA, B. Urease-aided calcium carbonate mineralization for engineering applications: A review. **Journal of Advanced Research**, V. 13, P. 59-67, 2018.

KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 9-21, Jul, 2009.

KRAJEWSKA, B.; BRINDELL, M. Urease-aided calcium carbonate mineralization for engineering applications: A review. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 123, p. 242, 2016.

KRATZ, F.; ELSADEK, B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. **J Control Release**, v. 161, p. 429-4. 2012.

KUEHLER, T. C.; FRYKLUND, J.; BERGMAN, N.; WEILITZ, J.; LEE, A.; LARSSON, H. Structure-Activity Relationship of Omeprazole and Analogs as *Helicobacter pylori* Urease Inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 38, p. 4906, 1995.

LAGE, T. C. A. et al. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* and interaction studies of lichen natural products with jack bean urease. **New Journal of Chemistry**, v. 42, p. 5356-5366, 2018.

LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence Techniques in Analysis of Protein-Ligand Interactions. In: WILLIAMS, M. A. & DAVITER, T. (Ed). Protein-ligands interactions- Methods and applications. 2ed. London: Humana Press, 2013.

LEGAZ, M. E. G.; XAVIER-FILHO, L.; VICENTE, C. C. Metabolitos vegetales y microbianos para la industria – un enfoque biotecnológico. *Âmbito Cultural*, Rio de Janeiro, 304p, 2008.

LEGAZ, M. E.; CÓROBA, C. V.; PEREIRA, E. C.; XAVIER-FILHO, L.; RODRIGUES, S. A. Importância Econômica dos líquens para o homem. In: XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. *Biologia de Líquens*. Rio de Janeiro: *Âmbito Cultural*, p. 581-619, 2006.

LEHN, J.M. **Química supramolecular conceitos e perspectivas**. Lisboa:Press,1996.

LEUCKERT, C.; AHMADJIAN, V.; CULBERSON, C. F.; JOHNSON, A. Xanthonones and depsidones of the lichen *Lecanora dispersa* in nature and of its mycobiont in culture. **Mycologia**, v. 82, p. 370 – 378, 1990.

LI, X.; CHEN, D.; WANG, G.; LU, Y. Study of interaction between human serum albumin and three antioxidants: ascorbic acid, α -tocopherol, and proanthocyanidins. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 70, p. 22, 2013.

LIU, S. et al. Insights into Protein-Ligand interactions: Mechanisms, Model and Methods. **Int. J. Mol. Sci**, v. 17, p. 144, 2016

LIU, X.; MEI, Y.; FANG, X. Y. Effect of metal ions on the interaction between bovine serum albumin and berberine chloride extracted from a traditional Chinese Herb *coptis chinensis* franch. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 1449–1457, 2005.

LYRA, A. C. F. DE. Avaliação da interação da ovalbumina, principal alérgeno natural da clara do ovo, com sulfonamidas através de estudos espectroscópicos e de atividade biológica. Universidade Federal de Alagoas, 2017, 83 f Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia)– Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia- Programa de pós-graduação em química e biotecnologia. Maceió, Brasil.

MACIĄG-DORSZYŃSKA, M.; WEGRZYN, G.; GUZOW-KRZEMIŃSKA B. Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis. **FEMS Microbiol**, v. 353, p. 57-62, 2014.

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

MARLIER, J. F.; ROBINS, L. I.; TUCKER, K. A.; RAWLINGS, J.; ANDERSON, M. A.; CLELAND, W. W. A kinetic and isotope effect investigation of the urease-catalyzed hydrolysis of hydroxyurea. **Biochemistry**, v. 49, p. 8213, 2010.

MATSUSHITA, S. et al. Recombinant Human Serum Albumin Containing 3 Copies of Domain I, Has Significant in Vitro Antioxidative Capacity Compared to the Wild-Type. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, p. 1813-1817, 2017.

MEHRANFAR, F.; BORDBAR, A. K.; KEYHANFAR, M.; BEHBAHANI, M. Spectrofluometric and molecular docking study on the interaction of bisdemethoxycurcumin with bovine β -casein nanoparticles. **Journal of luminescence**, v.143, p.687–692, 2013.

MEYER, B.; PETERS, T. NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. **Angewandte chemie international edition**, v.42, p.864 – 890, Fev., 2003.

MEYLAN, W.M.; HOWARD, P.H. Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84,

MOCZ, G.; ROSS, J. A. Fluorescence techniques in analysis of protein-ligand interaction. In: WILLIAMS, M. A. & DAVITER, T. (Ed). Protein-ligands interactions- Methods and applications. 2 ed. London: Humana Press, 2013.

MODOLO, L. V. et al. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 35-44, Out, 2014.

MODOLO, L. V.; SILVA, C. J. DA; BRANDÃO, D. S.; CHAVES, I. S. A minireview on what we have learned about urease inhibitors of agricultural interest since mid-2000s. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 29-37, 2018.

MOLINA-BOLÍVAR, J. A., et al. Spectroscopic investigation on the interaction of maslinic acid with bovine serum albumin. **Journal of luminescence**, v.156, p.141–149, Dez., 2014.

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

MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Biological activities of secondary lichen metabolites. **Hungarian Scientific Research Fund**, 2010.

MOLNÁRA, K.; FARKAS, E. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. **Review**, v. 65, p. 157 – 173, 2010.

MOREIRA, M. B. et al. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Quim. Nova**, v. 38, p. 227-232, 2015.

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

n. 1, 83-92, Jan., 1995

NAJJAR, F. M. et al. Studies to reveal the nature of interactions between catalase and curcumin using computational methods and optical techniques. **Int J Biol Macromol**, v. 95, p. 550–556, 2017.

NAVEENRAJ, S.; SOLOMOM, R. V.; VENUVANALINGAM, P.; ASIRI, A. M.; ANANDAN, S. Interaction between toxic azo dye C.I. AcidRed 88 and serum albumins. **Journal of luminescence**, v.143, p.715–722, 2013.

NGUYEN, S. T.; GIN, D. L.; HUPP, J. T.; ZHANG, X. Supramolecular chemistry: Functional structures on the mesoscale. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 11849-11850, Oct. 2001.

NI, Y.; SU, S.; KOKOT, S. Spectrofluorimetric studies on the binding of salicylic acid to bovine serum albumin using warfarin and ibuprofen as site markers with the aid of parallel factor analysis. **Anal. Chi Acta**, v. 580, p. 206-215, 2006

NICOLAOU, K. C.; GRAY, D. L. F. Total synthesis of hybocarpone and analogues thereof. A facile dimerization of naphazarins to pentacyclic systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 607–612, 2004.

OLIVEIRA, F. M.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; MALTHA, C. R. A.; PEREIRA, S. R.; HORTA, L. P.; MODOLO, L. V. Synthesis, molecular properties and DFT studies of new phosphoramidates as potential urease inhibitor. **Med. Chem. Res.**, v. 23, p. 5174, 2014.

PARKER, R. B.; WILLIAMS, C.; LAIZURE, S. C.; LIMA, J. J. Factors Affecting Serum Protein Binding of Cocaine in Humans. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 275, p. 605-610, 1995.

PEREIRA, E. C. Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae (líquen), a partir de imobilização celular. Tese de Doutorado em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 225p., 1998.

PETITPAS, I.; GRÜNE, T.; BHATTACHARYA, A. A.; CURRY, S. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. **J Mol Biol**, v. 314, p. 955-960, Dez, 2001.

QING; W. Y.; HONG-MEI, Z. Spectral studies on the interaction between Cu²⁺ and urease. **Spectrochim. Acta, Part A**, v. 96, p. 352, 2012.

RAHMAN, Y.; AFRIN, S.; TABISH, M. Interaction of pirenzepine with bovine serum albumin and effect of β -cyclodextrin on binding: A biophysical and molecular docking approach. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 652, p. 27-37, 2018

RANJBAR, et al. Studies of the Interaction between Isoimperatorin and Human Serum Albumin by Multispectroscopic Method: Identification of Possible Binding Site of the Compound Using Esterase Activity of the Protein. **The scientific world journal**, v.2013, p.4-13, Set., 2013.

RAUF, A. et al. Synthesis, characterization and interaction studies of 1, 3, 4- oxadiazole derivatives of fatty acid with human serum albumin (HSA): A combined multi-spectroscopic and molecular docking study; **European Journal of medicinal chemistry**, v. 122, p. 72-78, Out, 2016.

REGO, Y. F., et al A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 69-100, 2018 2018.

REUTIMANN, P.; SCHEIDEGGER, C. Importance of lichen secondary products in food choice of two oribatid mites (Acari) in an alpine meadow ecosystem. **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, p. 363–369, 1987.

ROCHE, D. B.; BRACKENRIDGE, D. A.; MCGUFFIN, L. J. Proteins and Their Interacting Partners: An Introduction to Protein–Ligand Binding Site Prediction Methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 29829–29842, Set., 2015

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

ROTH, M. D. et al. Cocaine Enhances Human Immunodeficiency Virus Replication in a Model of Severe Combined Immunodeficient Mice Implanted with Human Peripheral Blood Leukocytes. **The Journal of Infectious Diseases**, v.185, p. 701-705, 2002.

ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Chemical analysis modern instrumentation methods and techniques**. 2.ed. France:Wiley, 2007.

ROY, A.S., et al. The influence of common metal ions on the interactions of the isoflavone genistein with bovine serum albumin. **Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v.102, p.393–402, Jan., 2013

RUNDEL, P. W. The ecological role of secondary lichen metabolites. **Biological System Ecology**, v. 6, p. 157-170, 1987.

SAEIDIFAR, M.; MANSOURI-TORSHIZI, H.; SABOURY, A.A. Biophysical study on the interaction between two palladium (II) complexes and human serum albumin by Multispectroscopic methods, **Journal of Luminescence**, v. 167, p. 391-398, Jul., 2015.

SAENZ, M. T.; GARCIA, M. D.; HOWEL, J. G. Antimicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of Spain. **Fitoterapia**, v. 77, p. 156-159. 2006.

SALENTIN, S., et al. Polypharmacology rescored: Protein-ligand interaction profiles for remote binding site similarity assessment. **Progress in biophysics and molecular biology**, v.116, p.174-186, Nov.-Dez., 2014.

SANTOS, D. I. V.; GIL, E. S. Fluorimetry in pharmaceutical analysis: a review. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, p. 24-38, 2010.

SANTOS, J. C. N. Estudos de interação do timerosal com albumina do soro bovino (BSA) simulando condições fisiológicas e empregando técnicas espectroscópicas: mecanismo e perfil de fibrilação proteica. Universidade Federal de Alagoas, 2017, 62 f Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia)– Universidade Federal de Alagoas. Instituto de

Química e Biotecnologia- Programa de pós-graduação em química e biotecnologia. Maceió, Brasil.

SANTOS, J. C. N.; SILVA, I. M.; BRAGA, T. C.; FÁTIMA, A.; FIGUEIREDO, I. M.; SANTOS, J. C. C. 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.

SARWAR, T.; HUSAIN, M. A.; REHMAN, S. U.; ISHQIA, H. M.; TABISH, M. Multi-spectroscopic and molecular modelling studies on the interaction of esculetin with calf thymus DNA Mol. **BioSyst.**,v, 11, p. 522, 2015.

SHAHABADI, N.; BAZVANDI, B.; TAHERPOUR, A. Synthesis, structural determination and HSA interaction studies of a new water-soluble Cu(II) complex derived from 1,10-phenanthroline and ranitidine drug, **Journal of Coordination Chemistry**, v. 70, p. 3186-3198, 2017.

SHARMA; ANANDAKUMAR; ILANCHELIA. A combined spectroscopic and molecular docking study on site selective binding interaction of Toluidine blue O with human and bovine serum albumins. **Journal of luminescence**, v.151, p.206–218, Fev., 2014.

SHARON, M.; PRICE, K.; PRICE, N. C. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, p. 349-384, 2000.

SHU, Y., et al. Interaction of erucic acid with bovine serum albumin using a multi-spectroscopic method and molecular docking technique. **Food chemistry**, v.173, p.31–37, Abr., 2015.

SIDDIQUI, M. R.; .ALOTHMAN, Z. A.; RAHMAN, N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 1409-1421, 2017.

SILVA, I. M. DA. Interação in vitro entre compostos orgânicos de arsênio (V) e proteína carreadora empregando técnicas espectroscópicas. Universidade Federal de Alagoas, 2017, 87 f Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia)– Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia- Programa de pós-graduação em química e biotecnologia. Maceió, Brasil.

SJÖHOLM, B.; EKMAN, A.; KOBER, I.; LJUNGSTEDT-PAHLMAN, B.; SEIVING, T.; SJÖDIN, T. Binding of drugs to human serum albumin: XI. The specificity of three binding sites as studied with albumin immobilized in microparticles. **Mol. Pharmacol.**, v. 16, p.767-777, 1979.

SJÖHOLM, I.; EKMAN, B.; KOBER, A.; LJUNGSTEDT-PAHLMAN, I.; SEIVING, B.; SJÖPIN, T. Binding of drugs to human serum albumin: XI. The specificity of three binding sites as studied with albumin immobilized in microparticles. **Mol. Pharmacol.**, v. 3, p. 767–777, 1979.

SKOOG, et al. **Fundamentos de química analítica**. 9.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2014

SKOOG; CROUCH; HOLLER. **Princípios de Análise Instrumental**. 6.ed. São Paulo: Bookman, 2009.

SLEEP, D.; CAMERON, J.; EVANS, L. R. Albumin as a versatile platform for drug half-life extension. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 5526-5534, Dez, 2013.

SOTOMAYOR, M.D.P.T., et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química nova**, v.31, n.7, p.1755-1774, Set., 2008.

SOUZA, L. M. DE. Fingerprinting de Cocaína: Um Estudo do Perfil Químico no Estado do Espírito Santo. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química)– Universidade federal do espírito santo-Centro de ciências exatas-Programa de pós-graduação em química. Vitória, Brasil.

STRUGATSKY, D. et al. Structure of the proton-gated urea channel from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, v. 493, p. 255–258. Jan, 2013.

SUDLOW, G. BIRKETT, D. J. WADE, D. N. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. **Mol. Pharmacol**, v. 6.p. 1052–1061, 1976.

SUJOY, B.; APARNA, A. Potential Clinical Significance of Urease Enzyme. **European Scientific Journal**, v. 9, p. 1857 – 7881, Jul, 2013.

SUKBUNTHERNG, J.; MARTIN, D. K.; PAK, Y.; MAYERSOHNX, M. Characterization of the Properties of Cocaine in Blood: Blood Clearance, Blood to Plasma Ratio, and Plasma Protein Binding. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, 1996.

SULTAN, Z. et al. Study of Interaction between febuxostat and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy. **J. Bioanal. Biomed**, v. 7, p. 164-170, 2015.

SUMNER, J. B . The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 69, p. 435–441, 1926.

SUMNER, J. B.; KIRK, J. S.; HOWELL, S. F . The Digestion and Inactivation of Crystalline Urease by Pepsin and by Papain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 98, p. 543-552, 1932.

SUN, F. ZONG, W.; LIU, R.; CHAI, J.; LIU, Y. Micro-environmental influences on the fluorescence of tryptophan. **Spectrochim. Acta, Part A**, v. 74, p. 142-145, 2010.

SUN, Y.; WEI, S.; ZHAO, Y.; HU, X.; FAN, J. Interactions between 4-(2-dimethylaminoethoxy)-N-octadecyl-1,8-naphthalimide and serum albumins: Investigation by spectroscopic approach. **Journal of luminescence**, v.132, p.879–886, 2012.

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

TAKISHIMA, K.; SUGA, T.; MAMIYA, G. The structure of jack bean urease. The complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. **Eur. J. Biochem.**, v. 175, p. 151-165, 1988.

TAN, L. et al. Kinetics and Mechanism Study of Competitive Inhibition of Jack-Bean Urease by Baicalin. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

TAN, M. et al. Fluorescence Spectroscopy Study on the Interaction between Evodiamine and Bovine Serum Albumin. **Journal of Chemistry**, v. 2013, 2012.

TIAN, Z. et al. Spectroscopic study on the interaction between mononaphthalimide spermidine (MINS) and bovine serum albumin (BSA). **J Photochem Photobiol B.**, v. 142, p. 103-109, Jan, 2015.

TOMA, H. E. Química e Tecnologia Supramolecular. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Brasil, v. 72, Mar., 2000.

UPDHYAY, L. S. B. Urease inhibitors: A review. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 381-388, 2012.

VARSHNEY, A.; SEN, P.; E AHMAD, REHAN, M.; SUBBARAO, N.; KHAN, R. H. Ligand Binding Strategies of Human Serum Albumin: How Can the Cargo be Utilized. **Chirality**, v. 22, p.77–87, 2010.

VARTIA, K. O. Antibiotics in lichens I. **Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiae Fenniae**, v. 27, p. 46-54. 1949.

VICENTE, C. L. XAVIER- FILHO. Urease regulation in *Cladonia verticillaris*. **Phyton**, v. 37, p. 137-144, 1979.

VICENTE, C.; CIFUENTES, B. Reversal by L-cysteine of the inactivation of urease by L-usnic acid. **Plant Sci. Lett.**, v. 15, p. 165, 1979.

VICENTE, C.; RUIZ, J. L.; ESTÉVEZ, M. P. Mobilization of usnic acid in *Evernia prunastri* under critical conditions of nutrients availability. **Phyton**, v. 39, p. 15-20, 1980.

VIHELMSDÓTTIR, M. Antimicrobial activity of lichen metabolites in vitro. **European VLASOVA, I. M.; SALETSKY, A. M.** Study of the denaturation of human serum albumin by sodium dodecyl sulfate using the intrinsic Fluorescence of albumin. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 76, p. 564–570, Jul–Ago, 2009.

WANG, N.; YE, L.; ZHAO, B. Q.; YU, J. X. Spectroscopic studies on the interaction of efonidipine with bovine serum albumin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, p. 589-595, 2008.

WANG, Q.; LIU, X.; SU, M.; SHI, Z.; SUN, H. Study on the interaction characteristics of cefamandole with bovine serum albumin by spectroscopic technique. **Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v.136, p. 321–326, 2015.

WANG, W. Q.; ZHANG, G. C.; ZHANG, H. M. Study on the Interaction of Pentachlorophenol with Urease in Aqueous Solution by Multiple Spectroscopic Techniques. **J. Solution Chem.**, v. 40, p. 458-469, 2011.

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

WANI, T. A. et al. Study of binding interaction of rivaroxaban with bovine serum albumin using multi-spectroscopic and molecular docking approach. **Chemistry Central Journal**, v. 11, 2017.

XIAO, J.; SHI, J.; CAO, H.; WU, S.; REN, F.; XU, M. Analysis of binding interaction between puerarin and bovine serum albumin by multi-spectroscopic method. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.45, p. 609–615, 2007.

XU, T., et al. Multiple spectroscopic studies on the interaction between olaquinox, a feed additive, and bovine serum albumin. **Food and chemical toxicology**, v.50, p.2540–2546, Jul., 2012.

YAMAMOTO, Y. Screening of biological activities and isolation of biological-active compounds from lichens. **Shokubutsu no Kagaku Chosetu**, v. 35, p. 169 –179, 2000.

YAMASAKI, K.; CHUANG, V. T. G.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 5435-5443, 2013.

YAMASAKI, K.; CHUANG, V. T. G.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1830, p. 5435-54433, 2013.

YAMASAKI, K.; MARUYAMA, T.; KRAGH-HANSEN, U.; OTAGIRI, M. Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1295, p. 147-157, 1996.

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

YU, X, et al. Study on the interaction between carbonyl-fused N-confused porphyrin and bovine serum albumin by spectroscopic techniques, **Spectrochimica Acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 133, p. 372-377, Dez, 2014.

ZHANG, G., et al. Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy. **Journal of molecular structure**, v.881, p.132–138, Jun., 2008.

ZHANG, H. M.; ZHANG, G. C.; WANG, Y. Q. The interaction of chromium(VI) with urease in solution. **Biol. Trace. Elem. Res.**, v. 141, p. 53; 2011.

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

ZHANG, J.; WANG, J.; YAN, W. J.; XIANG, W. S. Comparative Studies on the Interaction of Genistein, 8-Chlorogenistein, and 3',8-Dichlorogenistein with Bovine Serum Albumin. **Agric, J. Food Chem**, v. 59, p. 7506-7513, 2011.

ZHANG, P.; LIU, D.; LI, Z.; SHEN, Z.; WANG, P.; ZHOU, M.; ZHOU, Z.; ZHU, W.. Multispectroscopic and molecular modeling approach to investigate the interaction of diclofop-methyl enantiomers with human serum albumin. **J. Lumin.**, v. 155, p. 231-237, 2014.

ZHANG, X. et al. Investigation of the interaction of naringin palmitate with bovine serum albumin: spectroscopic analysis and molecular docking. **Plos One**, v. 8, p. 65-69, 2012.

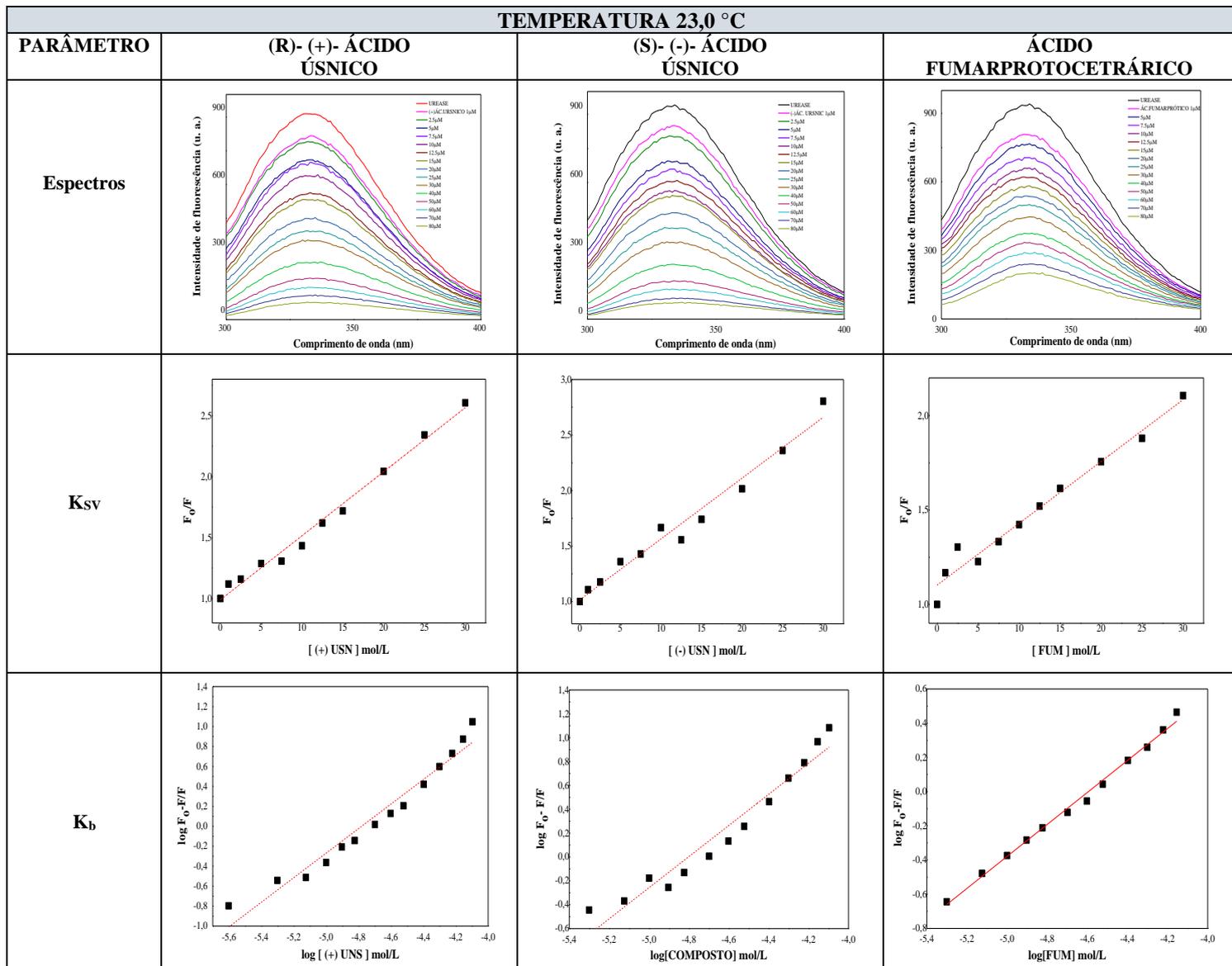
ZSILA, F. Circular dichroism spectroscopic detection of ligand binding induced subdomain IB specific structural adjustment of human serum albumin. **The Journal of Physical Chemistry** , v. 117, p. 10798-10806, 2013.

ZSILA, F.; BIKADI, Z.; MALIK, D.; HARI, P.; PECHAN, I.; BERCES, A.; HAZAI, E. Evaluation of drug-human serum albumin binding interactions with support vector machine aided online automated docking. **Bioinformatics**, v. 27, p. 1806-13, 2011.

ZSILA, F.; BIKADI, Z.; SIMONYI, M. Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods. **Biochem. Pharmacol**, v. 65, p. 447-456, 2003.

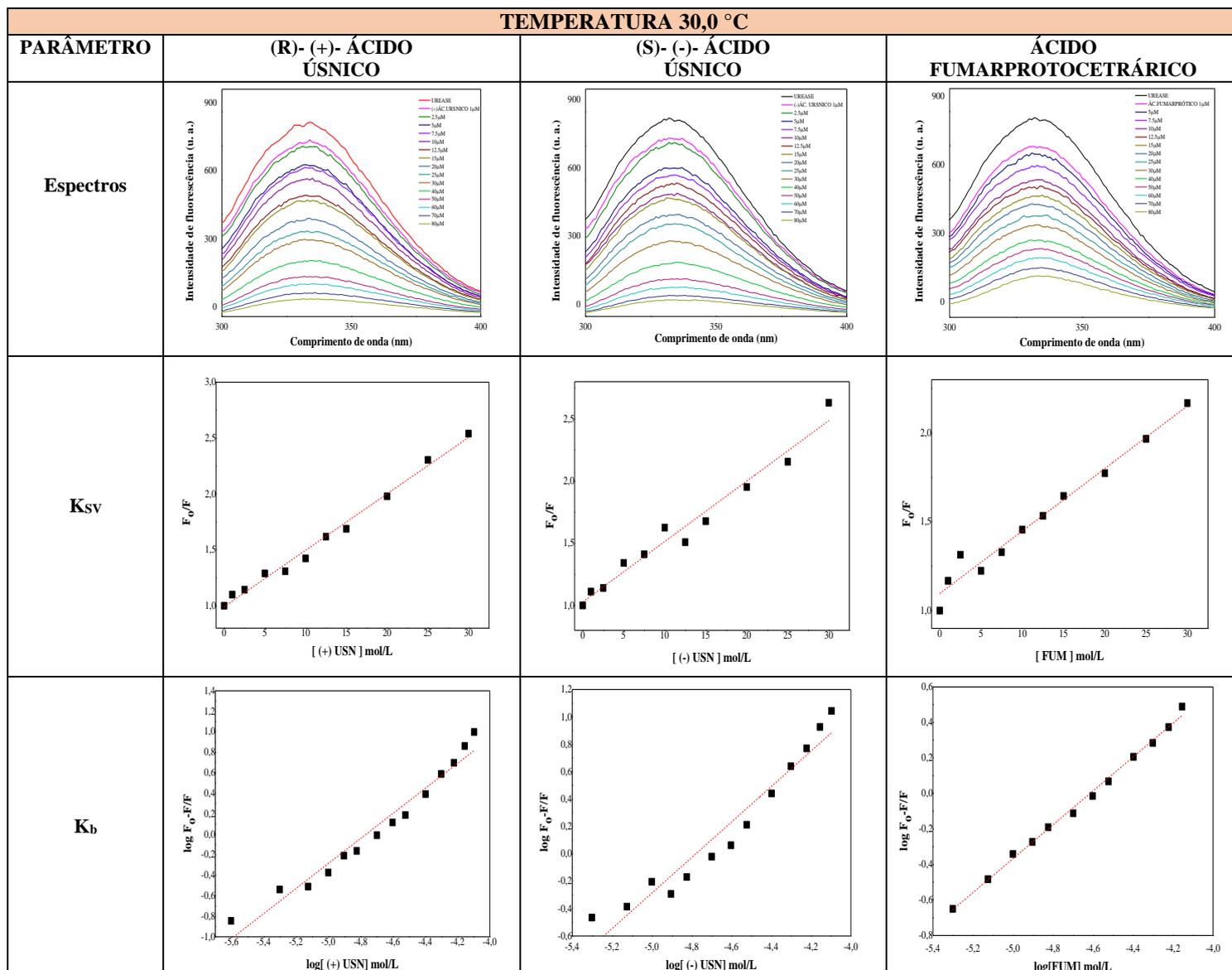
APÊNDICE I

Figura 35. Titulação espectrofluorimétrica da urease (1,0 μM) em pH 7,4 (23 $^{\circ}\text{C}$) para (R)- (+)- ácido úsnico; (S)- (-)- ácido úsnico; ácido fumarprotocetrárico.



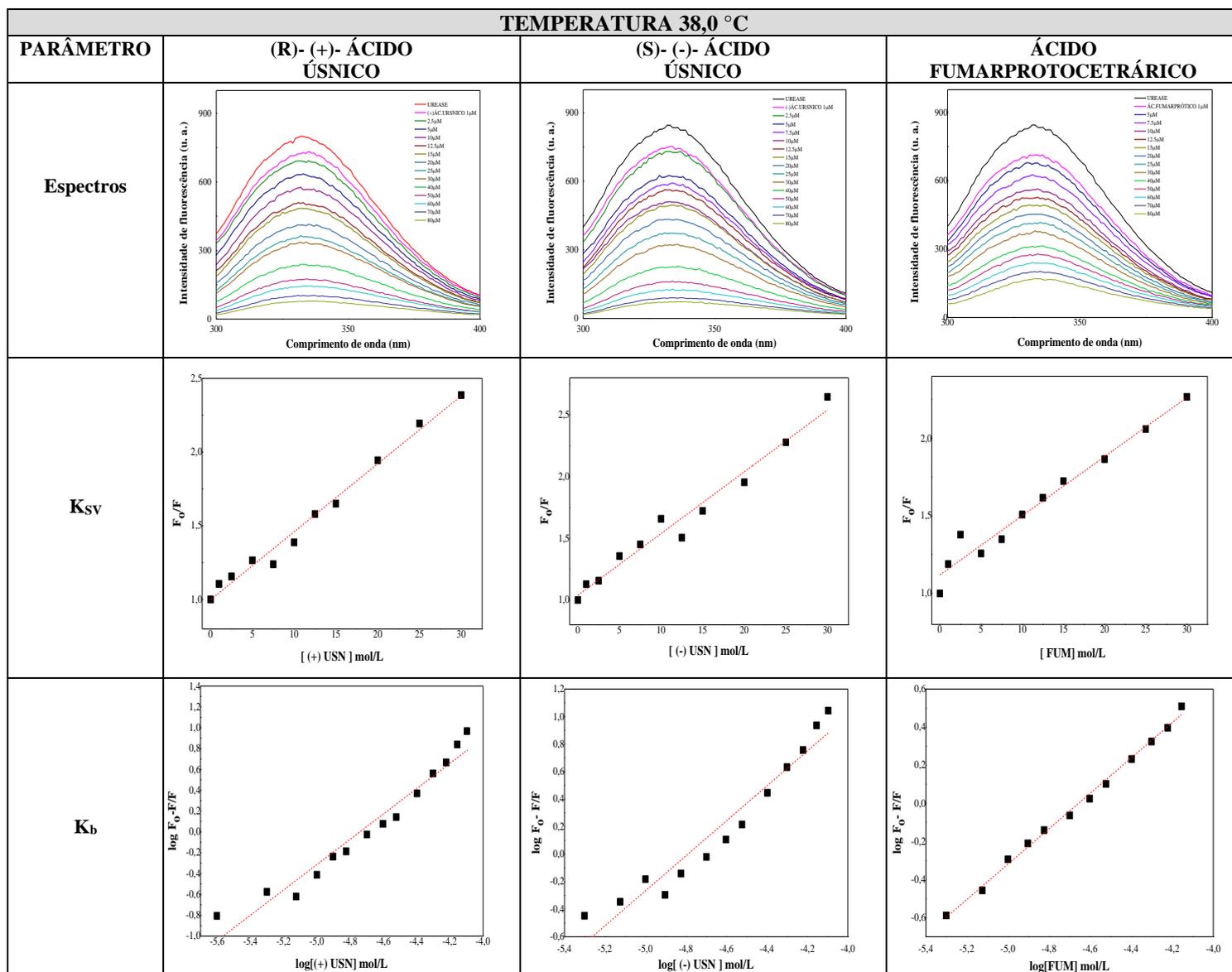
APÊNDICE II

Figura 36- Titulação espectrofluorimétrica da urease (1,0 μM) em pH 7,4 (30 $^{\circ}\text{C}$) para (R)- (+)- ácido úsnico; (S)- (-)- ácido úsnico; ácido fumarprotocetrárico.



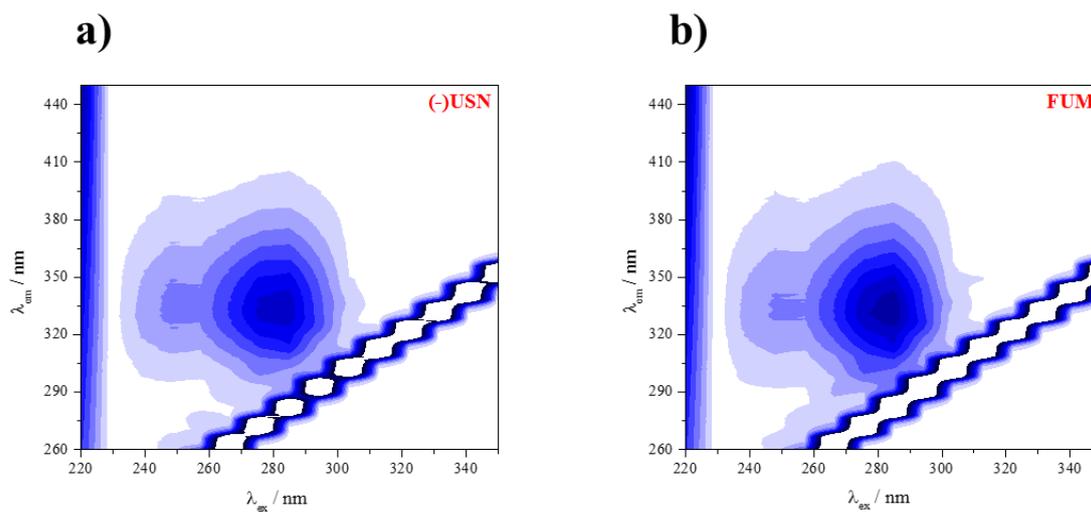
APÊNDICE III

Figura 37- Titulação espectrofluorimétrica da urease (1,0 μM) em pH 7,4 (38 $^{\circ}\text{C}$) para (R)- (+)- ácido úsnico; (S)- (-)- ácido úsnico; ácido fumarprotocetrárico.



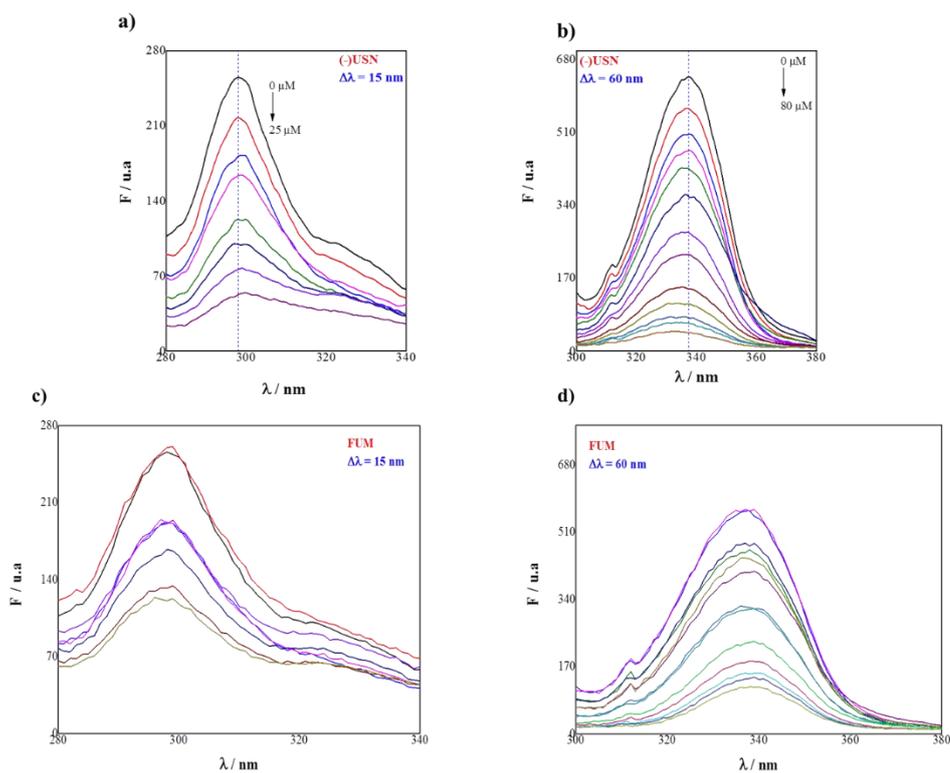
APÊNDICE IV

Figura 38- Espectros de fluorescência tridimensional para a urease complexada com: a) (S) - (-)USN; b) FUM, em pH 7,40. Enzima e ligante foram utilizados em 1,0 e 10 μ M, respectivamente.



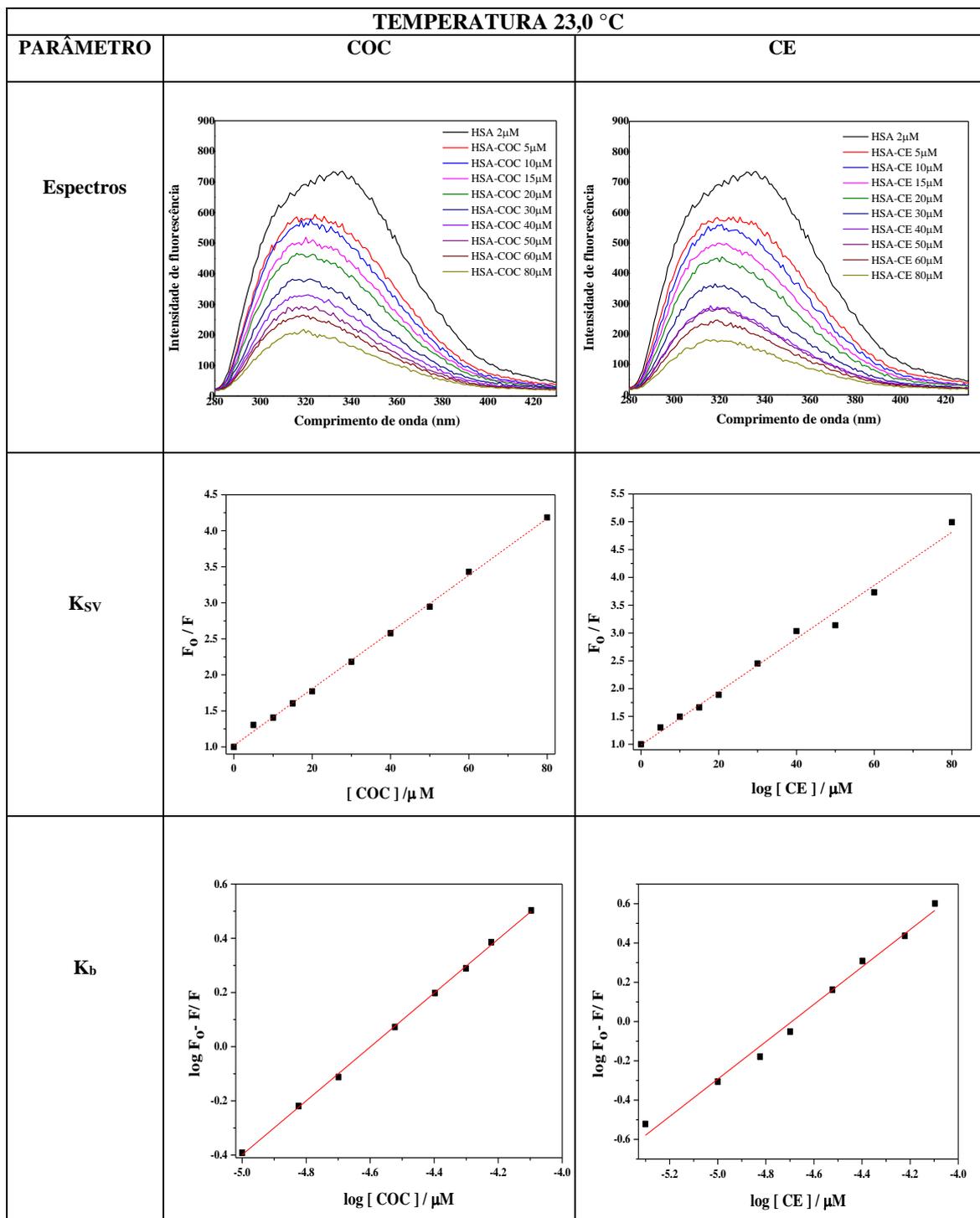
APÊNDICE V

Figura 39- Espectros de fluorescência sincronizado da urease (1,0 μM) após a adição de concentrações crescentes de: (S) - (-) - USN em pH 7,4, monitorando (a) λ igual a 15 nm (resíduos Tyr); (b) λ igual a 60 nm (resíduos Trp) e FUM em pH 7,4, monitorando (c) λ igual a 15 nm (resíduos Tyr); (d) λ igual a 60 nm (resíduos Trp).



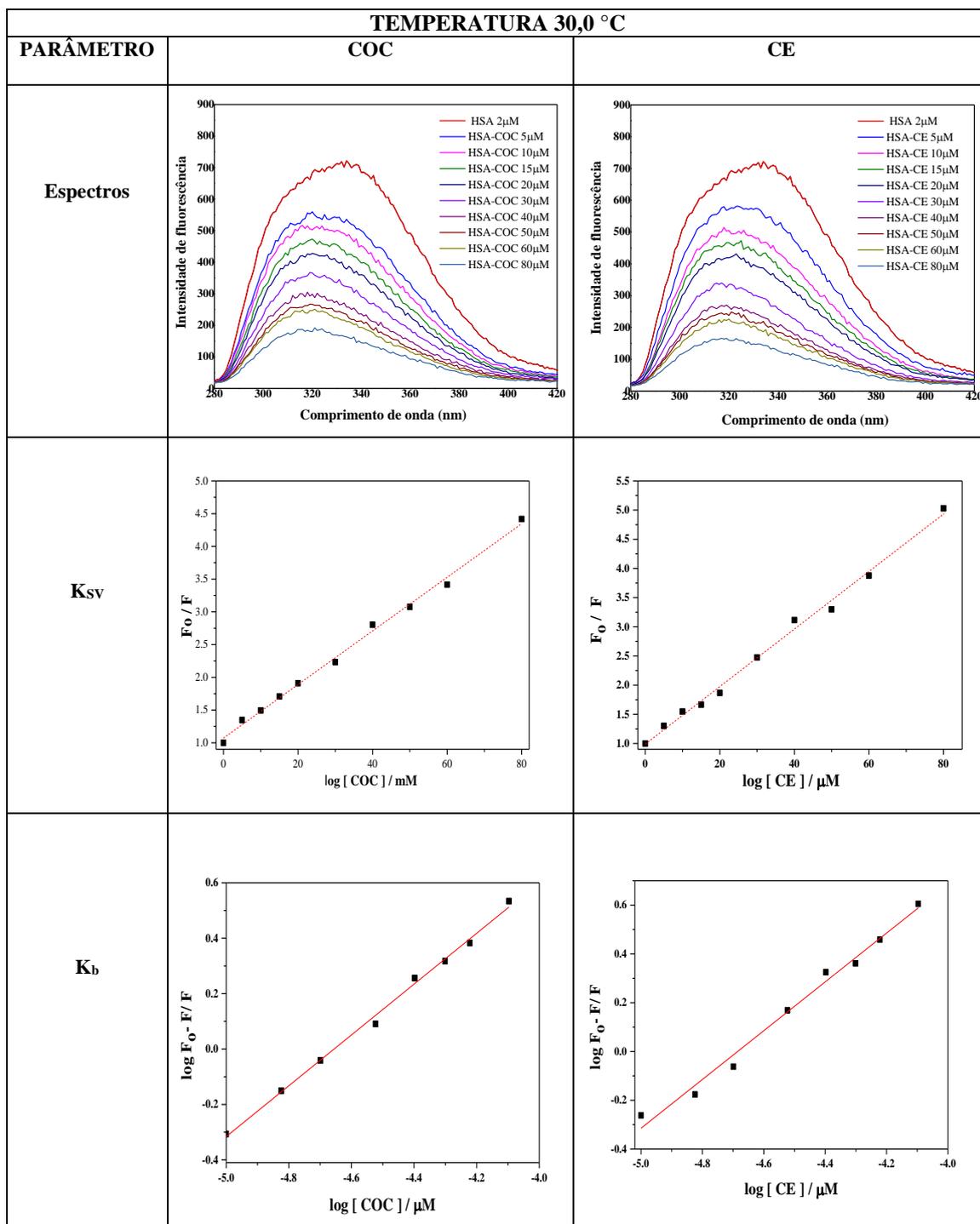
APÊNDICE VI

Figura 40- Titulação espectrofluorimétrica da HSA (2,0 μM) em pH 7,4 (23 $^{\circ}\text{C}$) para COC e CE.



APÊNDICE VII

Figura 41- Titulação espectrofluorimétrica da HSA (2,0 μM) em pH 7,4 (30 $^{\circ}\text{C}$) para COC e CE.



APÊNDICE VIII

Figura 42- Titulação espectrofluorimétrica da HSA (2,0 μM) em pH 7,4 (37 $^{\circ}\text{C}$) para COC e CE.

