

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

ISABELLA MIRANDA DA SILVA

**INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE
ARSÊNIO(V) E PROTEÍNA CARREADORA EMPREGANDO
TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

**Maceió – AL
2017**

ISABELLA MIRANDA DA SILVA

**INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE
ARSÊNIO(V) E PROTEÍNA CARREADORA EMPREGANDO
TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Maceió – AL
2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586i Silva, Isabella Miranda da.
Interação in vitro entre compostos orgânicos de arsênio (V) e proteína carreadora empregando técnicas espectroscópicas / Isabella Miranda da Silva. – 2017.
87 f.: il.

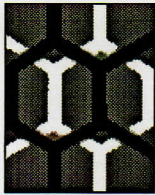
Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.

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

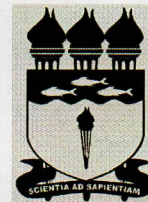
Bibliografia: f. 76-87.

1. Albumina. 2. Aditivo alimentar. 3. Complexo supramolecular. 4. Roxarsone. 5. Acetarsona. 6. Compostos de arsênio (V). I. Título

CDU: 543.645.6



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

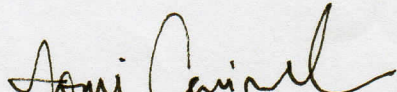


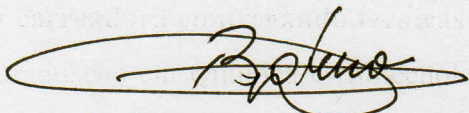
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

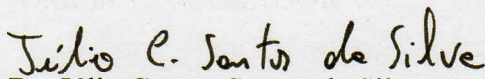
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Isabella Miranda da Silva**, intitulada: “**Interação *in vitro* entre compostos orgânicos de arsênio(V) e proteína carreadora empregando técnicas espectroscópicas**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 15 de março de 2017, às 14h, na Sala de Reuniões do IQB.

COMISSÃO JULGADORA


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


Prof. Dr. Wander Gustavo Botero
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Júlio Cosme Santos da Silva
(IQB/UFAL)

Dedico este trabalho ao Júlio, por todo o amor e por acreditar em mim até mesmo quando eu duvidei.

RESUMO

A albumina do soro bovino (BSA) é a proteína mais abundante do plasma e responsável pelo transporte da maioria dos compostos exógenos e endógenos presentes no sangue. Roxarsone (RX) e seu metabólito acetarsone (AC) são compostos orgânicos de arsênio(V) empregados na avicultura como aditivo alimentar. Neste sentido, o processo de interação dos compostos RX e AC com a BSA foi avaliado sob condições fisiológicas utilizando técnicas espectroscópicas. Empregando fluorescência molecular foi possível determinar a formação do complexo supramolecular para os ligantes RX e AC. O grau de interação foi moderado, com constante de ligação (K_b) de $4,27 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ e $0,27 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ para RX e AC, respectivamente. O tipo de *quenching* envolvido no processo de interação para ambos os ligantes foi estático e, preferencialmente, por interações de natureza eletrostática para o complexo BSA-RX e ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals para BSA-AC. Tanto a formação do complexo quanto o tipo de *quenching* foram confirmados por espectroscopia de UV-vis. A análise por fluorescência 3D evidenciou mudanças estruturais na cadeia polipeptídica da BSA, sendo mais pronunciadas na presença do ligante RX em comparação ao AC. Ademais, o processo de interação BSA-RX modificou a superfície da BSA, levando à redução de regiões hidrofóbicas de forma mais efetiva em comparação à BSA-AC. Com relação ao sítio de ligação, ambos os ligantes encontram-se preferencialmente no sítio II da BSA. A partir dos resultados obtidos por RMN ^1H observou-se maior deslocamento químico na presença do ligante AC, estando a porção próxima ao grupamento amida interagindo com a BSA. Enquanto que o ligante RX possivelmente interage mais superficialmente na proteína. Além disso, os ligantes RX e AC não favorecem a cinética de fibrilação proteica, dando indícios que os possíveis efeitos deletérios no sistema *in vitro* avaliado não estão relacionados a este processo. A cinética de inibição da fosfatase alcalina demonstrou inibição da atividade enzimática a partir de 5 min e estabilização do sinal em 55 min de análise tanto para o RX quanto para o arseniato (controle positivo). Por fim, a avaliação da inibição da atividade da fosfatase alcalina *in vitro* evidenciou inibição da atividade enzimática em 42% na presença do ligante RX e 5% para o ligante AC, dando indícios de efeitos mais prejudiciais para o RX quando comparado ao AC.

Palavras chaves: Albumina. Aditivo alimentar. Complexo supramolecular. Roxarsone. Acetarsone. Compostos de arsênio (V).

ABSTRACT

Bovine serum albumin (BSA) is the most abundant protein in plasma and it is responsible for the transport of most of the exogenous and endogenous compounds present in blood. Roxarsone (RX) and its metabolite acetarsone (AC) are organic compounds of arsenic(V) used in poultry as a food additive. In this sense, the interaction process of RX and AC compounds with BSA was evaluated under physiological conditions using spectroscopic techniques. It was possible to determine the formation of a supramolecular complex between RX and AC ligands using molecular fluorescence. The interaction degree was moderate, with a binding constant (K_b) of $4.27 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ and $0.27 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ for RX and AC, respectively. The quenching mechanism involved in the interaction process for both ligands was static and, preferably, by electrostatic interactions to the BSA-RX complex and hydrogen bonds and Van der Waals forces to BSA-AC. Both the formation of the complex and the quenching mechanism were confirmed by UV-vis spectroscopy. The 3D fluorescence analysis evidenced structural changes in the BSA polypeptide chain, being more pronounced in the presence of the RX ligand in comparison to AC. In addition, the BSA-RX interaction process modified the BSA surface, leading to reduction of hydrophobic regions more effectively compared to BSA-AC. About the binding site, both ligands are preferably in the site II of BSA. From the results obtained by ^1H NMR, greater chemical shift was observed in the presence of the AC ligand, being the region close to amide group interacting with BSA, while the RX ligand possibly interacts more superficially in the protein. Thus, the RX and AC ligands do not favor the kinetics of protein fibrillation, giving indications that the possible deleterious effects in the evaluated *in vitro* system are not related to this process. Alkaline phosphatase inhibition kinetics demonstrated inhibition of enzymatic activity from 5 min and signal stabilization in 55 min of analysis for both RX and arsenate (positive control). Finally, the evaluation of *in vitro* alkaline phosphatase activity showed inhibition of enzymatic activity in 42% in the presence of the RX ligand and 5% in the AC ligand, giving indications of more detrimental effects for RX when compared to AC.

Keywords: Albumin. Food additive. Supramolecular complex. Roxarsone. Acetarsone. Arsenic compounds (V).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente a Deus, por estar sempre ao meu lado e me dar forças em todos os momentos, principalmente naqueles em que mais pensei em desistir.

Em especial ao meu amado Júlio, pois é a pessoa mais incentivadora e a quem dedico este trabalho. Gostaria de agradecer por todo amor, paciência, cuidado e, principalmente, por acreditar indubitavelmente em mim.

À minha mãe, pois foi a primeira pessoa que incentivou a correr atrás dos meus objetivos.

Aos meus “amigos-irmãos” por compartilhar comigo tanto momentos bons quanto ruins. Gostaria de agradecer por todo o suporte à Andréia que, além de ser minha prima, é minha melhor amiga e quem eu confio de olhos fechados. À querida Paulinha por toda a força, conselhos e por, em muitos momentos, ter sido meu suporte. À querida Viviane que, nos momentos mais agustiantes, conseguia reanimar-me e fazer com que eu seguisse sempre em frente. Aos meus amigos não tão presentes, mas muito especiais, Grazi, Manu e Flávia.

Aos meus sogros, Janúzia e Paulo, pois sempre se fizeram presentes e que muitas vezes assumiram papel de pais.

Gostaria de agradecer também ao meu orientador versátil, Dr. Josué Carinhonha Caldas Santos, por todo o suporte e que, durante toda a minha iniciação científica e mestrado, puxou muito a minha orelha, mas me proporcionou muito aprendizado e evolução acadêmica.

À professora Ísis por todo o suporte nos ensaios de RMN ^1H e pelo tempo disponível para tirar minhas dúvidas.

A todos da família LINQA, por ser um grupo de pesquisa excepcional. Durante todo esse tempo aprendi muito, compartilhei muitos momentos bons e que guardarei com carinho por toda a minha vida. Gostaria de agradecer em especial ao João César, que se mostrou um amigo para todas as horas. Um cara que, apesar da opinião política, consegue manter uma paz interior inigualável, mesmo estando em uma guerra. A querida Carol (pp) por sempre estar presente e por compartilhar comigo momentos tão agradáveis. À Fafá por toda ajuda e amizade. À minha quase IC, Amanda, pelos momentos de descontração e trocas acadêmicas. À Marina por todo o suporte e conversas incentivadoras. Aos doutorandos Ellysson e Woodland por todo o suporte e conversas inusitadas. Ao Alysson e ao mais novo mestrando Guimarães pelas risadas compartilhadas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de sistemas de reconhecimento molecular: interação antígeno-anticorpo.....	13
Figura 2 - Interação proteína-ligante evidenciando as possíveis ligações não covalentes que podem estar envolvidas no processo.	13
Figura 3 - Representação do arcabouço da albumina do soro bovino (BSA), demonstrando os dois resíduos de triptofano (Trp134 e Trp213), sítios preferenciais de ligação (I e II), domínios (I, II e III) e os respectivos subdomínios (IA, IIA, IIIA, IB, IIB e IIIB)	16
Figura 4 - Estrutura química dos resíduos de aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina e as principais características fluorescentes destes aminoácidos aromáticos.....	20
Figura 5 - (A) Representação genérica de um sistema com transferência de energia e (B) Representação da transferência de energia entre um doador eceptor.....	23
Figura 6 - Ilustração do mecanismo de competição entre marcador (M) e ligante (L) pelo mesmo sítio ativo na proteína. O deslocamento do equilíbrio de ligação proteína/marcador reduz o valor da constante de ligação deste sistema.....	26
Figura 7 - (A) Estrutura da sonda ANS e (B) Esquema da sonda ANS que fluoresce ao interagir com regiões hidrofóbicas da proteína.....	27
Figura 8 - (A) Representação de fibrilas de amiloide da proteína HET-s fungo <i>Podospora anserina</i> , (B) Estrutura química da ThT, (C) Gráfico da intensidade de fluorescência antes e após a ligação da ThT com as fibrilas amilóides e (D) Microscopia de imagem de fibrilas do tecido de glucagon ramificada coradas com ThT.....	30
Figura 9 - Hidrólise da sonda 4-MUP na presença da enzima fosfatase alcalina gerando como produto o fluoróforo 4-MU e monohidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) em pH 9-10.	32
Figura 10 - Via metabólica de transformação do roxarsone à AHBA (3-amino-4-hidroxibenzeno arsenato) por microorganismos e, em seguida, acetarsone por fontes animais e humanas.....	34
Figura 11 - Concentrações média de arsenicais em produtos avícolas em redes de fast food.....	35
Figura 12 - (A) Espectro de fluorescência da BSA ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) com adição de incrementos de RX ($0-350 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) Curva linear para cálculo de Stern-Volmer no processo de quenching; (C) Curva para determinação da constante de ligação	45
Figura 13 - Em (A) estão representados o equilíbrio ácido-base das espécies de RX (A1) e gráfico de distribuição de espécies de RX (A2). Em (B) estão representados o equilíbrio ácido-base das espécies de AC (B1) e o gráfico de distribuição de espécies de AC (A2).	49
Figura 14 - Cinética reacional de formação do complexo durante o período de 60 min.....	51
Figura 15 - Espectros de absorção de UV-vis para: (A) BSA ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), RX ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$), complexo BSA+RX e a diferença dos espectros (BSA+RX) - RX e, (B) BSA ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), AC ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$), complexo BSA+AC e a diferença dos espectros (BSA+AC) - AC.....	52
Figura 16 - Avaliação do efeito do NaCl ($0-150 \text{mmol L}^{-1}$) no processo de interação para os sistemas BSA-RX e BSA-AC	53
Figura 17 - Gráfico da fluorescência tridimensional para BSA ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) (A), BSA+RX ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$) (B) e (C) BSA+AC ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$)	55

Figura 18 - (A) Espectro de emissão sincronizado para os resíduos de tirosina ($\Delta\lambda = 15$ nm) e triptofano ($\Delta\lambda = 60$ nm) da BSA livre. Titulação empregando fluorescência sincronizada para os resíduos de: (B) Tir e (C) Trp, com adição de incrementos de RX (0-350 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	57
Figura 19 - Espectro de fluorescência do complexo ANS-BSA com adição dos ligantes (A) RX e (B) AC, sendo ANS (2 $\mu\text{mol L}^{-1}$), BSA (2 $\mu\text{mol L}^{-1}$), RX e AC (0-350 $\mu\text{mol L}^{-1}$). (C) Perfil da ligação do ANS (0-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a BSA (2 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na ausência presença dos ligantes RX e AC	58
Figura 20 - Estrutura química dos marcadores (A) varfarina, (B) ibuprofeno e (C) diazepam na condição fisiológica de pH (7,4).....	60
Figura 21 - Avaliação do sítio de ligação na BSA (2 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a partir da razão dos valores de K_b em na ausência e presença dos marcadores (2 $\mu\text{mol L}^{-1}$) varfarina, ibuprofeno e diazepam para os ligantes (A) RX e (B) AC	60
Figura 22 - Efeito dos competidores entre a razão dos valores de K_b na ausência e presença dos competidores para a interação da BSA com RX a AC.....	62
Figura 23 - Área de sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência da BSA e o espectro de absorção dos ligantes RX (A) e AC (B).	64
Figura 24 - Espectros de RMN ^1H (400 MHz) para 1 mmol L^{-1} do ligante RX na presença de BSA para RX/BSA=50 e RX/BSA=100.....	65
Figura 25 - Espectros de RMN ^1H (400 MHz) para 1 mmol L^{-1} do ligante AC na presença de BSA para AC/BSA=50 e AC/BSA=100.....	66
Figura 26 - Cinética de fibrilação para a BSA na presença e ausência dos ligantes RX, AC e As(V), todos a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	67
Figura 27 - Avaliação da inibição da fosfatase alcalina (14,8 U L^{-1}) pelo arseniato, RX e AC em diferentes concentrações (1, 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	69
Figura 28 - Cinética da atividade enzimática da fosfatase alcalina (7,4 U L^{-1}) na presença dos compostos arseniato (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e RX (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dose letal (DL) para matar 50% de uma população de ratos para diferentes espécies de arsênio.	34
Tabela 2 - Parâmetros termodinâmicos e de ligação referentes a interação da BSA e os ligantes RX e AC. Condições: pH 7,4	47
Tabela 3-Dados de fluorescência tridimensional para os sistemas BSA, BSA+RX e BSA+AC.	55
Tabela 4 - Valores de K_{SV} relativos a titulação por fluorescência sincronizada para a interação BSA com os ligantes RX e AC). Condições: pH 7,4 a 30°C.	57
Tabela 5 - Valores de K_d , $F_{m\acute{a}x}/[BSA]$ e PSH para os sistemas BSA+ANS, BSA+ANS+RX e BSA+ANS+AC	59
Tabela 6 - Espécies presentes no plasma e soro humano.	61
Tabela 7 - Valores de J, E, R_0 e r_0 para a interação dos ligantes RX e AC nas razões 1:1 e 1:2 de BSA:L (ligante)	63
Tabela 8 - Deslocamento químico (δ) RMN 1H (400 MHz) para os ligantes (L) RX e AC na ausência e presença de diferentes concentrações da BSA. a) L, b) L/BSA = 50, c) L/BSA = 100, em tampão fosfato (10 mmol L $^{-1}$), pH 7,4.....	65
Tabela 9 - Parâmetros cinéticos do processo de fibrilação da BSA para RX, AC e As(V). 67	

LISTA DE ABREVIATURA e SIGLAS

3D	Tridimensional
A	Absorvância
AC	Acetarsone
ANS	Ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato
BSA	Albumina do Soro Bovino
Cis	Cisteína
COA(V)	Compostos Orgânicos de Arsênio(V)
DMSO	Dimetilsulfóxido DNA
F	Fluorescência
F ₀	Fluorescência na ausência do ligante
FNUAP	Fundo de População das Nações Unidas
FRET	Transferência de energia por ressonância de fluorescência
HSA	Albumina do Soro Humano
HSP	Índice de hidrofobicidade na superfície da proteína
ICP-MS	Espectrometria de Massa por Plasma Indutivamente Acoplado
K _b	Constante de ligaçãoF
K _{SV}	Constante de Stern-Volmer
MHz	Megahertz
n	Número de sítios de ligação do complexo
nm	Nanômetros
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoeletrônico
pKa	Constante de dissociação
PSH	Índice de Hidrofobicidade da Proteína
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RX	Roxarsone
ThT	Tioflavina T
Tir	Tirosina
TMSP	Trimetilsililpropianato de sódio
Trp	Triptofano
UV	Ultravioleta
UV – Vis	Ultravioleta no visível
ΔG	Energia livre de Gibbs
ΔH	Entalpia
ΔS	Entropia
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 A importância dos estudos de interação com proteínas – moléculas biologicamente funcionais.....	12
1.2 Proteínas do soro – a chave biológica para transporte de moléculas	14
1.2.1 Albumina do soro bovino (BSA) – alicerce biomimético em estudos de interação	15
1.3 A química supramolecular relacionada à interação proteína-ligante	16
1.4 Técnicas empregadas para o estudo da interação proteína-ligante <i>in vitro</i>	17
1.4.1 Espectroscopia de absorção no UV-visível	18
1.4.2 Espectroscopia de fluorescência molecular.....	19
1.4.3 <i>Quenching</i> de fluorescência	20
1.4.4 Análise do equilíbrio de ligação - constante de ligação (K_b).....	21
1.4.5 Parâmetros termodinâmicos e natureza das forças de ligação macromolécula-ligante	22
1.4.6 Transferência de energia por ressonância de Förster (FRET).....	23
1.4.8 Análise por Fluorescência tridimensional (fluorescência 3D).....	25
1.4.9 Avaliação de sítios de ligação e grau de hidrofobicidade da BSA por ensaios de competição	25
1.4.10 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	28
1.4.11 Avaliação <i>in vitro</i> do efeito prejudicial dos COA(V) à funcionalidade de proteínas	29
1.4.11.1 Ensaio de fibrilação de proteínas	29
1.4.11.2 Avaliação da atividade da fosfatase alcalina	31
1.5 Interação de proteínas com espécies de arsênio.....	32
1.6 Compostos orgânicos de arsênio(V) - COA(V)	33
1.7 JUSTIFICATIVA	36
2 OBJETIVOS	38
2.1 Geral	38
2.2 Específicos.....	38
3 EXPERIMENTAL	39
3.1 Reagentes e preparo das soluções.....	39
3.2 Equipamentos utilizados	40
3.3 Procedimentos.....	41
3.3.1 Espectros de fluorescência no estado estacionário	41
3.3.2 Parâmetros termodinâmicos e natureza das forças de ligação macromolécula-ligante	41

3.3.3 Interação proteína-ligante empregando fluorescência e UV-vis	41
3.3.4 Fluorescência 3D	42
3.3.5 Fluorescência sincronizada.....	42
3.3.6 Avaliação de regiões hidrofóbicas da proteína – sonda ANS	42
3.3.7 Estudo de competição dos sítios de ligação	42
3.3.8 Estudo de competição.....	43
3.3.9 Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET).....	43
3.3.10 Interação proteína-ligante por RMN ¹ H	43
3.3.11 Avaliação da cinética de fibrilação protéica	43
3.3.12 Avaliação da inibição da fosfatase alcalina.....	44
3.3.13 Avaliação cinética de inibição da fosfatase alcalina	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Quenching de fluorescência e a natureza das forças envolvidas no processo de interação macromolécula-ligante	45
4.2 Avaliação do complexo proteína-ligante por espectroscopia de UV-vis.....	51
4.3 Avaliação da força iônica no processo de interação.....	52
4.4 Investigação das mudanças conformacionais na estrutura da BSA.....	54
4.4.1 Fluorescência tridimensional.....	54
4.4.2 Fluorencência sincronizada	56
4.5 Determinação do índice de hidrofobicidade protéico – emprego da sonda ANS ...	57
4.6 Avaliação do sítio de ligação preferencial na BSA	59
4.7 Avaliação de competidores no processo de interação dos ligantes RX e AC	61
4.8 Transferência de Energia Ressonante de Förster - FRET	63
4.9 Avaliação da interação proteína-ligante por espectroscopia de RMN ¹H	64
4.10 Avaliação <i>in vitro</i> do efeito prejudicial dos COA(V) à funcionalidade de proteínas.....	66
4.10.1 Avaliação da cinética de fibrilação na formação de fibrilas amiloides	66
4.10.2 Avaliação da inibição e cinética da fosfatase alcalina	68
5 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

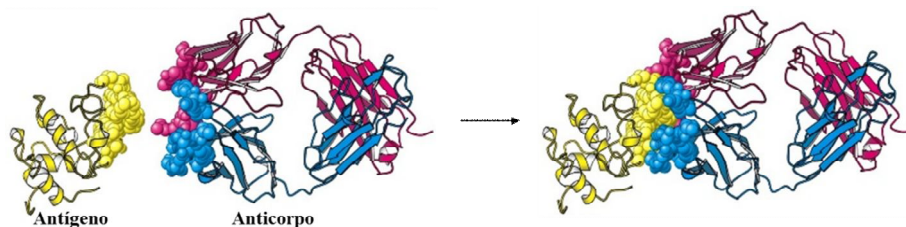
1.1 A importância dos estudos de interação com proteínas – moléculas biologicamente funcionais

As pesquisas relacionadas aos estudos de interação entre biomacromoléculas e ligantes envolvem um dos mais importantes tópicos no campo da bionanotecnologia, permitindo a projeção de sistemas artificiais miméticos de processos naturais (GURYANOV; FIORUCCI; TENNICOVA, 2016). Toda a atenção voltada para o estudo de interações deve-se às informações que se pode extrair do comportamento do ligante no organismo na presença da macromolécula biológica.

As proteínas são biomoléculas responsáveis em exercer inúmeras funções biológicas, sendo estas os blocos de construção de todas as células nos seres vivos. Mesmo que as informações necessárias para a perpetuação da vida sejam codificadas pelo DNA, o processo dinâmico de manutenção da vida, replicação, defesa e reprodução são realizados por proteínas (GRUBER et al., 2008). Em essência, as proteínas realizam suas funções biológicas a partir da interação físico-química direta com outras moléculas, tais como ligantes exógenos e endógenos, além de interagir com outras macromoléculas, como outras proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, membranas (lipídeos), dentre outras. Portanto, a compreensão detalhada das interações proteína-ligante é fundamental para compreender a biologia ao nível molecular. Além disso, o conhecimento dos mecanismos responsáveis pelo reconhecimento e ligação proteína-ligante auxilia na descoberta, planejamento e desenvolvimento de fármacos (LIU et al., 2016).

De forma simples, quando uma molécula de proteína (P) e uma molécula de ligante (L) com afinidade mútua interagem no mesmo sistema, forma-se um complexo proteína-ligante (PL), dependente do tempo. A ligação reversível da proteína com o ligante descreve o processo da cinética reacional proteína-ligante (PL), representado pelo seguinte equilíbrio: $P + L \rightleftharpoons PL$ (CHOWDHRY & HARDING, 2001). Este reconhecimento molecular é um dos princípios fundamentais dos sistemas vivos, envolvido em todos os processos biológicos, tais como: reconhecimento antígeno-anticorpo (Figura 1), formação de complexo receptor-ligante, interação hormônio-receptor, reações enzimáticas, transporte transmembranares, carreamento de compostos endógenos e exógenos pelo organismo, dentre outros (GURYANOV; FIORUCCI; TENNICOVA, 2016).

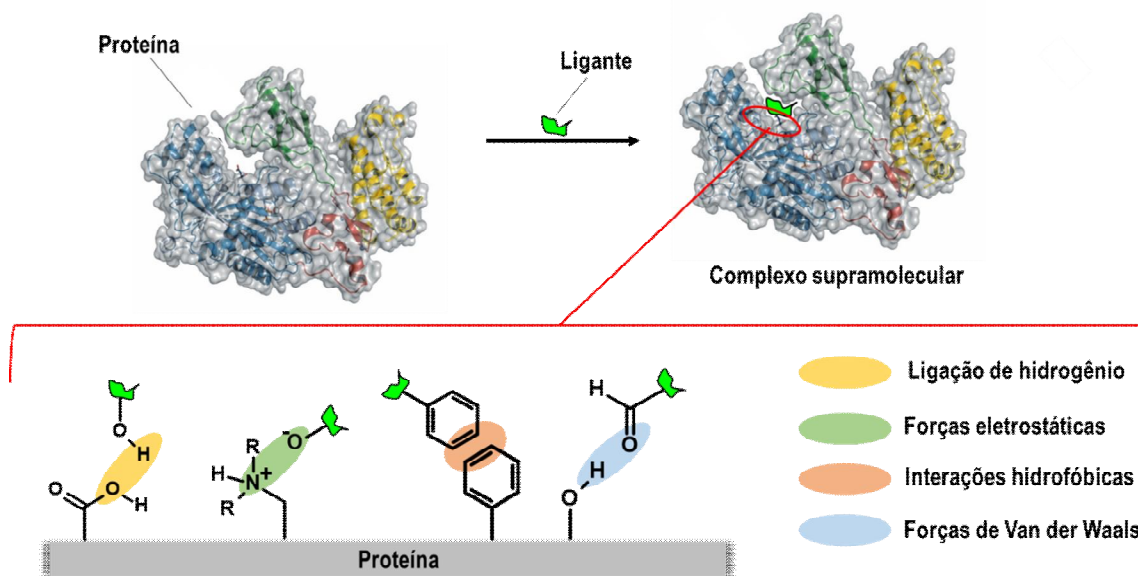
Figura 1 - Exemplos de sistemas de reconhecimento molecular: interação antígeno-anticorpo.



Fonte: TYMOCZKO; STRYER, 2012.

A interação receptor-ligante forma um par complementar com forças de ligação não covalentes formadas por forças de Van der Waals, hidrofóbica, do tipo π - π , interações iônicas ou eletrostáticas (HAJ-ZARUBI, 2002). Formação de pares receptor-ligante é um processo complexo e pode incluir diferentes fases, a depender das moléculas que estão interagindo (GURYANOV; FIORUCCI; TENNICOVA, 2016). A Figura 2 apresenta a interação de uma proteína com ligante apresentando as possíveis forças envolvidas no processo.

Figura 2 - Interação proteína-ligante evidenciando as possíveis interações não covalentes que podem estar envolvidas no processo.



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Dentre as inúmeras funções moleculares desempenhadas pelas proteínas, destaca-se a função transportadora não só devido à relevância biológica no organismo, como também por proporcionar informações preciosas sobre o metabolismo no corpo humano. Com isso, o estudo de interação com proteínas permite obter informações preciosas sobre o comportamento do ligante em sistemas biológicos, uma vez que esta macromolécula é a

principal responsável pelo transporte de milhares de compostos pelos compartimentos do corpo. A partir do grau de interação, é possível compreender a farmacocinética, farmacodinâmica, o tempo de meia vida e solubilidade do ligante em sistemas vivos ou simulando condições *in vitro* (LIU et al., 2016).

Existem diversos modelos de proteínas que podem ser empregados para o estudo de interações macromoléculas-ligante e fornecer informações relevantes sobre o comportamento da proteína e dados sobre a afinidade com o ligante. Algumas dessas proteínas usadas em estudos de interação são: hemoglobina (BASU, A; HAKRABARTI, 2015), albumina do soro humano (do inglês *Human Serum Albumin*, HSA) (TRYNDA-LEMIESZ, 2004), albumina do soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*, BSA) (NAFISI; SADEGHIC; YABA, 2011), ovalbumina (GÜLER et al., 2013) e lipase pancreática (HOLMBERG et al., 2000).

1.2 Proteínas do soro – a chave biológica para carregamento de moléculas

Na corrente sanguínea existe uma série de proteínas capazes de transportar moléculas até tecidos ou órgãos. Porém, nenhuma merece tanto destaque quanto a albumina do soro, não só por corresponder a ~60% do total de proteínas séricas, como também pela capacidade deste grupo de proteínas ligarem-se reversivelmente a uma gama de ligantes exógenos e endógenos, tais como drogas, ácidos graxos, hormônios, aminoácidos, dentre outros. A albumina também se liga a compostos tóxicos que entram na corrente sanguínea, podendo ser distribuído por todo o organismo ou ser biotransformado e excretado (SULTAN et al., 2015).

A concentração de albumina no plasma humano corresponde a 34-54 g L⁻¹, possuindo uma meia-vida circulatória de 19 dias (SLEEP; CAMERON; EVANS, 2013). A presença de múltiplos locais de ligação com diferentes tipos de afinidade afeta diretamente a biodisponibilidade de um determinado ligante no organismo. Além disso, a albumina do soro possui outras propriedades fisiológicas, tais como a regulação da pressão osmótica coloidal, sequestro de resíduos tóxicos, agente antioxidante e efeitos metabólicos (PETERS, 1996).

Devido à função transportadora, as albuminas são empregadas como modelo de proteína em bioquímica e biofísica, explorando a sua capacidade de interagir com diversos ligantes. Esta propriedade atribui grande importância a este grupo de proteínas, uma vez que a adsorção, distribuição, metabolismo e excreção dependem do grau de interação proteína-ligante (SULTAN et al., 2015). Além disso, a interação da albumina do soro com drogas proporciona uma visão sobre terapia medicamentosa e *design* de fármacos e, desta forma,

predizer sobre a eficácia de compostos como agente terapêutico a depender do grau de interação (WANG et al., 2008).

A capacidade de ligação da albumina a fármacos foi explorada no desenvolvimento das drogas Levemir[®] (insulina detemir – análogo da insulina) e Victoza[®] (Liraglutida - derivado de GLP-1) em que, a partir da ligação de um ácido graxo na cadeia dessas moléculas, ambas tiveram sua meia-vida prolongada de 4-6 min para 5-7 h e, ~2 min para 11-15 h, respectivamente (SLEEP; CAMERON; EVANS, 2013). A albumina do soro também pode melhorar a solubilidade de fármacos, uma vez que possui regiões que possibilitam a ligação a agentes hidrofóbicos (SULTAN et al., 2015).

1.2.1 Albumina do soro bovino (BSA) – alicerce biomimético em estudos de interação

A albumina do soro bovino (do inglês *bovine serum albumin*, BSA) é empregada em estudos biomiméticos de interação por apresentar custo mais reduzido em relação à albumina do soro humano (HSA). Além disso, a BSA possui elevada similaridade com a HSA, possuindo 76% de homologia na sequência de aminoácidos, fazendo com que ambas as albuminas possuam a mesma função. A estrutura tridimensional da BSA é muito semelhante à HSA *in natura* (SULTAN et al., 2015). Outro ponto entre estas proteínas é com relação à presença dos resíduos de triptofano que na BSA estão localizados na posição Trp¹³⁴ e Trp²¹³ (MAJOREK et al., 2012) e o único resíduo na HSA na posição Trp²¹⁴ (SUGIO et al., 1999). Os resíduos de triptofano Trp¹³⁴ e Trp²¹³ da BSA (Figura 3) estão localizados nos subdomínios IA e IIA, respectivamente (GIMÉNEZ et al., 2016).

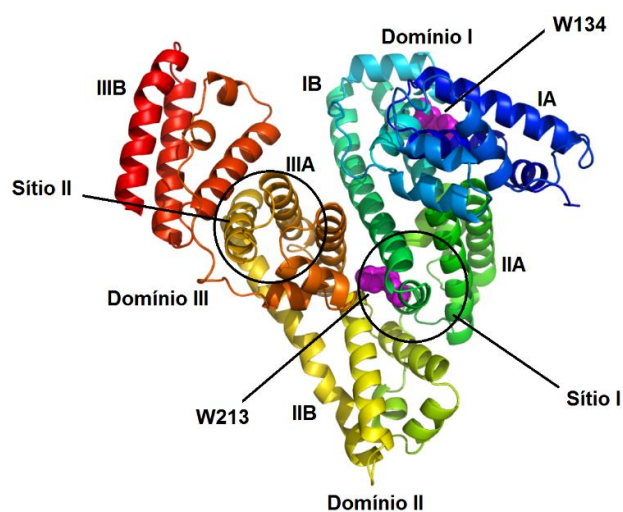
A BSA (Figura 3) é uma proteína globular estável e flexível, com uma cadeia única de polipeptídeo, composta por 583 resíduos de aminoácidos, com peso molecular de 66462 g mol⁻¹, três domínios homólogos (I-III) cada um contendo dois subdomínios (A e B) e, estabilizado por 17 pontes dissulfeto (BASU et al., 2012), possuindo um resíduo Cys¹³⁴ no subdomínio IA (SULKOWSKA, 2002).

A BSA possui dois sítios principais de ligação de compostos denominados sítio I e II de Sudlow, localizados nos subdomínios IIA e IIIA, respectivamente (SUDLOW; BIRKETT; WADE, 1975). O sítio I possui uma grande região, flexível, localizado internamente ao subdomínio IIA e, geralmente abriga compostos volumosos, heterocíclicos, aniônicos ou moléculas contendo regiões apolares (SOUZA et al., 2015). Devido ao seu volume, o sítio I pode abrigar mais de um ligante em seu interior e, desta forma, acredita-se que ele seja formado por um complexo de sítios sobrepostos. Curiosamente, a flexibilidade presente na

proteína permite que a mesma possa mudar sua estrutura conformacional ao interagir com um ligante (PETERS, 1996).

Já o sítio II está localizado no subdomínio IIIA da BSA e, geralmente, acomoda em sua cavidade ligantes aromáticos neutros ou aniônicos com carga localizada na periferia da molécula (SOUZA et al., 2015). A cavidade do sítio II possui um diâmetro entre 8-10 Å, localizado entre duas estruturas helicoidais e possui distribuição assimétrica de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos na fenda de ligação do sítio, porém os principais resíduos polares encontram-se internamente a cavidade hidrofóbica, enquanto que os resíduos polares na superfície da cavidade proteica (PEYRIN; GUILLAUME; GUINCHARD, 1999).

Figura 3 - Representação do arcabouço da albumina do soro bovino (BSA), demonstrando os dois resíduos de triptofano (Trp134 e Trp213), sítios preferenciais de ligação (I e II), domínios (I, II e III) e os respectivos subdomínios (IA, IIA, IIIA, IB, IIB e IIIB)



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

1.3 A química supramolecular relacionada à interação proteína-ligante

De modo geral, o reconhecimento molecular é um conceito chave na química supramolecular (GURYANOV; FIORUCCI; TENNICOVA, 2016), isto se deve ao fato de que a construção de todos os sistemas supramoleculares envolve a combinação molecular seletiva (ARIGA; KUNITAKE, 2006). De forma genérica, este processo pode ser descrito como o conjunto de interações de alta afinidade e seletiva de um ligante por um receptor. Os ligantes são substâncias de natureza variada que podem interagir com uma macromolécula, tais como peptídeos, proteínas, DNA/RNA, esteróides, partes de vírus ou bactérias. Às vezes, os ligantes contêm múltiplos locais de reconhecimento e, portanto, pode ligar-se em diferentes

regiões dos receptores. De todas as biomoléculas, as proteínas são provavelmente os mais atraentes, especialmente do ponto de vista estrutural e molecular. As proteínas estão envolvidas em praticamente todos os processos biológicos e a sua modulação supramolecular, por exemplo, com moléculas pequenas, é a base para a maioria das drogas (BRUNSVELD; PETKAU; UHLENHEUER, 2010).

Esta ligação multivalente pode aumentar drasticamente a afinidade da interação receptor-ligante (GURYANOV; FIORUCCI; TENNICOVA, 2016). A química supramolecular surgiu inicialmente com os estudos das biomoléculas (proteína, ácidos nucleicos, lipídios, entre outras) devido ao interesse pelos sistemas e processos biológicos, tais como no reconhecimento celular, sinalização, interações com drogas, dentre outros (SCHNEIDER, 2012).

De maneira concisa, a química supramolecular é muitas vezes definida como a química “além da molécula” ou interações não covalentes entre as moléculas (SCHNEIDER, 2012). Estruturas supramoleculares é o resultado de interações aditivas e que agem em conjunto ao sistema, estas incluem ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações coordenadas. As propriedades do sistema supramolecular são superiores quando comparadas a soma das propriedades de cada componente individualmente (ARIGA; KUNITAKE, 2006).

Assim, a química supramolecular é o estudo de interações não covalentes entre as moléculas e os complexos multimoleculares formados, indo além da molécula individual. As interações entre compostos e macromoléculas em sistemas biológicos são interações supramoleculares. As interações e funções de biomoléculas, como proteínas e lipídios, são moduladas em um ambiente onde o complexo supramolecular determina os processos biológicos. Desta forma, o controle sobre essas interações supramoleculares é a chave para a compreensão e direcionamento de muitos processos biológicos. A abordagem empregada na química supramolecular sobre o controle destes processos é através da modulação de biomoléculas específicas com ligantes pequenos. O foco na descoberta de medicamentos opera com base na química supramolecular, visto que uma droga se liga a uma proteína por interações supramoleculares hospedeiro-hóspede, influenciando o funcionamento e conformação da proteína (BRUNSVELD; PETKAU; UHLENHEUER, 2010).

1.4 Técnicas empregadas para o estudo da interação proteína-ligante *in vitro*

O objetivo da pesquisa sobre as interações proteína-ligante não é apenas estabelecer a estequiometria e as constantes de equilíbrio de associação/dissociação, como também

compreender em detalhes a relação entre função e reconhecimento molecular, estrutura, cinética, processo energético e dinâmico do sistema. Além disso, podem-se observar mudanças extremamente sutis ou até em grande escala nas propriedades locais ou globais na conformação tanto na proteína quanto no ligante. Tais mudanças podem ser da seguinte natureza: conformacional, tamanho da molécula, forma geométrica e topológica, distribuição de cargas, estado de hidratação/protonação, polaridade (hidrofobicidade, fatores relacionados à entropia intra e intermolecular), dentre outros (CHOWDHRY; HARDING, 2001).

Para isto, a fim de alcançar os objetivos da investigação de interações proteína-ligante uma abordagem multidisciplinar de técnicas deve ser adotada para avaliar as mudanças ocorridas devido ao processo de interação (CHOWDHRY; Z.; HARDING, 2001). Uma série de técnicas está disponível para a análise de interação de proteínas, *in vitro*, baseados no monitoramento de formação do complexo adicionando incrementos em concentrações definidas do ligante (PIEHLER, 2014).

Existem diversas técnicas diferentes para avaliar a interação de ligantes com proteínas, tais como: espectroscópicas (infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), dicroísmo circular (CD), ressonância magnética nuclear (RMN), fluorescência molecular e absorção no UV-vis), cromatografia líquida de alta performance (HPLC), eletroquímica, eletroforese capilar, química computacional, titulação calorimétrica isotérmica (ITC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (CHENG; JIANG; LIU, 2013).

1.4.1 Espectroscopia de absorção no UV-visível

A espectroscopia de UV-vis é uma técnica empregada para monitorar mudanças estruturais na proteína e investigar a formação do complexo proteína-ligante (RAUF et al., 2016). A formação do complexo pode ser confirmada ao se comparar a intensidade do sinal analítico antes e depois da adição do ligante, em que se observa aumento na absorção para o sistema proteína-ligante ao se comparar com perfil espectral apenas da proteína (YU et al., 2014).

Em proteínas, podem ser encontrados três cromóforos internos responsáveis pelo aumento na banda de absorção eletrônica: (1) a ligação peptídica que unem os aminoácidos absorve fracamente em torno de 210-220 nm; (2) os aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e tirosina apresentam uma banda característica em ~280 nm (HARDING; CHOWDHRY, 2001), e (3) presença de grupos prostéticos na estrutura da proteína podem

apresentar uma banda de absorção, sendo o comprimento de onda dependente da natureza do mesmo. Exemplo disto, é o grupo prostético heme presente na estrutura da hemoglobina que possui uma banda de absorção em torno de ~407 nm (WUANG et al., 2007). As proteínas que contêm grupos prostéticos e alguns complexos de metal-proteína, podem ter fortes bandas de absorção no espectro de UV-vis, possuindo bandas geralmente sensíveis ao ambiente local e, desta forma, pode ser objeto de estudos físicos de ação enzimática (WILSON; WALKER, 2010).

Interessante é que alguns aminoácidos (Asp, Glu, Asn, Gln, Arg e His) possuem fraca transição eletrônica em torno de 210 nm, porém esta banda não pode ser observada no espectro porque ela é “mascarada” pela absorção mais intensa do esqueleto peptídico. A banda mais útil para proteínas refere-se à absorção das cadeias laterais aromáticas presente nos resíduos de triptofano/tirosina. A fenilalanina possui uma banda de baixa absorção em 257 nm, enquanto que as bandas dos resíduos de triptofano e tirosina dominam o espectro de absorção da proteína em 274 nm e 280 nm, respectivamente e que, na prática, a presença destas duas cadeias laterais aromáticas dá origem a uma banda em ~278 nm (WILSON; WALKER, 2010).

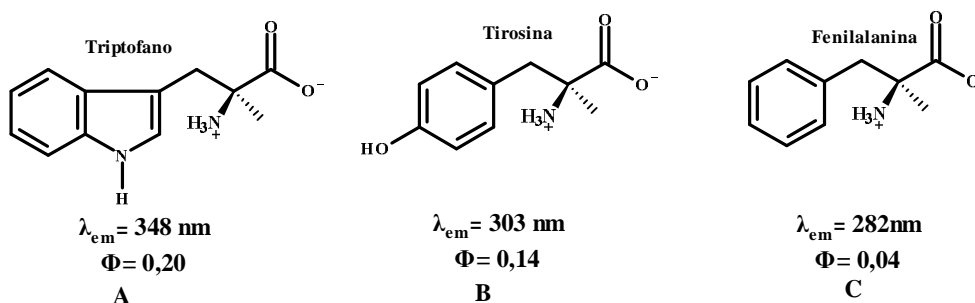
Com relação ao espectro de absorção da BSA, tem-se uma banda de absorção em ~210 nm de transição eletrônica do tipo $n \rightarrow \pi^*$, relacionada a amida da ligação peptídica presente no esqueleto polipeptídico (OZAKI; KAWATA, 2015). Enquanto que o pico de absorção em ~280 nm deve-se principalmente as transições do tipo $\pi-\pi^*$ nos resíduos de aminoácidos triptofano e tirosina presentes na estrutura da BSA (CHANG, 2005).

1.4.2 Espectroscopia de fluorescência molecular

Dentre as várias técnicas para estudar as interações proteína-ligante em solução, a espectroscopia de fluorescência é muito importante para o estudo da interação de substâncias com proteína por possuir elevada sensibilidade e seletividade, além de fornecer informações valiosas relacionadas ao processo (GHASEMI et al., 2016). As medições de fluorescência da macromolécula permitem obter informações sobre as mudanças estruturais e do microambiente em torno do fluoróforo na macromolécula (CHEN et al., 2007) e, desta forma, fornece muitas informações dos parâmetros de interação de ligantes à estrutura proteica, tais como mecanismo, o modo, constantes e sítio de ligação, além das distâncias intermoleculares entre proteína-ligante (SEETHARAMAPPAA et al., 2006).

A formação do complexo proteína-ligante pode induzir mudanças na conformação da proteína e, conseqüentemente, nos seus espectros de fluorescência. Os três resíduos de aminoácidos responsáveis pela fluorescência intrínseca em proteínas são a triptofano (Figura 4A), tirosina (Figura 4B) e fenilalanina (Figura 4C) (CARUSO et al., 2012). Nas proteínas que contenham todos os três aminoácidos o espectro de fluorescência deve-se principalmente ao resíduo de triptofano devido ao seu alto rendimento quântico frente aos demais resíduos. O rendimento quântico (Φ) para cada resíduo está expresso na Figura 4 em solução aquosa e pH fisiológico (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014).

Figura 4 - Estrutura química dos resíduos de aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina e as principais características fluorescentes destes aminoácidos aromáticos em pH fisiológico.



Fonte: GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014.

Uma característica valiosa da fluorescência intrínseca da proteína é a elevada sensibilidade do triptofano ao seu microambiente local. Alterações nos espectros de emissão do triptofano ocorrem em resposta a transições conformacionais da proteína, associação de subunidades, a ligação do substrato/ligante ou desnaturação. Assim, a fluorescência intrínseca das proteínas pode fornecer informações consideráveis sobre a sua estrutura e dinâmica (WUANG et al., 2007).

1.4.3 *Quenching* de fluorescência

O *quenching* de fluorescência tem sido amplamente estudado como uma fonte de informação sobre sistemas bioquímicos e o principal motivo está relacionado às interações moleculares. O processo de *quenching* de fluorescência refere-se a qualquer processo que diminui a intensidade de fluorescência de um fluoróforo por um *quencher* (um ligante, por exemplo) e resultante de uma variedade de interações/reações moleculares, tais como reações no estado excitado, rearranjos moleculares, a transferência de energia, a formação do

complexo no estado fundamental e colisões, entre outros processos (LAKOWICZ, 2006). Uma molécula capaz de reduzir a intensidade de fluorescência é denominada *quencher*, enquanto que fluoróforo são substâncias que absorvem luz no UV-vis e re-emitem parte desta luz como radiação em um comprimento de onda definido (SAUER; HOFKENS; ENDERLEIN, 2011).

O estudo de *quenching* permite inferir sobre o mecanismo envolvido no processo de interação proteína (fluoróforo) com ligante (*quencher*) que, neste caso, são geralmente classificados como *quenching* dinâmico ou estático (SEETHARAMAPPAA et al., 2006). O *quenching* dinâmico geralmente está relacionado à colisão molecular, enquanto que o *quenching* estático é geralmente associado à formação do complexo, tal como de uma proteína e um *quencher*, por exemplo (GHASEMI et al., 2016).

O *quenching* de colisão ou dinâmico ocorre quando o fluoróforo no estado excitado é desativado em contato com o *quencher* e, desta forma, o fluoróforo retorna ao estado fundamental durante processo de difusão com o fluoróforo, sem emissão de um fóton (LAKOWICZ, 2006). Já o *quenching* estático ocorre no estado fundamental e forma-se um complexo entre o fluoróforo e o *quencher*, sendo este complexo não fluorescente. Quando o complexo absorve luz, ele imediatamente retorna ao estado fundamental, sem a emissão de fóton (ALBANI, 2007).

A redução da intensidade de fluorescência para o processo de *quenching* pode ser descrita pela equação de Stern-Volmer abaixo:

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

Em que F_0 e F é a intensidade de fluorescência na ausência presença do *quencher*, respectivamente; $[Q]$ é a concentração do ligante que atua como *quencher* e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer (SHIA et al., 2016).

Para qualquer tipo de *quenching* ocorrer o fluoróforo e o *quencher* devem entrar em contato. Em geral, o *quenching* ocorre sem qualquer modificação permanente nas moléculas, ou seja, sem reação fotoquímica (LURIDIANA et al., 2016). A classificação do tipo de *quenching* para um sistema pode ser elucidado através da variação de temperatura, viscosidade ou medições do tempo de vida. O aumento da temperatura no processo dinâmico, por exemplo, favorece a difusão do *quencher* em direção ao fluoróforo no estado excitado. Desta forma, temperaturas mais elevadas induzem um aumento das colisões mútuas e, como

consequência, observa-se um aumento da constante de Stern-Volmer (K_{sv}). Já no caso do mecanismo estático, como há a formação de um complexo não fluorescente entre a fluoróforo e o *quencher* no estado fundamental, o aumento da temperatura do meio reacional diminui a estabilidade do complexo e, desta forma, diminuição dos valores de constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) com a elevação da temperatura (MOREIRA et al., 2015).

1.4.4 Análise do equilíbrio de ligação - constante de ligação (K_b)

Quando uma molécula liga-se ao sítio de ligação na macromolécula, estabelece-se um equilíbrio entre moléculas livres e conjugadas e o grau de interação do complexo formado é expresso pela constante de ligação (K_b). Existem diferentes tipos de equações que auxiliam no cálculo da constante de ligação, dentre as mais empregadas, destaca-se a equação abaixo:

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

Pelo qual se tem K_b , $[Q]$ e n são a constante de ligação, concentração do ligante e o número de sítios, respectivamente. Assim, um gráfico de $\log(F_0 - F)/F$ em função de $\log[Q]$ pode ser usado para determinar K_b e n de um sistema (KANDAGAL et al., 2006).

1.4.5 Parâmetros termodinâmicos e natureza das forças de ligação macromolécula-ligante

Considerando-se a dependência da constante de ligação com a temperatura, o processo termodinâmico é responsável pelo equilíbrio de formação do complexo. As principais forças que atuam entre um ligante e a macromolécula incluem ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interação hidrofóbica. Os parâmetros termodinâmicos: variação de entalpia (ΔH), variação de entropia (ΔS) e mudança de energia livre (ΔG) são as principais evidências para determinar o modo de ligação envolvido no processo de interação (KANDAGAL et al., 2006). Pelo gráfico $\ln K_b$ versus $1/T$ é possível obter os valores de ΔH e ΔS a partir do coeficiente angular e linear, respectivamente, aplicando a equação de Van't Hoff (PATGAR et al., 2016):

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

Onde R ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) é a constante dos gases, T é a temperatura experimental em $^{\circ}\text{C}$ e K_b é a constante de ligação de acordo com o valor de T (PATGAR et al., 2016). Em seguida, o valor de ΔG pode ser calculado através da equação:

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

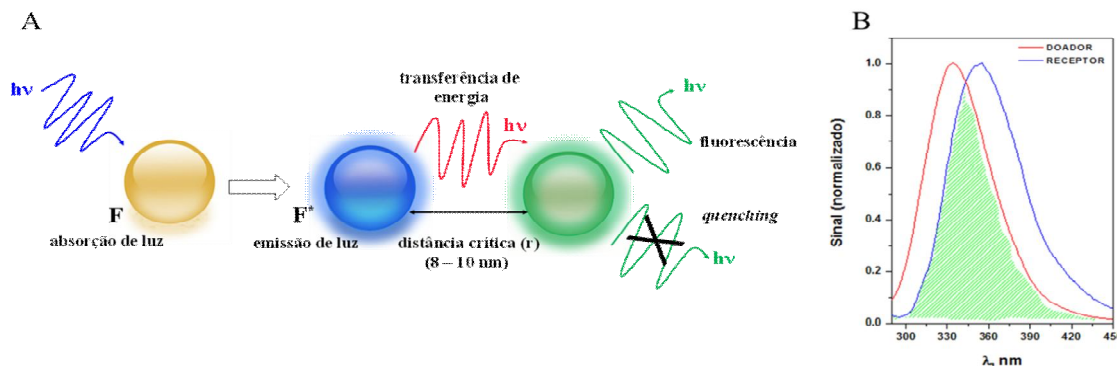
Os dados de ΔG informam se a interação macromolecular proteína-ligante ocorre de forma espontânea ou não e, desta forma, quando $\Delta G < 0$ o processo é espontâneo, enquanto que $\Delta G > 0$ o processo não é espontâneo (CHAVES et al., 2015).

A partir dos dados de ΔH e ΔS pode-se inferir sobre o modo de ligação envolvido no processo de interação macromolécula-ligante e, de acordo com os resultados, pode-se classificar em (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981): i) $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$: preferencialmente forças hidrofóbicas; ii) $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$: forças de van der Waals e ligações de hidrogênio, e iii) $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$: preferencialmente interações eletrostáticas.

1.4.6 Transferência de energia por ressonância de Förster (FRET)

A Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET) é um processo mecânico quântico fundamentado na transferência de energia de um doador (fluoróforo) em estado eletrônico excitado para um receptor (cromóforo/fluoróforo) através de interações dipolo-dipolo, sem emissão de fótons (SAHOO, 2011). Este processo fotofísico é frequentemente usado em ensaios experimentais que visam investigar a distância entre as moléculas e ocorre quando o espectro de emissão de um fluoróforo (doador) sobrepõe-se ao espectro de absorção de outra molécula (receptor) (LAKOWICZ, 2006) (Figura 5).

Figura 5 - (A) Representação genérica de um sistema com transferência de energia e (B) Representação gráfica da transferência de energia entre um doador e receptor.



A distância entre o doador e receptor está relacionada com a eficiência de transferência de energia e, de acordo com a teoria de Förster, a eficiência da transferência de energia de ressonância depende principalmente dos seguintes fatores: (a) grau de sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência do doador com espectro de absorção de acceptor, (b) orientação adequada do dipolo de transição do doador/acceptor e, (c) a distância entre o doador/acceptor deve estar no intervalo de 2-8 nm (SAHOO, 2011).

De acordo com a teoria do FRET, a transferência de energia está relacionada não só à distância entre o acceptor e doador, como também a distância crítica de Förster para transferência de energia (R_0) (BAI et al., 2016):

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

R_0 é a distância crítica de Förster quando a eficiência de transferência de energia é 50% doador/acceptor e r é a distância entre o doador e o receptor. O valor de R_0^6 é expresso através da equação abaixo (BAI et al., 2016):

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

Pelo qual Φ é o rendimento quântico de fluorescência do doador, n o índice de refração do meio, K^2 é o fator de orientação espacial do dipolo e J é a integral de sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência do doador e o espectro de absorção do acceptor (WANG et al., 2011). O valor de J pode ser calculado pela fórmula a seguir (BAI et al., 2016):

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

Uma vez que as proteínas podem conter fluoróforos intrínsecos, tais como o triptofano e tirosina, pode-se aplicar diretamente o ensaio de FRET com o objetivo de determinar a distância entre uma proteína e um determinado ligante (SAHOO, 2011).

1.4.7 Análise por fluorescência sincronizada

A fluorescência sincronizada é utilizada para monitorar o microambiente e mudanças conformacionais nos resíduos de triptofano (Trp) e tirosina (Tir) na proteína após o processo de interação. Para esta avaliação, mantém-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 em estudo (CHAKRABORTY; LEDWANI, 2016).

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

Nesta avaliação, a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) é o principal parâmetro para avaliar os resultados da fluorescência sincronizada. A partir de uma titulação com o ligante, o resíduo que apresentar maior K_{sv} é o que está mais próximo da região de interação (CHENG, Z; LIU; JIANG, 2013).

Em ensaios de interação de ligantes com proteínas, tais como BSA e HSA, sabe-se que quando ocorrem desvios do máximo de emissão, após interação, há mudanças no microambiente próximo a estes resíduos. Desvio para o vermelho no espectro dos resíduos de Trp e Tir está relacionado ao aumento da polaridade do microambiente devido à redução da hidrofobicidade na estrutura da proteína, além de indicar que este ambiente está mais acessível ao solvente. Em contraste, desvio para o azul indica à redução de polaridade deste microambiente e, conseqüentemente, aumento da hidrofobicidade devido a mudanças conformacionais na proteína (CHAKRABORTY; LEDWANI, 2016).

1.4.8 Análise por Fluorescência tridimensional (fluorescência 3D)

A técnica de fluorescência tridimensional tornou-se uma técnica bastante empregada nos últimos anos por fornecer informações detalhadas sobre mudanças conformacionais da proteína após interação com determinado ligante. Como a função proteica está diretamente

relacionada a sua estrutura, este tipo de avaliação é útil para identificar as regiões de possíveis mudanças estruturais (CHENG, Z; LIU; JIANG, 2013).

Neste estudo são obtidos três picos de emissão que traz subsídios para monitorar a cadeia polipeptídica e os resíduos de tirosina e triptofano. O primeiro pico é referente ao espalhamento da radiação (efeito Rayleigh) em que se tem igualdade entre o comprimento de onda de excitação e o de emissão ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$). Os resíduos de Trp e Tir são os responsáveis pelo segundo pico ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 285/340$ nm). O terceiro pico se deve a cadeia polipeptídica ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 238/335$ nm) devido às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ da carbonila presente na ligação peptídica. A partir de mudanças observadas nos picos do espectro em 3D é possível identificar as regiões que sofrem alterações na proteína. A partir da análise dos dados, caso indique mudanças nos picos de fluorescência, é indício que ocorre alterações conformacionais na estrutura proteica devido a formação do complexo supramolecular. (SURYAWANSHI et al., 2015).

1.4.9 Avaliação de sítios de ligação e grau de hidrofobicidade da BSA por ensaios de competição

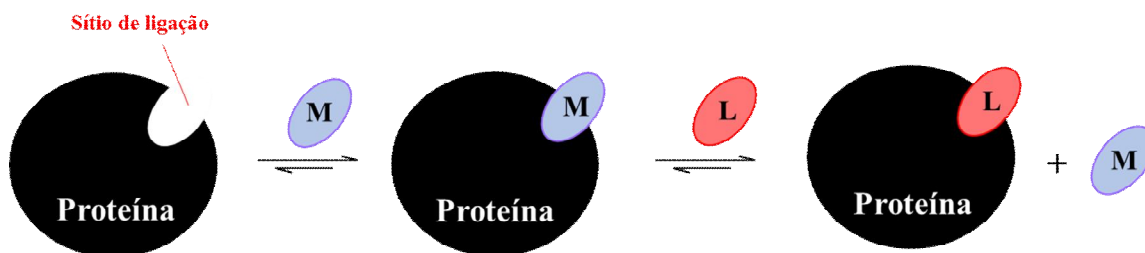
1.4.9.1 Avaliação de sítios de ligação na BSA

A estrutura tridimensional da albumina possui sítios de ligação com diferentes especificidades, sendo os mais importantes o sítio I (ou sítio I de Sudlow) e sítio II (ou sítio II de Sudlow) (ZHANG et al., 2012). O sítio I também é denominado de sítio de ligação da varfarina, está localizado no subdomínio IIA, enquanto que o sítio II de ligação é denominado sítio de ligação indol/benzodiazepina e está localizado no subdomínio IIIA (CHAVES et al., 2015).

A varfarina e o ibuprofeno são marcadores típicos já bem estabelecidos na literatura por ligarem-se seletivamente ao sítio I e o sítio II, respectivamente (NI; SU; KOKOT, 2006). Estes dois ligantes são utilizados em estudos de competição, sendo empregados como marcadores dos principais sítios das albuminas. A investigação em qual sítio preferencial um novo ligante interage com a proteína para formar o complexo proteína/ligante é investigado a partir da redução da intensidade de fluorescência e da constante de ligação do complexo proteína/marcador na presença do novo ligante (ZHANG et al., 2013). A redução da constante de ligação do complexo proteína/marcador, por exemplo, infere que houve deslocamento do equilíbrio para formar o complexo proteína/ligante e, desta forma, marcador e ligante competem pelo mesmo sítio de ligação, classificando-se, assim, o sítio preferencial de ligação

na proteína. A Figura 6 ilustra o deslocamento do marcador (M) na presença do ligante (L), ambos competindo pelo mesmo sítio.

Figura 6 - Ilustração do mecanismo de competição entre marcador (M) e ligante (L) pelo mesmo sítio ativo na proteína. O deslocamento do equilíbrio de ligação proteína/marcador reduz o valor da constante de ligação deste sistema.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Zsila (2013) afirma com base em dados não publicados que, o marcador para o sítio II, ibuprofeno, não é seletivo apenas para este local, podendo, desta forma, ligar-se a um terceiro sítio (subdomínio IB), menos conhecido, presente nas albuminas. Além disso, em outra publicação, o mesmo autor afirma que o isômero (S)-ibuprofeno liga-se nos subdomínios IIIA e IB, porém esse composto não deslocou a biliverdina, um composto similar a bilirubina, que também se liga ao sítio IB. Enquanto que o isômero do (R)-ibuprofeno liga-se somente ao subdomínio IIIA (ZSILA, 2013b). Contudo, Sudlow, baseado em experimentos, afirma que o ibuprofeno além de ligar-se ao subdomínio IIIA, pode migrar para uma região intermediária localizada entre os sítios IIA e IIB. Com isso, em estudos de competição é preferível o emprego do diazepam como marcador de sítio II por ser mais seletivo e, desta forma, fornecer um resultado mais representativo (ZSILA, 2013a).

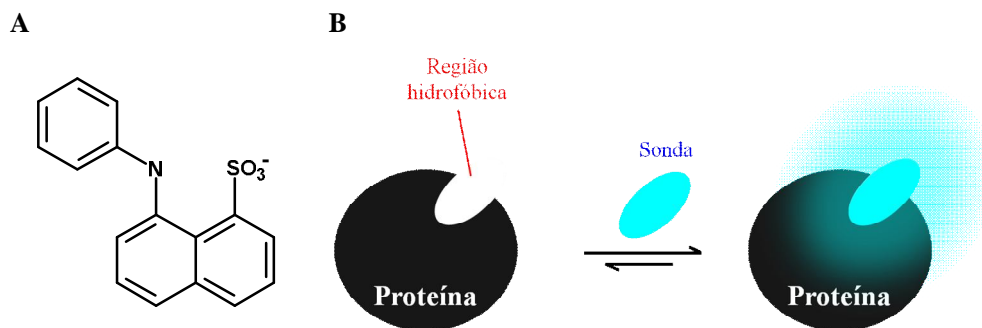
1.4.9.2 Índice de hidrofobicidade em proteínas – emprego da sonda ANS

Outro ensaio monitorando a competição entre a sonda e um ligante para interação com a BSA explora compostos pelos quais o rendimento quântico de fluorescência e comprimento de onda de emissão máxima dependem da polaridade do ambiente proteico para avaliar a natureza hidrofóbica ou não polar das proteínas. Os tipos de sondas mais empregadas incluem a classe do ácido sulfônico aromático, sendo o principal representante a molécula anfifílica 1-anilino-8-sulfonato (ANS), ou seu dímero, o bis-ANS. O ANS apresenta aumento do rendimento quântico após a ligação com porções hidrofóbicas em membranas ou cavidades de algumas proteínas (HALL, 1996). Além disso, por atuar como uma sonda hidrofóbica, o ANS

é empregado para o estudo de alterações conformacionais em proteínas (CARDAMONE; PURIT, 1992).

As interações hidrofóbicas das proteínas possuem papel importante na definição da conformação e mediação de interações proteína-proteína, por exemplo. Além disso, a quantidade e tamanho relativo de sítios hidrofóbicos na superfície da proteína pode determinar a sua solubilidade e a propensão de formar agregados sob condições fisiológicas de pH, temperatura e força iônica (CARDAMONE; PURIT, 1992). A figura abaixo representa a estrutura da sonda ANS (Figura 7A) e ilustra o aumento da intensidade de fluorescência da sonda ANS ao ligar-se a porções hidrofóbicas da proteína (Figura 7B).

Figura 7 - (A) Estrutura da sonda ANS e (B) Esquema da sonda ANS que fluoresce ao interagir com regiões hidrofóbicas da proteína.



Fonte: SANTOS, 2016.

A identificação de sítios hidrofóbicos proporciona uma visão estrutural modulada da proteína a partir da formação do complexo supramolecular, desta forma é possível uma análise comparativa das regiões hidrofóbicas antes e depois da presença do ligante e formação do complexo.

As propriedades de ligação do ANS às proteínas podem ser investigadas por medição da constante de dissociação aparente do complexo fluorescente proteína-ANS (K_d) e, a intensidade de fluorescência máxima na concentração saturada de ANS ($F_{m\acute{a}x}$), está relacionada ao número de sítios hidrofóbicos na superfície da proteína. O inverso da constante de dissociação ($1/K_d$) significa a afinidade de ligação do ANS à proteína na ausência e na presença do ligante. O ANS possui $\lambda_{ex} = 380$ nm e $\lambda_{em} = 470$ nm (RANJBAR et al., 2013). O índice de hidrofobicidade superficial (HSP) de proteínas na ausência e na presença do ligante pode ser calculado através da equação (RANJBAR et al., 2013):

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

1.4.10 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As técnicas anteriormente apresentadas possibilitam avaliar a formação do complexo macromolécula-ligante monitorando as propriedades da proteína e, conseqüentemente, as modificações ocorridas a partir do processo de interação com o ligante. Diferente destas técnicas, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) possibilita monitorar o processo de interação sob a perspectiva do ligante, ou seja, a partir da comparação dos parâmetros dos espectros nos estados livre e ligado à macromolécula. Neste sentido, as técnicas que monitoram o ligante não são limitadas pelo tamanho molecular da proteína e, desta forma, possui grande aplicabilidade para analisar as interações proteína-ligante (GOLDFLAM et al., 2011).

Entre as estratégias que permitem avaliar a interação proteína-ligante, a espectroscopia de RMN é uma técnica poderosa e já bem estabelecida no estudo de interações intermoleculares (CALA; GUILLIÈRE; KRIMM, 2014), possibilitando a avaliação do processo de interação com alta sensibilidade (VINOGRADOVA & QIN, 2012). Uma das principais informações possíveis é o mapeamento do epítipo da macromolécula ou ligante (CABRITA et al., 2011). O epítipo é a superfície de contato da macromolécula ou do ligante envolvido no processo de interação e, pode ser determinado a partir dos hidrogênios localizados na interface do processo de interação (FIGUEIREDO; MARSAIOLI, 2007).

O parâmetro mais comumente empregado na espectroscopia de RMN para o mapeamento da região de interação entre uma macromolécula e um ligante é o deslocamento químico (δ) (CALA; GUILLIÈRE; KRIMM, 2014), o qual é definido como a diferença entre a localização de um sinal de ressonância com relação a uma referência, sendo dependente da vizinhança química da molécula (GONSALVES; MELO, 2007). É preferível monitorar os deslocamentos químicos referente ao ligante em relação a macromolécula, pois o ligante fornece espectros de RMN mais simplificados e resolvidos (FIGUEIREDO; MARSAIOLI, 2007).

Neste sentido, o mapeamento do epítipo do ligante é determinado a partir de uma análise comparativa entre os deslocamentos químicos do ligante livre com os deslocamentos químicos do ligante após a interação com a proteína (GONSALVES; MELO, 2007). Caso haja deslocamento no sinal de ressonância do ligante livre em comparação ao do sinal de

ressonância do ligante contendo a proteína, é indicativo da região do ligante que interage com a proteína (MEYER; PETERS, 2003).

A densidade eletrônica, eletronegatividade e aromaticidade estão entre os fatores que afetam os deslocamentos químicos. A interação proteína-ligante ou proteína-peptídeo, por exemplo, muda o deslocamento químico na porção de interação em ambas as moléculas participantes do processo. Ou seja, o sinal de ressonância da região molecular que não participa da ligação não tem o deslocamento químico alterado, exceto quando afetado por rearranjos conformacionais (DOWNING, 2004). Assim, alterações nos deslocamentos químicos podem ser utilizadas como critério para identificar o epítipo do ligante e descrever a região do ligante envolvida na interação com a macromolécula (BRONOWSKA, 2011).

1.4.11 Avaliação *in vitro* do efeito prejudicial dos COA(V) à funcionalidade de proteínas

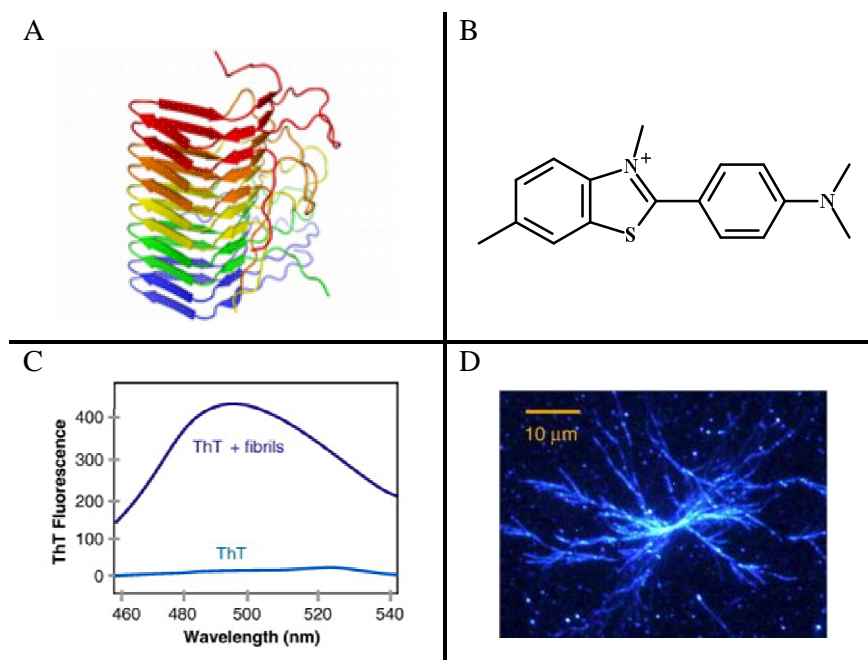
1.4.11.1 Ensaio de fibrilação de proteínas

Muitas proteínas sofrem agregação e formação de fibrilas amiloides sob as condições biofísicas específicas (DEY et al., 2015) e, são definidas como agregados protéicos filiformes com estruturas secundárias de folhas- β (PRADHAN et al., 2015). O processo de fibrilação está associado a etiologia de uma variedade de doenças, tais como doenças neurodegenerativas (doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington), diabetes tipo II, amiloidose sistêmica (VUS et al., 2014), dentre outras. Acredita-se que o passo chave na formação de fibrilas amiloides é a desestabilização dos estados nativo das proteínas influenciado por concentração salina, temperatura, pH e aditivos, tais como: nanopartículas, íons metálicos, compostos tóxicos, dentre outros (ZAMAN et al., 2014).

Várias técnicas têm sido descritas na literatura para o estudo de formação de fibrilas amiloide (Figura 8A), incluindo espectroscopia de fluorescência molecular, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, dicroísmo circular, RMN, dentre outras. Dentre estas técnicas, a espectroscopia de fluorescência é a mais empregada devido a sua simplicidade e a existência de sondas sensíveis para a detecção de amiloides, pelo qual se destaca a tioflavina T (ThT) (Figura 8B), sendo esta a mais empregada (PRADHAN et al., 2015). Estas sondas moleculares são sensíveis a um meio hidrofóbico e, assim, a sua emissão torna-se intensa após a ligação com a região hidrofóbica folha- β de fibrilas de amiloides (Figura 8C) (VUS et al., 2014). A ThT é empregada como um marcador potente para o imageamento de amiloides em histologia (Figura 8D), devido este corante localizar

seletivamente depósitos amiloides em amostras por intenso aumento na intensidade da fluorescência na presença das fibrilas (BIANCALANAA; KOIDEC, 2010).

Figura 8 - (A) Representação de fibrilas de amiloide da proteína HET-s fungo *Podospora anserina*, (B) Estrutura química da ThT, (C) Gráfico da intensidade de fluorescência antes e após a ligação da ThT com as fibrilas amilóides e (D) Microscopia de imagem de fibrilas do tecido de glucagon ramificada coradas com ThT.



Fonte: BIANCA LANA;KOIDEC,2010. < <https://www1.ethz.ch/ssnmr/research/applications2> >.

Os espectros de fluorescência da ThT tempo-dependente possibilitam obter informações sobre a cinética de formação de amiloides. A equação 9 abaixo pode ser utilizada para calcular os parâmetros da cinética de formação de fibrilas amilóides (JUARÉZ, 2009):

$$F = F^{\infty} + \Delta F \exp\left(-[k_{sp} t]^n\right) \quad \text{equação (9)}$$

Pelo qual F , F^{∞} , e ΔF são: intensidade de fluorescência no tempo t , intensidade de fluorescência final e a amplitude de fluorescência, respectivamente. K_{sp} é a constante de velocidade espontânea de formação da fibrila e, o valor de n menor do que 1 está relacionado com a existência de múltiplos eventos para a formação de amiloide (JUARÉZ, 2009). A intensidade de fluorescência da ThT é medida empregando $\lambda_{ex} = 440$ nm e $\lambda_{em} = 485$ nm na presença da fibrila (WANG, 2010).

1.4.11.2 Avaliação da atividade da fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina pertence a um grupo de enzimas relativamente inespecíficas sendo responsável em catalisar a hidrólise de vários fosfomonoésteres em meio alcalino liberando, desta forma, fosfato inorgânico em sistemas biológicos. Além disso, apesar da função metabólica enzimática não ser totalmente esclarecida, parece estar associada com o transporte de lipídios no intestino e com processos de calcificação óssea (MOTTA, 2009).

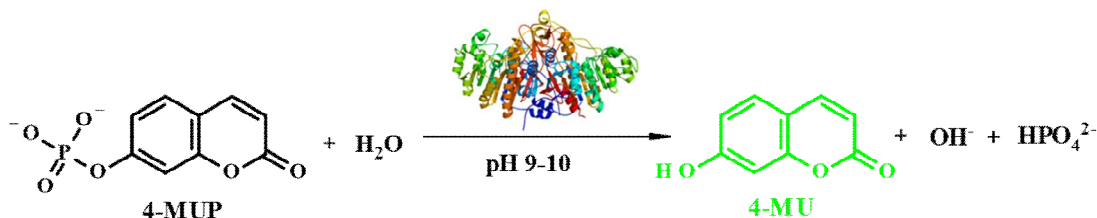
Esta enzima é amplamente distribuída, estando presente em diversos organismos, desde animais até bactérias (HUNG & CHANG, 2001). Além disso, está presente notadamente na mucosa intestinal, fígado (canalículos biliares), túbulos renais, baço, ossos (osteoblastos) e placenta (MOTTA, 2009). As fosfatases são enzimas que necessitam de três íons em seu sítio catalítico, isto é, dois íons zinco e um magnésio, para exercer sua atividade enzimática (MILLÁN, 2006). A fosfatase alcalina possui atividade enzimática ótima na faixa de pH entre 9-10 (OBAYASHI; IINO; NOJI, 2015). A atividade da fosfatase alcalina no soro de um adulto normal deve-se predominantemente de origens hepáticas e ósseas (MOTTA, 2009).

Com relação a inibição da fosfatase alcalina existem diferentes substâncias que atuam diminuindo ou até mesmo extinguindo a atividade enzimática. O primeiro efeito pode acontecer em caso de estado patológico e, desta forma, existem fármacos que atuam inibindo a ação enzimática. Porém, este efeito é negativo na homeostasia fazendo com que o inibidor possa atuar de maneira tóxica ao organismo (SHIRAZI; BEECHEY; BUTTERWORTH, 1981). Juntamente com o levamisol, teofilina, fosfato, vanadato e cloreto de zinco, o arseniato é um inibidor clássico da fosfatase alcalina (SIMÃO et al., 2007). A sua inibição enzimática eficaz acontece por competição e, quimicamente, deve-se à semelhança com o fosfato (GETTINS & COLEMAN, 1984). Por serem do mesmo grupo da tabela periódica o arsênio e o fósforo compartilham propriedades químicas similares, o que possibilita ao arseniato substituir o fosfato em diversas reações bioquímicas (ROSEN; AJEES; MCDERMOTT, 2011). A inibição enzimática pelo arseniato deve-se a sua ligação à hidroxila da cadeia lateral do resíduo de serina no sítio ativo (SHEN et al., 2013).

É possível monitorar a atividade enzimática da fosfatase alcalina através do emprego de diversos tipos de sondas. Dentre as sondas fluorogênicas existentes, uma das mais empregadas é o 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) que, na presença da enzima e sob condições apropriadas, hidrolisa o 4-MUP em 4-metilumbeliferona (4-MU) e fosfato inorgânico (Pi). O 4-MU é um composto que possui fluorescência intrínseca ($\lambda_{ex} = 372$ nm e

$\lambda_{em} = 445 \text{ nm}$) (OBAYASHI; IINO; NOJI, 2015). A Figura 9 apresenta a hidrólise do composto 4-MUP na presença da enzima fosfatase alcalina.

Figura 9 - Hidrólise da sonda 4-MUP na presença da enzima fosfatase alcalina gerando como produto o fluoróforo 4-MU e monohidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) em pH 9-10.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Desta forma, a sonda 4-MUP pode ser empregada para a análise da atividade catalítica da fosfatase alcalina na presença de um ativador ou inibidor enzimático, por exemplo. Neste sentido, é possível esclarecer o comportamento de um determinado composto na atividade enzimática da fosfatase alcalina *in vitro* (OBAYASHI; IINO; NOJI, 2015).

1.5 Interação de proteínas com espécies de arsênio

A ligação de arsênio inorgânico a biomoléculas é considerada um dos seus principais mecanismos tóxicos por estar associado aos riscos carcinogênicos dos arsenicais em seres humanos (REHMANA et al., 2012). A ligação do arsênio às proteínas celulares proporciona uma explicação pertinente para o modo de como as espécies de arsênio provocam efeitos prejudiciais à saúde, uma vez que a ligação destas espécies a uma proteína pode alterar a conformação proteica e, conseqüentemente, inibir sua função (CHEN et al., 2015). Acredita-se que o arseniato inorgânico (HAsO_4^{2-}), que é um análogo molecular do fosfato (HPO_4^{2-}), pode competir por transportadores de ânions de fosfato e substituí-lo em reações bioquímicas. Por exemplo, a geração de adenosina-5'-trifosfato (ATP) durante a fosforilação oxidativa pode ser inibida pela substituição de fosfato pelo arseniato (CHEN et al., 2015).

Já a toxicidade para espécies de arsênio trivalente deve-se a sua alta afinidade aos grupos tióis e, desta forma, pode ligar-se a resíduos de cisteína presentes em peptídeos e proteínas. Interessante que, além de esclarecer o mecanismo de toxicidade, o estudo da interação de proteínas com arsenicais possibilita o desenvolvimento de estratégias terapêuticas aplicando compostos de arsênio como fármacos (SHEN et al., 2013), tal como o tratamento da sífilis e tripanossomíase africana (doença do sono) com o Salvarsan[®] (arsfenamina) e o tratamento de leucemia promielocítica aguda com trióxido de arsênio

(As₂O₃) (CHEN et al., 2015). Já foi relatada de forma qualitativa a ligação de espécies de arsênio a diversas proteínas, tais como Albuminas do Soro Humano (HSA) e Bovino (BSA) (SHOOSHTARYA; BEHTASHA; NAFISI, 2015), hemoglobina, tubulina, actina, entre outras (SHEN et al., 2013).

Com relação a estudos de interação envolvendo avaliação de arsenicais, na literatura foi investigado os efeitos da complexação do trióxido de arsênio (As₂O₃), fármaco empregado para o tratamento de anemia promielocítica aguda, à BSA e HSA empregando técnicas espectroscópicas. Os resultados demonstraram interação do As₂O₃ com ambas proteínas e os valores de K_b foram de 1,07×10⁴ mol L⁻¹ e 1,27×10⁴ mol L⁻¹ para HSA e BSA, respectivamente (SHOOSHTARYA; BEHTASHA; NAFISI, 2015).

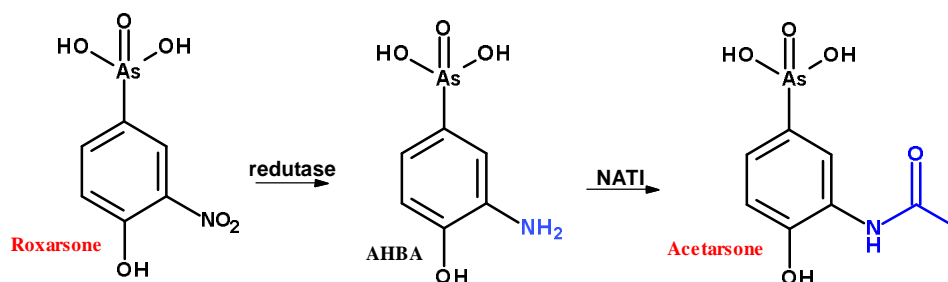
1.6 Compostos orgânicos de arsênio(V) - COA(V)

O uso de arsenicais é muito antigo, alcançando 400 a.C., sendo relatado por Hipócrates, Aristóteles, Dioscórides e Plínio. A popularidade como agente de envenenamento na Idade Média deve-se a várias características, englobando uma aparência inofensiva, insipidez (ou sabor levemente adocicado), podendo ser facilmente misturados a alimentos, de fácil obtenção e possui evolução insidiosa de doenças infecciosas. Contudo, a atenção da comunidade médica para o estudo da ação tóxica dos arsenicais só aconteceu quando foi empregado como agente suicida. Apesar de seu uso ser controverso entre a comunidade científica, o emprego como agente terapêutico alcançou o auge no final do século 19, sendo empregado no tratamento de diversos tipos de doenças, tais como: dermatoses (psoríase, eczemas, acne, leishmaniose, sífilis, dentre outros), tônicos, fortificante e analgésico. Todavia, a primeira observação sobre uma possível ação cancerígena só foi descrita em 1822, sendo relatados vários casos de ação carcinogênica devido uso de arsenicais (GONTIJO; BITTENCOURT, 2005). A partir de então, o uso de arsênio tornou-se restrito e, por possuir ação menos tóxica que o arsênio inorgânico, atualmente as formas mais empregadas em diversas áreas indústrias são orgânicas (GORBY, 1988).

Além do emprego de organoarsenicais como pesticidas e inseticidas na indústria agrícola desde o início do século 20, medicamentos à base de organoarsênicos pentavalentes tem sido empregado amplamente na avicultura como aditivos em rações no tratamento ou prevenção de doenças parasitárias, tais como coccídeos, para promoção do crescimento mais rápido e melhorar a pigmentação da carne (DONGMEI, 2011). Em menor proporção, estes medicamentos também são utilizados na alimentação de perus e porcos (KAZI, 2013). O

composto que possui maior destaque é o roxarsone (ácido 3-nitro-4-hidroxifenilarsônico), que vem sendo utilizado desde 1944 e conhecido comercialmente como 3-nitro[®]. Outro composto também empregado como aditivo e que deriva do metabolismo roxarsone é o acetarsone (Figura 10) (BAYSE, 2013). Os níveis típicos de roxarsone como aditivo adicionado à alimentação aviária é entre 20-50 g t⁻¹ (LIU, 2014).

Figura 10 - Via metabólica de transformação do roxarsone à AHBA (3-amino-4-hidroxibenzeno arsenato) por microorganismos e, em seguida, acetarsone por fontes animais e humanas.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017 - Adaptado de BAYSE, 2013.

O arsênio existe na forma inorgânica e orgânica em diferentes estados de oxidação (-3, 0, +3, +5) (HUGHES, 2002). Sabe-se que tal como à biodisponibilidade, os efeitos fisiológicos/toxicológicos dos arsenicais dependem da forma química e do estado de oxidação (HUGHES, 2002) e, tem-se que o As(III) e As(V) são as espécies mais tóxicas, enquanto que arsenobetaína e arsenocolina são as menos tóxicas (BARRA, 2000). A dose letal para diferentes espécies de arsênio está representada na Tabela 1.

Tabela 1 - Dose letal (DL) para matar 50% de uma população de ratos para diferentes espécies de arsênio.

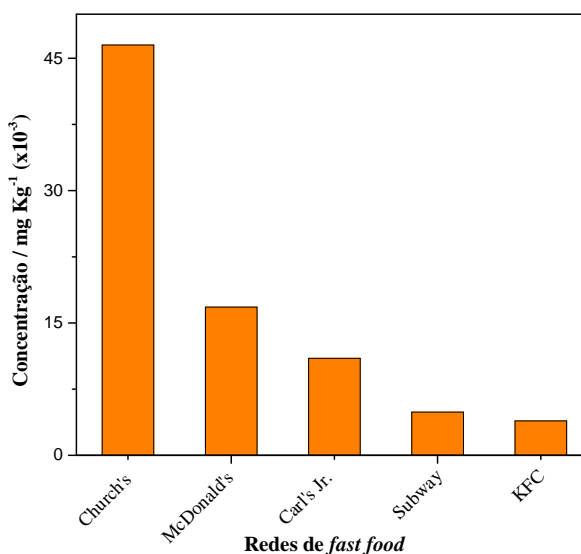
Espécie	DL ₅₀ (mg As / kg)
Trióxido de arsênio (As ₂ O ₃)	26
Arseniato (H ₃ AsO ₄)	22
Arsenito (HAsO ₂)	8
Ácido monometilarsênico(V) (CH ₃ AsO(OH))	916
Ácido dimetilarsênico(V) ((CH ₃) ₂ AsO(OH))	648
Óxido de trimetilarsênico (CH ₃) ₃ AsO)	5500
Arsenobetaína (C ₅ H ₁₁ AsO ₂)	> 4260
Roxarsone	263

Fonte: HUGHES, 2014; WILSON, 2002.

O motivo para o emprego de organoarsenicais é decorrente da redução da taxa de mortalidade em frangos devido à regulação de genes associados com a imunidade (WARIS, 2016). Porém, elevadas concentrações de arsênio tem sido detectada na gordura corporal, tecidos, fígado, ovos e penas de aves que foram alimentadas com organoarsenicais, sendo

mais de 90% destes aditivos excretados de forma inalterada (CHIOUA; CHENB; YUA, 1998). Outrossim, de acordo com de *Institute for Agriculture and Trade Policy* (EUA), já foram detectadas concentrações de arsênio em redes de *fast food* que utilizam produtos avícolas em seus produtos alimentares, tais como hambúrguer, sanduíche, frango empanado, dentre outros (Figura 11).

Figura 11 - Concentrações média de arsenicais em produtos avícolas em redes de fast food.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017 - Adaptado de *Institute for Agriculture and Trade Policy* dos EUA, 2006.

Com relação à legislação do Brasil, consoante com o Art. 1º da portaria nº 31, de 29 de janeiro de 2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), são proibidas a utilização de medicamentos à base de arsenicais como alimentos para animais. De acordo com dados fornecidos pela *Food and Drugs Administration* (FDA), a utilização de COA(V) como aditivos em alimentos para frangos podem causar neoplasia a quem consome frangos alimentados com COA(V) e, desta forma, seu uso foi suspenso a partir de 2014. Porém, alguns países como China (1.357 bilhões de habitantes) (LIU, 2014), Índia (1.252 bilhões de habitantes) (WANG; WANG; CHEN, 2016) e Paquistão (KAZI, 2013), ainda continuam a empregar tais aditivos de organoarsênicos na avicultura. Vale ressaltar que estes dois primeiros países, China e Índia, perfazem aproximadamente 36% da população mundial de acordo com o Fundo de População das Nações Unidas (FNUAP).

Atualmente, toda a atenção no emprego dos organoarsenicais na avicultura é destinado aos impactos ambientais (SINGHA et al., 2015) e, conseqüentemente, suas implicações na

saúde humana (MANGALGIRIA; ADAKA; BLANEY, 2015). Na literatura o foco dos trabalhos visa prover métodos que possibilite a determinação tanto dos organoarsenicais quanto dos seus produtos de metabolismo/degradação em sistemas ambientais, tais como solos (LIU et al., 2015), água (DAUS et al., 2008), plantações (LIU et al., 2009), ar (SINGHA, et al, 2015), dentre outros. Isto se deve ao fato de toneladas de esterco do frango ser empregada como adubo (MANGALGIRIA; ADAKA; BLANEY, 2015). Já foi relatado que, os organoarsenicais uma vez presentes no ambiente podem ser transformados em ácido dimetilarsínico (DMA), ácido monometilarsênico (MMA) e até nas suas formas mais tóxicas, o arsênio inorgânico (As(III) ou As(V)) (SINGHA et al., 2015). Estas últimas espécies não são apenas mais tóxicas como também mais móveis no ambiente, representando uma ameaça para a qualidade do solo e da água subterrânea (ABEDIN et al., 2002).

1.7 Justificativa

Medicamentos à base de arsênio, especialmente o roxarsone, vêm sendo empregado na indústria aviária como aditivo por décadas para o tratamento de doenças parasitárias, crescimento mais rápido e melhoramento da pigmentação da carne em frangos (DONGMEI, 2011). Já foi descrito na literatura a presença de elevadas concentrações de arsênio na carne de aves alimentadas com organoarsenicais(V) e detecção em produtos alimentícios em redes de *fast food* (Institute for Agriculture and Trade Policy). Além do mais, diferentes espécies de arsênio têm sido detectadas no ambiente pelo emprego do esterco do frango na agricultura (LIU, 2014).

Apesar das espécies orgânicas de arsênio(V) terem sido consideradas “seguras” para o uso em animais (MANGALGIRIA; ADAKA; BLANEY, 2015), até pouco tempo não era possível afirmar precisamente quais seus efeitos à saúde humana. A literatura relatava apenas que ingestão prolongada, mesmo que em baixas concentrações de arsênio, poderia causar efeitos tóxicos graves aos seres vivos, tais como: teratogênicos, neurotoxicidade, carcinogênicos, dentre outros (LIU, 2014). Contudo, trabalhos mais recentes tem esplanado parâmetros relacionados à toxicidade, interações com biomoléculas e outros efeitos no organismo, possibilitando esclarecer o comportamento dos compostos de arsênio(V) em sistemas biológicos e cobaias (BAYSE et al., 2013). Neste sentido, já foram revelados potencial angiogênico em células endoteliais aórtica humana por roxarsone (BASU et al., 2008), genotoxicidade em sistema celular por roxarsone (ZHANG et al., 2012), ação tumoral (bexiga, rim, fígado e glândula tireóide) por ácido cacodílico em ratos (YAMAMOTO et al.,

1995), neurotoxicidade (degeneração da bainha de mielina e axônio) em porcos por roxarsone (JOMOVA et al., 2011), dentre outros.

Neste sentido, o presente estudo visa avaliar a interação dos COA(V) com a proteína carreadora BSA e, compreender os processos (bio)químicos envolvidos no sistema proteína-ligante, uma vez que presente no organismo humano, tais compostos podem induzir dano funcional das respostas biológicas através da interação com proteínas. Além disso, serão avaliados os possíveis efeitos danosos empregando sistemas proteicos *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a interação entre a albumina do soro bovino (BSA) com compostos orgânicos de arsênio(V), roxarsone e acetarsone, por técnicas espectroscópicas.

2.2 Específicos

- a) Avaliar o *quenching* de fluorescência (K_{SV}), constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação do complexo formado (n) por espectroscopia de fluorescência;
- b) Determinar os parâmetros termodinâmicos e a natureza das forças envolvidas na interação BSA-ligante;
- c) Confirmar a formação do complexo proteína-ligante e o tipo de *quenching* envolvido no processo de interação;
- d) Avaliar a influência da força iônica no processo de interação para ambos os ligantes RX e AC;
- e) Avaliar mudanças estruturais na proteína antes e depois da formação do complexo supramolecular empregando o ensaio de fluorescência tridimensional;
- f) Avaliar o microambiente dos fluoróforos intrínsecos da BSA (triptofano e tirosina) a partir da formação do complexo proteína-ligante;
- g) Avaliar as mudanças na hidrofobicidade da superfície da BSA a partir da interação com RX e AC;
- h) Determinar os sítios preferenciais de interação dos ligantes RX e a AC na BSA por ensaio de competição;
- i) Determinar os possíveis competidores no processo de interação da BSA com os ligantes;

- j) Determinar as distâncias intermoleculares no sistema proteína-ligante por FRET;
- k) Avaliar o deslocamento químico para as moléculas RX e AC na interação com a BSA por RMN de ^1H ;
- l) Avaliar o processo de fibrilição proteica da BSA após a interação com os ligantes RX e AC;
- m) Monitorar a inibição e cinética da atividade da fosfatase alcalina.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e preparo das soluções

Os reagentes empregados nos ensaios possuíam grau analítico de pureza. Para o preparo das soluções utilizou-se água ultrapura através de um sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA) com resistividade específica de 18,2 MΩcm.

O tampão empregado nos ensaios foi Tris.HCl ((HOCH₂)₃CNH₂, Sigma) 50 mmol L⁻¹ com ajuste da força iônica para 100 mmol L⁻¹ de NaCl (Synth), solubilizando o sistema com água ultrapura. O pH foi ajustado para 7,4 com HCl 1 mol L⁻¹ e armazenado em um frasco a temperatura 5 °C (WANG et al., 2016). Para os ensaios de interação, a solução estoque dos ligantes roxarsone (7,60 mmol L⁻¹) e acetarsone (7,27 mmol L⁻¹) foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO, (CH₃)₂SO, Sigma) e, em seguida, foram armazenadas em frascos âmbar sob temperatura ambiente (25 °C). A solução estoque da Albumina do Soro Bovino (*Bovine serum albumin*, BSA, Sigma) possuía a concentração de 40 μmol L⁻¹ e foi solubilizada tampão Tris.HCl 50 mmol L⁻¹ pH = 7,4, contendo NaCl 100 mmol L⁻¹ para ajuste da força iônica.

Para o ensaio de competidores foram empregados: bicarbonato de potássio (KHCO₃, Merk), acetato de magnésio (Mg(CH₃COO)₂, Merk), fosfato de potássio tribásico (K₃PO₄, Vetec), D-glicose (C₆H₁₂O₆, Merk), cloreto de cálcio (CaCl₂, Vetec), cloreto de ferro(III) (FeCl₃, Sigma), acetato de cobre(II) monohidratado (Cu(CH₃COO)₂.H₂O, Merk), acetato de zinco(II) dihidratado (Zn(CH₃COO)₂.2H₂O), ácido oleico (C₁₈H₃₄O₂, Vetec) e ácido linoleico (C₁₈H₃₂O₂, Vetec). Preparou-se a solução estoque do HCO₃⁻, Mg(II), HPO₄²⁻, ácido oleico e linoleico a 200 μmol L⁻¹. Para glicose, Ca(II), Fe(III), Cu(II) e Zn(II) preparou-se a solução estoque a 100 μmol L⁻¹. As soluções estoques de todos os competidores foram preparadas em tampão Tris.HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,4.

No ensaio de competição pelo sítio de ligação, prepararam-se soluções a 200 μmol L⁻¹ para os marcadores diazepam (C₁₆H₁₃ClN₂O, Pharma nostra), ibuprofeno (C₁₃H₁₈O₂, Ciel) e varfarina (C₁₉H₁₆O₄, Sigma). Os marcadores diazepam e o ibuprofeno foram solubilizados em etanol, enquanto que para a varfarina utilizou-se acetona.

Para as avaliações do índice de hidrofobicidade e competição pela ligação na proteína na presença e ausência dos ligantes empregou-se uma solução estoque de 100 μmol L⁻¹ da sonda ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato (ANS, C₁₆H₁₃NO₃S.NH₃, Sigma) em tampão 50 mmol L⁻¹ Tris.HCl pH 7,4.

Nos ensaios de RMN ^1H foi utilizado tampão fosfato 10 mM pH 7,4 em água deuterada (D_2O , Sigma). A solução estoque da BSA $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada em tampão fosfato. Enquanto que a solução estoque dos ligantes RX e AC a $8,8 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada em 10% (v/v) de $\text{DMSO-}d_6$ e tampão fosfato 10 mmol L^{-1} a pH 7,4. Empregou-se o de trimetilsililpropionato de sódio (TMSP, Cambridge Isotope Laboratories) a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em 99,9% de água deuterada como padrão interno.

Para o ensaio de fibrilação foram preparadas soluções estoques de arseniato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merk) $800 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e tioflavina T ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{S}$, Sigma) $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (GUAN; ZHANG; WANG, 2014). Para solubilizar o arseniato de sódio dibásico utilizou-se água ultrapura, e para a tioflavina T tampão Tris.HCl pH 7,4.

Para o ensaio de inibição enzimática da fosfatase alcalina empregou-se 10 mmol L^{-1} de tampão Tris.HCl pH 9,5 para o preparo de todas as soluções. Para a análise utilizou-se a fosfatase alcalina presente no soro humano com a concentração de 296 U L^{-1} (empregando a sonda colorimétrica *p*-nitrofenilfosfato) e, após a diluição em tampão Tris.HCl, a concentração final foi de $14,8 \text{ U L}^{-1}$. As soluções estoques dos cofatores foram de 5 mmol L^{-1} de Zn(II) (ZnCl_2 , Sigma) e 20 mmol L^{-1} de Mg(II) (MgCl_2 , Sigma) e, para a sonda 4-metilumbelliferil fosfato (4-MUP, Sigma) preparou-se uma estoque de $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. No ensaio de inibição enzimática foi empregado o carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3 , Vetec) na concentração final de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (OBAYASHI; IINO; NOJI, 2015). As soluções estoques dos inibidores foram de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ do RX, AC e arseniato de sódio dibásico (Na_2HAsO_4 , Vetec).

Para a avaliação da cinética enzimática também se empregou tampão Tris.HCl 10 mmol L^{-1} em pH 9,5 para o preparo de todas as soluções. Após a diluição do soro, a concentração final da fosfatase alcalina foi de $7,4 \text{ U L}^{-1}$. As soluções estoques dos cofatores e da sonda foram as mesmas empregadas no ensaio de inibição enzimática. As concentrações dos inibidores RX e do arseniato de sódio dibásico foram de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

3.2 Equipamentos utilizados

Com relação às medidas espectrofluorimétricas empregou-se um espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico e espectrofluorímetro com leitor de microplacas (EnSpire[®], Perkin Elmer, Alemanha) equipado com lâmpada de xenônio, empregando microplacas de 96 poços. As medidas

espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico. As medidas de pH foram realizadas através de um eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro Gehaka (modelo PG 1800, Brasil). As massas dos reagentes foram medidas em balança analítica eletrônica Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de 0,1 mg. Nos estudos de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) empregou-se um espectrômetro de RMN Bruker 400 ($B_0 = 9,4 \text{ T}$), operando a 400,35 MHz para ^1H e equipado com sondas de 5,0 mm para detecção indireta, realizado no Laboratório de pesquisa em Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear no Instituto de Química e Biotecnologia (IQB).

3.3 Procedimentos

3.3.1 Espectros de fluorescência no estado estacionário

Neste estudo foi realizado a titulação espectrofluorimétrica da BSA ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) frente aos ligantes RX e AC ($0\text{-}350 \mu\text{mol L}^{-1}$). A partir dos espectros de fluorescência no estado estacionário foi possível obter os seguintes parâmetros relacionados ao sistema: a constante de Stern-Volmer (K_{SV}), relacionado ao *quenching* de fluorescência e a constante de ligação (K_b) relativo ao processo de interação proteína-ligante. Para tanto se empregou $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} \sim 340 \text{ nm}$ relacionado a fluorescência intrínseca da proteína BSA. O slit utilizado em todos os experimentos foi de 10 nm e 1,5 nm para excitação e emissão, respectivamente (ARIGA et al, 2015).

3.3.2 Parâmetros termodinâmicos e natureza das forças de ligação macromolécula-ligante

Para o estudo dos parâmetros termodinâmicos foram realizadas nas temperaturas 22, 30 e 38°C. A análise foi realizada com a titulação do ligante em concentrações crescentes ($0\text{-}350 \mu\text{mol L}^{-1}$) e a concentração da proteína foi mantida fixa ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$), sendo o sistema avaliado nas três temperaturas mencionadas acima (SHI et al, 2016).

3.3.3 Interação proteína-ligante empregando fluorescência e UV-vis

Para os estudos de empregando espectroscopia de UV-vis empregou-se $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ da BSA e $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ para os ligantes ambos em tampão 50 mmol L^{-1} Tris.HCl pH 7,4. Os espectros foram obtidos em módulo de absorvância, sendo as medições realizadas de Os espectros foram obtidos em módulo de absorvância (SHI et al, 2016).

3.3.4 Fluorescência 3D

Para este estudo a concentração da proteína manteve-se fixa de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e para o ligante foi empregado um excesso de 20 vezes ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$), sendo pH 7,4. As medidas espectrofluorimétricas foram realizadas nas seguintes condições: $\lambda_{\text{ex}}= 220$ a 320 nm (variando de 5 em 5 nm), $\lambda_{\text{em}}= 270$ a 450 nm, abertura da fenda de excitação de 3 nm e emissão de 5 nm (ARIGA et al, 2015).

3.3.5 Fluorescência sincronizada

As medidas fluorimétricas moleculares foram realizadas na presença e na ausência dos ligantes roxarsone e acetarsone, sendo a concentração empregada na faixa de 0 a $350 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que a concentração da proteína foi mantida fixa ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$). As condições das medidas espectrofluorimétricas utilizadas para monitorar os resíduos de triptofano foram de $\lambda_{\text{ex}}= 220$ nm e $\lambda_{\text{em}}= 280$ a 450 nm (estabelecendo $\Delta\lambda= 60$ nm) com abertura da fenda de excitação de 5 nm e emissão em 3 nm e, para os resíduos de tirosina foram de $\lambda_{\text{ex}}= 265$ nm e $\lambda_{\text{em}}= 280$ a 450 nm (estabelecendo $\Delta\lambda= 15$ nm), com abertura da fenda de excitação e emissão igual a 5 nm (KAUSHIK; SWEETY; ARORA, 2016).

3.3.6 Avaliação de regiões hidrofóbicas da proteína – sonda ANS

Para avaliar possíveis mudanças na hidrofobicidade da superfície da proteína a partir da interação com os ligantes foram realizados dois tipos de teste: no primeiro, manteve-se a concentração da proteína ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) e da sonda ANS ($4 \mu\text{mol L}^{-1}$) fixas, titulando concentrações crescentes do ligante (0 - $350 \mu\text{mol L}^{-1}$), empregou-se $\lambda_{\text{ex}}= 280$ nm e $\lambda_{\text{em}}= 380$ nm. Este ensaio monitora se o ligante interage em regiões hidrofóbicas da proteína (WANG et al., 2008). Já para o segundo, manteve-se a concentração da proteína ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) e do ligante ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$) fixos, variando-se a concentração da sonda ANS (0 - $50 \mu\text{mol L}^{-1}$). Para o segundo ensaio empregou-se $\lambda_{\text{ex}}= 380$ nm e $\lambda_{\text{em}}= 471$ nm. Este ensaio permite determinar o índice de hidrofobicidade da proteína na presença e ausência dos ligantes nm (RANJBAR et al., 2013).

3.3.7 Estudo de competição dos sítios de ligação

Para o estudo de competição pelos dois sítios principais de ligação na proteína foram empregados os marcadores: varfarina (marcador do sitio I) e ibuprofeno e diazepam

(marcadores do sítio II). Para a avaliação do sítio preferencial de ligação de cada ligante foi realizado uma titulação espectrofluorimétrica dos ligantes (0-350 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença da proteína com cada marcador, ambos na mesma concentração de 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (ZHANG et al., 2013).

3.3.8 Estudo de competição

Nos estudos de competição as proporções empregadas entre proteína e competidor foram de acordo com as condições fisiológicas. Foram avaliados os seguintes competidores: HCO_3^- , Mg(II) , HPO_4^{2-} , glicose, Ca(II) , Fe(III) , Cu(II) , Zn(II) , ácido oléico e lonoléico. A concentração da proteína foi fixada em 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo o estudo realizado na ausência e na presença de concentração crescentes dos ligantes (0-350 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A análise dos dados foi realizada a partir dos cálculos das constantes na ausência e na presença dos íons competidores.

3.3.9 Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)

Para a avaliação da distância entre fluoróforo e o *quencher* foram realizadas medidas de fluorescência molecular da proteína e do sistema proteína-ligante e a absorção molecular dos ligantes. Para tanto, foram mantidas as proporções da concentração da proteína BSA e dos ligantes de 1:1 e 1:2, sendo a concentração empregada de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e para o excesso de 2 vezes do ligante de $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (CHENG; JIANG; LIU, 2013).

3.3.10 Interação proteína-ligante por RMN ^1H

Os estudos de interação empregando a espectroscopia de RMN ^1H foram avaliados através da variação dos deslocamentos químicos (δ) dos ligantes RX e AC na ausência e na presença da BSA. As amostras foram preparadas com adição da BSA, para os ligantes RX e AC (1 mmol L^{-1}), 10 μL de TMS em 99,9% de água deuterada a 2,5 mmol L^{-1} como padrão interno e, por fim, completadas com tampão fosfato 10 mmol L^{-1} para um volume final de 600 μL (CABRITA et al., 2011).

3.3.11 Avaliação da cinética de fibrilação protéica

Para a avaliação de cinética de fibrilação protéica, empregou-se como modelo de proteína a BSA (43,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$) na presença e ausência dos ligantes RX, AC e As(V) (150

$\mu\text{mol L}^{-1}$), empregando como sonda para a detecção de fibrilas amiloides a tioflavina T (ThT, $20 \mu\text{mol L}^{-1}$). As soluções foram incubadas à $65 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 78 horas, sendo retiradas alíquotas de $10 \mu\text{L}$ do sistema a cada 3 horas e adicionados $1000 \mu\text{L}$ de ThT e análise em utilizando $\lambda_{\text{ex}} = 442 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 488 \text{ nm}$ (GUAN; ZHANG; WANG, 2014).

3.3.12 Avaliação da inibição da fosfatase alcalina

A avaliação da inibição da atividade enzimática seguiu-se com a adição de $14,8 \text{ U L}^{-1}$ da fosfatase alcalina, 1 mmol L^{-1} de MgCl_2 e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ZnCl_2 como cofatores e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ da sonda 4-MUP. As análises foram realizadas nas concentrações de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ para os ligantes RX, AC e arseniato (controle positivo). Por fim, adicionou-se volume suficiente de tampão 50 mmol L^{-1} Tris.HCl à pH 9,5 para perfazer o volume final de 2 mL . Esperou-se aproximadamente 20 min , empregando como $\lambda_{\text{ex}}=364 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=364 \text{ nm}$ para análise das amostras (IQBAL, 2011).

3.3.13 Avaliação cinética de inibição da fosfatase alcalina

Para a avaliação da cinética de inibição da fosfatase alcalina empregou-se $7,4 \text{ U L}^{-1}$ da enzima, 1 mmol L^{-1} de MgCl_2 e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ZnCl_2 como cofatores, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ da sonda 4-MUP, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ para os ligantes RX e arseniato, respectivamente, e perfazendo o volume de 2 mL com tampão 50 mmol L^{-1} Tris.HCl à pH 9,5. As soluções estoques das amostras da sonda 4-MUP foi armazenada em frasco âmbar à $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e a do soro foi armazenada em um tubo falcon à 5°C . As análises foram avaliadas a partir do tempo 0 min até durante 60 min , empregando como $\lambda_{\text{ex}}=364 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=364 \text{ nm}$ para análise das amostras (IQBAL, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

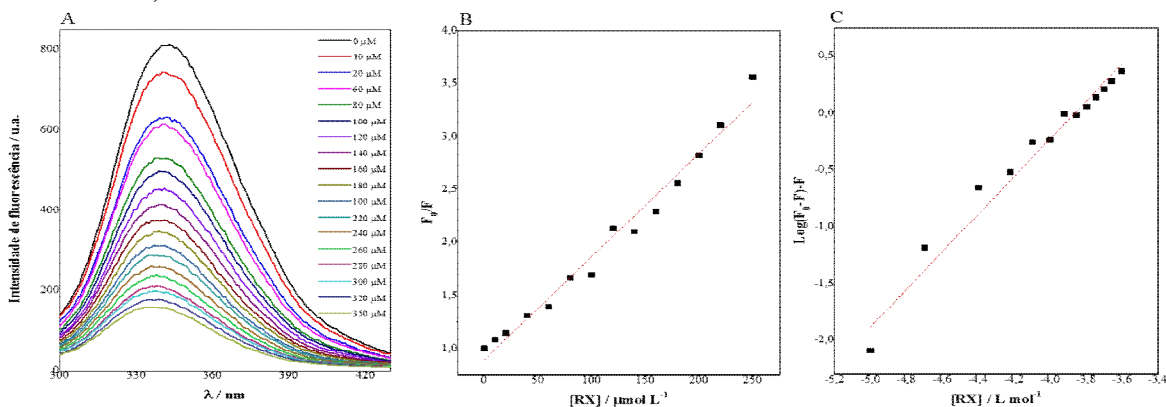
4.1 *Quenching* de fluorescência e a natureza das forças envolvidas no processo de interação macromolécula-ligante

Supressão de fluorescência (*quenching*) refere-se a qualquer processo que diminua a intensidade de fluorescência de um fluoróforo. Uma variedade de processos moleculares pode resultar em *quenching*, incluindo reações do estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação do complexo no estado fundamental, colisões, dentre outros (YU et al., 2014).

As medições de fluorescência de macromoléculas podem fornecer informações do processo de interação em relação ao ligante (*quencher*) e proteínas (fluoróforo) à nível molecular. A fluorescência intrínseca da proteína é atribuída aos resíduos de Trp, Tir e fenilalanina. Porém a fenilalanina tem um baixo rendimento quântico e a fluorescência de Tir é quase desativada quando está ionizada ou próxima a um resíduo de triptofano, grupamento amino ou carbóxico. Desta forma, o resíduo de Trp é maior responsável pela emissão de fluorescência da proteína (JANG et al., 2009).

A avaliação da interação da BSA-ligante foi realizada simulando condições fisiológicas de pH e força iônica numa titulação da proteína em que se adicionou incrementos dos ligantes ($0\text{-}350\ \mu\text{mol L}^{-1}$). A Figura 12 demonstra os espectros de emissão da BSA na presença dos ligantes RX e AC.

Figura 12 - (A) Espectro de fluorescência da BSA ($2\ \mu\text{mol L}^{-1}$) com adição de incrementos de RX ($0\text{-}350\ \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) Curva linear para cálculo de Stern-Volmer no processo de *quenching*; (C) Curva para determinação da constante de ligação. Condições: pH 7,4 à $30\ ^\circ\text{C}$.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Tanto a intensidade como a posição do espectro de emissão de fluorescência são sensíveis a alterações no ambiente do fluoróforo e, conseqüentemente, à estrutura proteica (CELEJ; MONTICH; FIDELIO, 2003). A BSA apresentou máximo de emissão em 342 nm, quando excitada em 280 nm. Em consonância com as Figura 12, observa-se que a intensidade do sinal diminuiu à medida que houve aumento da concentração dos ligantes, indicando que houve formação de um complexo não fluorescente da BSA com ambos os compostos (SURYAWANSHI et al., 2016).

A titulação com RX apresentou deslocamento do máximo de emissão de 342 nm para 336 nm. Este deslocamento para o azul indica que o microambiente ao redor do cromóforo presente na proteína tornou-se mais hidrofóbico após a interação (SURYAWANSHI et al., 2016). De forma contrária, a interação da BSA com AC resultou num deslocamento para o vermelho indicando mudança para um ambiente hidrofílico (WANG et al., 2008). Além disso, considerando que a redução de fluorescência utilizando o RX foi mais efetiva em relação ao AC, isto indica que a interação BSA-RX é maior que BSA-AC. Estes resultados demonstram que tanto RX quanto AC causam mudanças na estrutura da proteína.

A partir dos espectros da titulação da BSA é possível obter informações quantitativas relacionadas ao processo de interação, tais como constante de Stern-Volmer (K_{SV}), que é relacionado ao processo de *quenching* de fluorescência obtido através da Equação (1). A constante de ligação (K_b), que indica a intensidade de interação entre a proteína com cada um dos ligantes, calculada através da Equação (2) e a estequiometria proteína-ligante dada por n (YU et al., 2014).

O processo de *quenching* de fluorescência nos estudos de interação pode ser classificado em dinâmico, resultante de encontros colisionais entre o fluoróforo e o *quencher*; ou estático, quando resulta na formação de um complexo no estado fundamental entre o fluoróforo e *quencher*. O mecanismo de *quenching* pode ser evidenciado pela sua dependência à variação de temperatura, por exemplo (SURYAWANSHI et al., 2016). Neste âmbito, o valor de K_{SV} foi calculado em três temperaturas diferentes (22, 30 e 38°C) com o objetivo de elucidar o mecanismo de *quenching* envolvido no processo de interação da BSA com os ligantes RX e AC. Os valores de K_{SV} em função da temperatura estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros termodinâmicos e de ligação referentes a interação da BSA e os ligantes RX e AC. Condições: pH 7,4.

Ligante	T (°C)	Parâmetros de ligação					Parâmetros termodinâmicos		
		K_{sv} (10^4 L mol^{-1})	r	K_b (10^5 L mol^{-1})	r	n	ΔH (kJ mol^{-1})	ΔS ($\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)	ΔG (kJ mol^{-1})
RX	22 (295 K)	$1,73 \pm 0,01$	0,9928	$5,01 \pm 0,02$	0,9406	1,00	-19,74	+41,65	-12,31
	30 (303 K)	$1,66 \pm 0,03$	0,9952	$4,27 \pm 0,01$	0,9560	0,99			-12,64
	38 (311 K)	$1,52 \pm 0,01$	0,9579	$3,30 \pm 0,02$	0,9693	1,02			-12,97
AC	22 (295 K)	$1,71 \pm 0,03$	0,9562	$1,34 \pm 0,01$	0,9772	1,26	-185,52	-528,7	-155,80
	30 (303 K)	$1,65 \pm 0,03$	0,9533	$0,27 \pm 0,01$	0,9772	1,10			-160,02
	38 (311 K)	$1,62 \pm 0,02$	0,9100	$0,027 \pm 0,01$	0,9956	0,87			-164,25

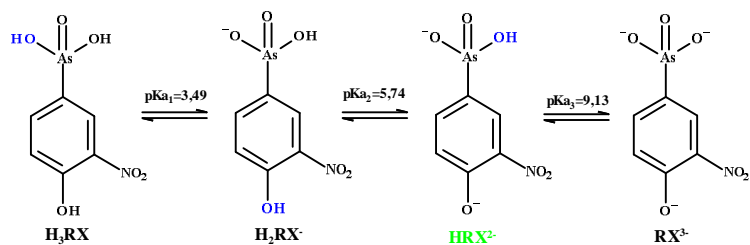
Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

De acordo com os resultados da Tabela 2, o mecanismo preferencial de interação da macromolécula com os compostos RX e AC foi por *quenching* estático, uma vez que com o aumento da temperatura ocorreu redução nos valores de K_{SV} e, desta forma, diminuiu a estabilidade do complexo no estado fundamental (VEERALAKSHMI et al., 2014). Os parâmetros termodinâmicos, tais como a energia livre de Gibbs (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) do sistema em estudo, são importantes para interpretar o modo de ligação e formação do complexo supramolecular (YU et al., 2014).

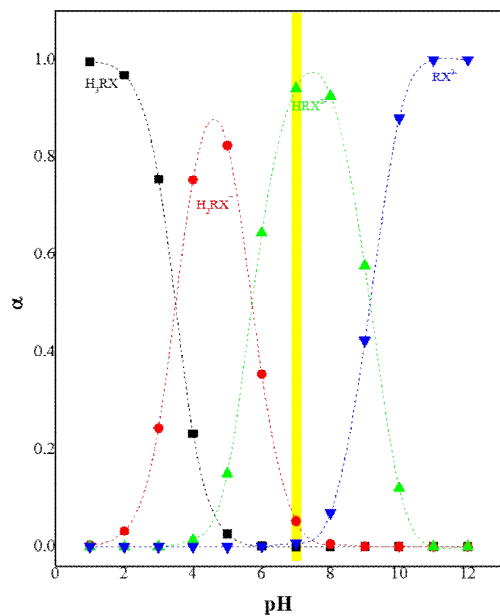
Para ambos os ligantes, RX e AC, o processo de interação com a BSA foi espontâneo, uma vez que o valor de ΔG foi negativo. Com relação ao modo de ligação, a interação da BSA e RX apresentou $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ e, conseqüentemente, as forças envolvidas no complexo BSA-RX foram preferencialmente eletrostáticas. Quimicamente, este resultado está associado a espécie predominante de RX no meio, justificando por que a interação da BSA ocorre preferencialmente por forças eletrostáticas. Em meio fisiológico simulado (pH = 7,4 e 0,1 mol L⁻¹HCl), a espécie preponderante no meio apresenta duas cargas negativas (HRX²⁻). A distribuição das espécies de RX está representada na Figura 13 na forma molecular (Figura 13A1) e gráfica (Figura 13A2).

Figura 13 - Em (A) estão representados o equilíbrio ácido-base das espécies de RX (A1) e gráfico de distribuição de espécies de RX (A2). Em (B) estão representados o equilíbrio ácido-base das espécies de AC (B1) e o gráfico de distribuição de espécies de AC (A2).

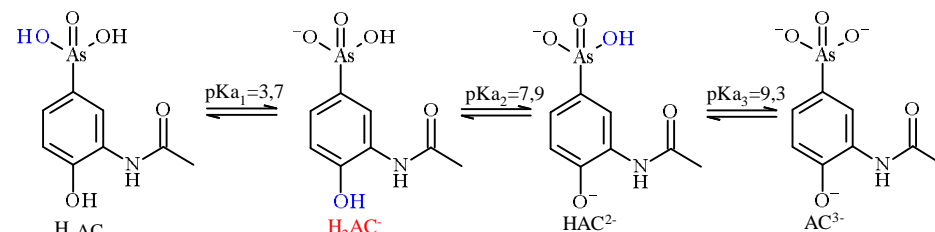
A1



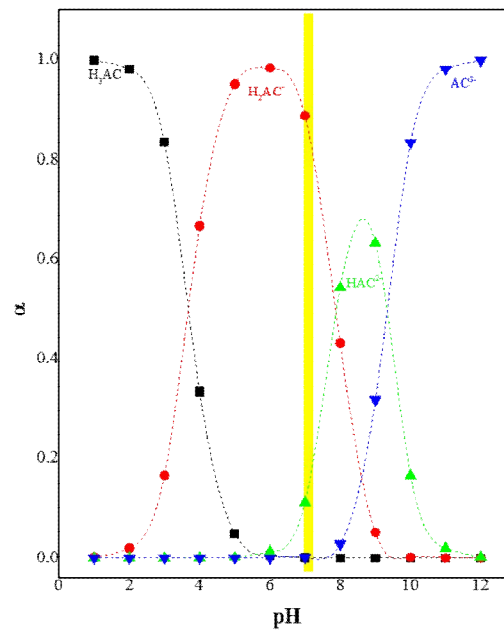
A2



B1



B2



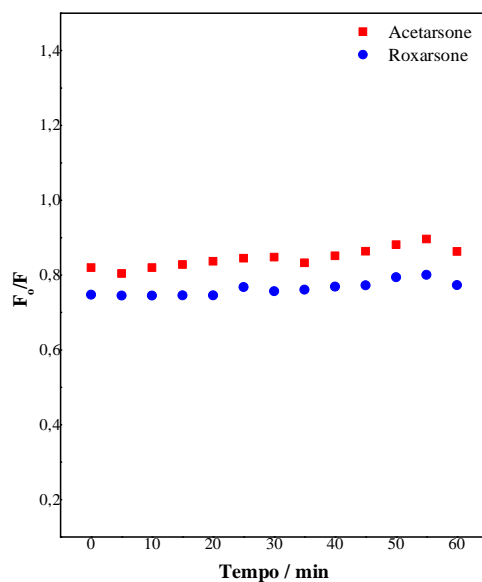
Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

A interação BSA-AC apresentou $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ e, neste caso, as forças que atuam neste processo são, preferencialmente, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals (XIAO et al., 2007). Em meio fisiológico simulado a espécie H_2AC^- é a predominante no meio e, desta forma, é possível acontecer preferencialmente ligações do tipo forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, associados aos grupamentos hidroxilas. A distribuição das espécies de AC está representada na Figura 13 na forma molecular (Figura 13B1) e gráfica (Figura 13B2).

Com relação ao grau de interação entre a BSA e os compostos RX e AC, calculados a partir da equação (2), ambos foram classificados como interação do tipo moderada (LEHNINGER; NELSON, 2000) uma vez que os valores para K_b foram de $4,27 \pm 0,01 \times 10^5$ e $0,27 \pm 0,01 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ para RX e AC, respectivamente. Como pode ser visto, RX apresentou um valor de K_b superior ao AC, o principal fator para este resultado está nas forças que atuam na interação, para o RX são forças eletrostáticas e, esta ligação é mais forte que interação de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Outro fator que pode estar relacionado é o AC ser produto do metabolismo biológico do RX e, desta forma, ser um dos produtos de excreção, uma vez que quanto maior a cadeia carbônica do composto, menos tóxico tende a ser espécie de arsênio (HUGHES, 2002). O valor de K_b para compostos estruturalmente semelhantes também apresentaram interação moderada, tais como o ibuprofeno ($1,4 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$) (HAGE; TERENCE; WAINER, 1995) e o ácido acetilsalicílico ($1,5 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$) na interação com BSA (NAFISI; SADEGHIC; YABA, 2011). Estudos similares foi realizado investigando a interação do trióxido de arsênio com as albuminas BSA ($K_b = 1,27 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$) e HSA ($K_b = 1,07 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$) (SHOOSHTARYA; BEHTASHA; NAFISI, 2015) e roxarsone com ácido húmico (K_b variou de $0,45 - 7,76 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$) (ZHU et al., 2014). A estequiometria proteína-ligante para ambos os casos, foi de 1:1, resultado demonstrado pelo valor de n na Tabela 2.

Com o objetivo de avaliar o tempo de formação do complexo investigou-se a cinética de equilíbrio para a formação do complexo logo após a adição do ligante no sistema durante 1 h. As medições foram realizadas no intervalo de 5 em 5 minutos. A partir da Figura 14 não se observa variação nos valores de F_0/F , sendo a formação do complexo imediata e mantendo-se estável logo após a adição de ambos os ligantes RX e AC no meio.

Figura 14 - Cinética reacional de formação do complexo durante o período de 60 min. Condições: pH 7,4 e 30°C.



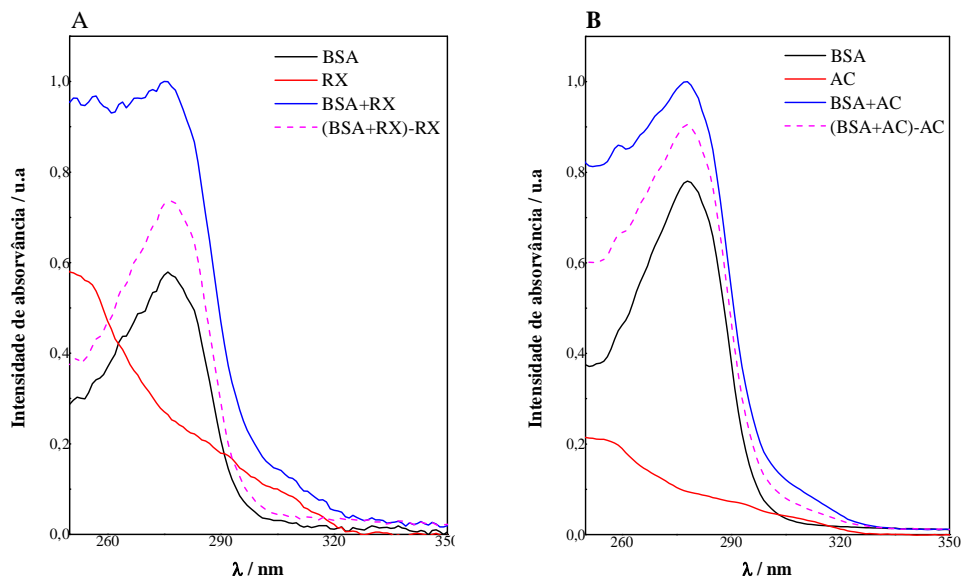
Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

4.2 Avaliação do complexo proteína-ligante por espectroscopia de UV-vis

A espectroscopia de UV-vis é uma técnica simples e efetiva para confirmar alguns resultados por fluorescência, como a formação do complexo (CHAKRABORTY; LEDWANI, 2016) e o tipo de *quenching* (METI et al., 2015).

A fim de avaliar a formação do complexo supramolecular na presença de cada ligante, foram realizados ensaios de UV-vis empregando a solução da proteína e os ligantes RX e AC puros e a mistura (complexo). A partir dos resultados apresentados na Figura 15 observa-se que a BSA apresentou máximo de absorção em 276 nm, referente aos resíduos de aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina pelas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ nesta região (CHAVES et al., 2015). A evidência de formação do complexo supramolecular BSA-ligante deve-se ao efeito hipercrômico após adição de cada ligante ao sistema. Outro fato que comprova a formação do complexo é através da avaliação do espectro resultante da diferença ((BSA+L)-L) entre o espectro de absorvância do complexo (BSA+L) e absorvância do ligante (L: RX ou AC), como o espectro resultante não foi sobreponível ao espectro da BSA, indica que há formação do complexo supramolecular.

Figura 15 - Espectros de absorção de UV-vis para: (A) BSA ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), RX ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$), complexo BSA+RX e a diferença dos espectros (BSA+RX) - RX e, (B) BSA ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), AC ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$), complexo BSA+AC e a diferença dos espectros (BSA+AC) - AC. Condições: pH 7,4 à 30°C .



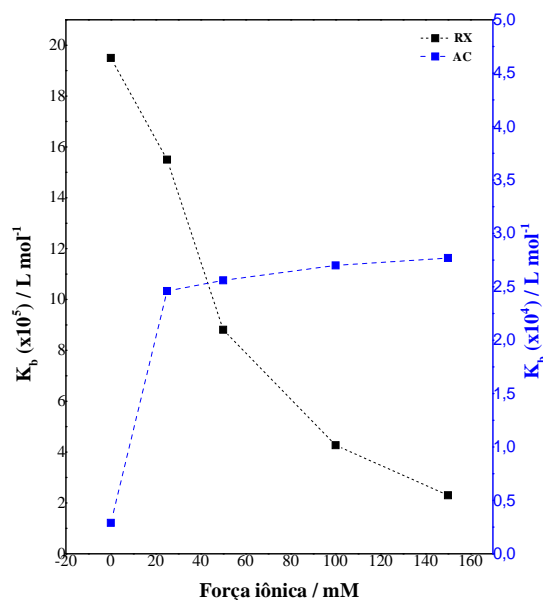
Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Considerando que o espectro de absorção dos ligantes é alterado em seu estado fundamental, pois não há sobreposição dos espectros após a interação, confirma o mecanismo por *quenching* estático. Uma vez que o mecanismo por *quenching* dinâmico seria plausível caso não houvesse alteração na subtração dos espectros, visto que o complexo é formado no estado excitado (TAYYAB et al., 2016). Resultado similar foi obtido por Li e colaboradores (2015) para o mecanismo de interação por *quenching* estático para a interação da BSA com a droga antitumor, ftalocianina de zinco(II).

4.3 Avaliação da força iônica no processo de interação

A avaliação da concentração salina do meio auxilia a esclarecer a natureza das ligações envolvidas no processo de interação, uma vez que a força iônica afeta diretamente ligações do tipo eletrostáticas entre o ligante e a proteína (OTZEN, 2002). O processo de interação com os ligantes RX e AC foi avaliado na ausência e na presença de várias concentrações de NaCl (0 - 150 mmol L^{-1}).

Figura 16 - Avaliação do efeito do NaCl (0-150 mmol L⁻¹) no processo de interação para os sistemas BSA-RX e BSA-AC em pH 7,4 a 30°C.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

A partir dos resultados (Figura 16) é possível observar que houve redução do K_b à medida que a concentração de NaCl aumentava para formação do complexo BSA-RX, desfavorecendo o processo de interação para este sistema. Como já evidenciado, o modo de ligação preferencial para o sistema BSA-RX envolve forças eletrostáticas e, quanto maior a força iônica do meio maior a separação de cargas das moléculas envolvidas no processo de interação BSA e RX, dificultando a formação do complexo. Vale ressaltar que, apesar da BSA ($pI= 4,6$) apresentar carga negativa global nas condições avaliadas ($pH=7,4$), a formação do complexo supramolecular ocorre em uma região específica da proteína e, desta forma, a atração eletrostática ocorre entre as cargas negativas do ligante RX com os resíduos de aminoácidos carregados positivamente (lisina, histidina e arginina) presentes na cadeia da BSA (LIANG; CHENG; HAN, 2008). O trabalho desenvolvido por Mahesha e colaboradores (2006) observou também observou redução do K_b a partir da interação da isoflavona genisteína com HSA.

Em contraste, para o sistema BSA-AC, após a adição do primeiro incremento de NaCl (25 mmol L⁻¹), houve aumento da K_b . Neste caso, o ajuste da força iônica deve ter tornado a estrutura da BSA mais compacta e, desta forma, o ligante pode ter se deslocado para regiões mais internas da proteína, favorecendo o processo de interação BSA-AC (KADI et al., 2006), uma vez que as forças envolvidas no processo são do tipo ligações de hidrogênio e forças de

Van der Waals, como já mencionado. Para os demais incrementos o valor de K_b torna-se praticamente constante, inferindo que para os demais ajustes da força iônica não houve implicação no processo de interação.

4.4 Investigação das mudanças conformacionais na estrutura da BSA

4.4.1 Fluorescência tridimensional

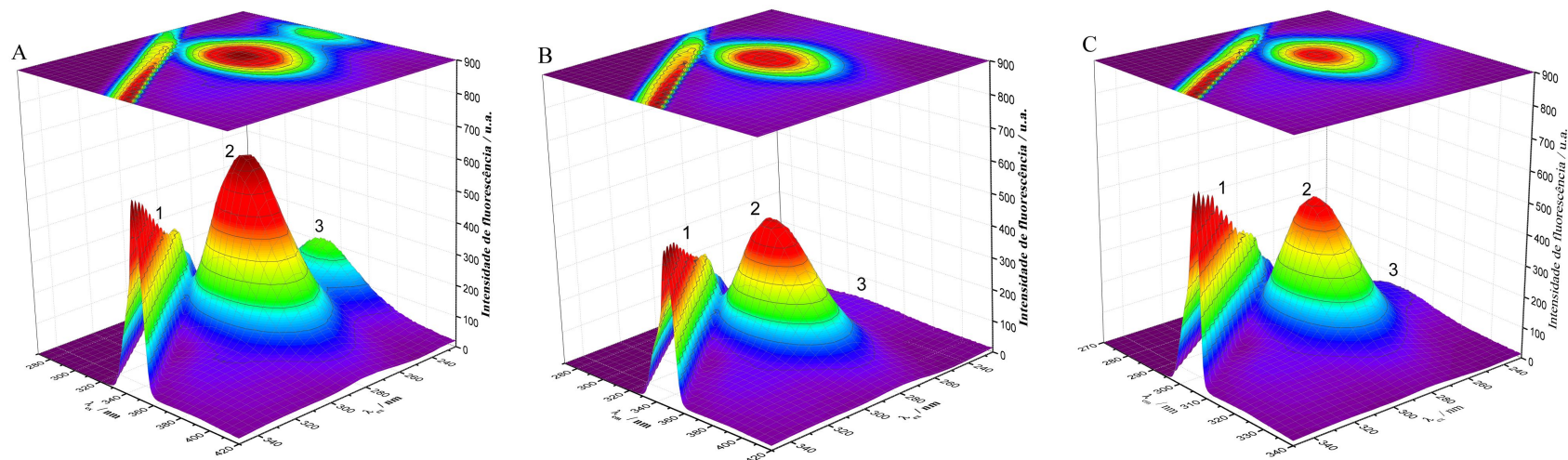
A ligação de moléculas à proteína pode induzir mudanças conformacionais pelo fato das forças intramoleculares envolvidas na manutenção da estrutura secundária ser alteradas (KANDAGA et al., 2006). As alterações conformacionais na estrutura da proteína podem ser investigadas a partir das mudanças características das bandas de emissão referentes à cadeia polipeptídica e dos resíduos de triptofano e tirosina através da fluorescência tridimensional. A figura 17A apresenta o espectro de fluorescência tridimensional da BSA, pelo qual se observa três picos: (1) espalhamento Rayleigh ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$), associado ao espalhamento inelástico de radiação; (2) referente a banda de emissão dos resíduos de Trp e Tir ($\lambda_{ex} = 285$ nm) e, (3) intensidade de fluorescência relacionada à cadeia polipeptídica da BSA ($\lambda_{ex} = 238$ nm) (CHATURVEDI et al., 2014). A Figura 17B e 17C expressa os gráficos da fluorescência 3D par os sistemas BSA+RX e BSA+AC, respectivamente.

As mudanças observadas na estrutura da proteína a partir do processo de interação podem ser mensuradas através da análise comparativa do perfil do espectro de emissão tridimensional da BSA livre e ligada aos compostos AC e RX. De acordo com os resultados expressos na Tabela 3, observa-se que os picos 2 e 3 do espectro de emissão tridimensional do sistema BSA+RX reduziram em 31 e 82%, respectivamente, em comparação ao espectro de emissão da BSA. Enquanto que no sistema BSA+AC os picos 2 e 3 apresentaram 23 e 65% de redução da intensidade de emissão.

Esta redução para ambos os picos 2 e 3, infere que houve tanto alteração no microambiente de resíduos de triptofano e tirosina quanto na estrutura da cadeia polipeptídica na BSA, respectivamente (TIAN et al., 2015). Desta forma, o processo de interação revela mudanças na estrutura terciária da BSA com ambos os ligantes RX e AC. Ainda com relação a Tabela 3, a variação do deslocamento Stokes dos picos de emissão da BSA a partir da adição de cada ligante está associada a mudanças da polaridade na região em torno dos resíduos de aminoácidos Tir e Trp ou na conformação global da proteína (ZHANG; ZOU; LIU, 2012). Resultado similar foi encontrado por Ariga e colaboradores (2015) em que foi

observado redução dos picos 2 e 3 a partir do processo de interação entre o anti-histamínico de segunda geração cloridrato de epinastina com a BSA.

Figura 17 - Gráfico da fluorescência tridimensional para BSA ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) (A), BSA+RX ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$) (B) e (C) BSA+AC ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições: pH 7,4 à 30°C .



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Tabela 3 - Dados de fluorescência tridimensional para os sistemas BSA, BSA+RX e BSA+AC.

Pico	BSA ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$)			BSA ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) + RX ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$)			BSA ($2 \mu\text{M}$) + AC ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$)		
	Posição $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	Intensidade de Fluorescência	Posição $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	Intensidade de Fluorescência	Posição $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$	Stokes $\Delta\lambda$ (nm)	Intensidade de Fluorescência
1 (Efeito Rayleigh)	$\lambda_{\text{ex}}=\lambda_{\text{em}}$	0	-	$\lambda_{\text{ex}}=\lambda_{\text{em}}$	0	-	$\lambda_{\text{ex}}=\lambda_{\text{em}}$	0	-
2 (Trp e Tir)	278/341	63	585 (100,0%)	285/340	94	414 (31%)	278/337	59	453 (23%)
3 (Cadeia polipeptídica)	230/340	110	230 (100,0%)	238/338	98	135 (82%)	234/348	114	80 (65%)

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

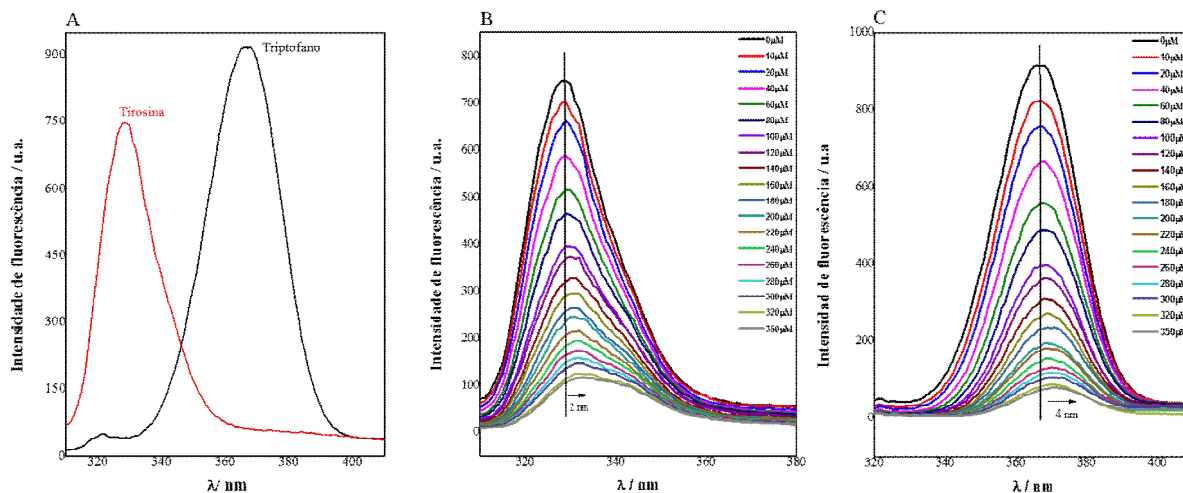
4.4.2 Fluorescência sincronizada

A fluorescência sincronizada fornece informações sobre mudanças no microambiente ao redor dos resíduos de aminoácido, Tir e Trp, após interação com o ligante. As características dos espectros destes resíduos podem ser vistas quando o intervalo entre o comprimento de onda de excitação e emissão ($\Delta\lambda$) for de 15 e 60 nm, respectivamente (YU et al., 2014). Através das avaliações de K_{sv} e de possíveis mudanças no máximo de emissão que correspondem às alterações de polaridade em torno destes fluoróforos, pode-se estabelecer qual dos resíduos está mais próximo da região de interação (ZHANG; ZOU; LIU, 2012).

A Figura 18 demonstra que é possível ter uma separação espectral para os resíduos de Tir e Trp quando se aplica $\Delta\lambda = 15$ e 60 nm (Figura 18A) e os espectros dos resíduos de Tir (Figura 18B) e Trp (Figura 18C) na presença de incrementos de RX (0-350 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A partir dos resultados expostos na Tabela 4 e Figura 18 (B e C) observa-se que houve deslocamento para maiores valores no máximo de emissão da BSA na presença de ambos os ligantes, indicando aumento da polaridade do microambiente dos resíduos de aminoácidos e mudanças na conformação da BSA (LIU et al., 2012). Para a interação BSA-AC, ambos os resíduos apresentaram 4 nm de deslocamento para o vermelho e, desta forma, este dado não permite inferir qual dos resíduos tem seu ambiente mais afetado na presença do ligante AC. Porém, na interação BSA-RX, o resíduo de Trp apresentou deslocamento de 4 nm e Tir de 2 nm, ambos para o vermelho, indicando que o microambiente do resíduo de Trp torna-se mais polar e mais exposto às moléculas de solvente durante o processo de ligação ao comparado com o resíduo de Tir.

A constante de Stern-Volmer é o parâmetro quantitativo que indica qual dos resíduos possui seu ambiente mais afetado partir do processo de interação. De acordo com os valores expressos na Tabela 4, o valor de K_{sv} para o sistema BSA-RX é maior para o resíduo Trp ($3,23 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$), inferindo que este resíduo influencia mais no processo de interação em comparação ao resíduo de Tir. Com relação ao sistema BSA-AC, o resíduo de Tir apresentou maior K_{sv} ($1,09 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$) e, de maneira análoga, pode-se afirmar que este resíduo sofre maior influência no processo de interação e pode estar mais próximo ao sítio de ligação BSA-AC. Resultado similar foi observado por Naik e colaboradores (2014) em que se mudanças na conformação das albuminas BSA e HSA e o microambiente ao redor dos resíduos de Trp e Tir torna-se menos hidrofóbico e mais exposto às moléculas de solvente durante o processo de interação com hidroxirúria.

Figura 18 - (A) Espectro de emissão sincronizado para os resíduos de tirosina ($\Delta\lambda = 15$ nm) e triptofano ($\Delta\lambda = 60$ nm) da BSA livre. Titulação empregando fluorescência sincronizada para os resíduos de: (B) Tir e (C) Trp, com adição de incrementos de RX (0-350 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Condições: pH 7,4 à 30°C.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Tabela 4 - Valores de KSV relativos a titulação por fluorescência sincronizada para a interação BSA com os ligantes RX e AC). Condições: pH 7,4 a 30°C.

Ligantes	$\Delta\lambda=15$			$\Delta\lambda=60$		
	$K_{sv} (x10^4) \text{ mol L}^{-1}$	r	Deslocamento $\lambda_{\text{máx}}$	$K_{sv} (x10^4) \text{ mol L}^{-1}$	r	Deslocamento $\lambda_{\text{máx}}$
RX	1,79	0,9683	+2	3,23	0,9523	+4
AC	1,09	0,9966	+4	0,83	0,9848	+4

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

4.5 Determinação do índice de hidrofobicidade protéico – emprego da sonda ANS

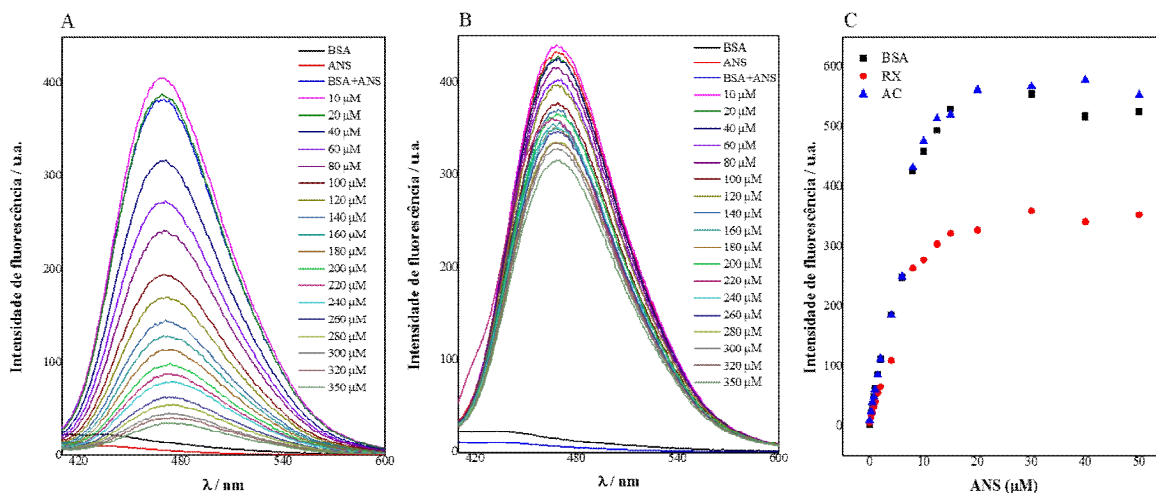
O emprego da sonda ANS (ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato) permite esclarecer possíveis mudanças na hidrofobicidade da superfície protéica a partir da formação do complexo da BSA com os ligantes RX e AC. Esta sonda hidrofóbica possui baixo rendimento quântico, porém ao ligar-se em regiões apolares da proteína tem sua intensidade de fluorescência aumentada (RANJBAR et al., 2013).

As propriedades de ligação do ANS à BSA podem ser investigadas mensurando a constante de dissociação aparente de fluorescência do complexo BSA-ANS (K_d) e pela intensidade de fluorescência máxima ($F_{\text{máx}}$) na concentração de ANS suficiente para saturação dos sítios da BSA. Este ensaio baseia-se na titulação da BSA com incrementos de ANS (0 -50 μM) em sistemas contendo a proteína na presença e ausência dos ligantes. Neste modelo, é necessário a determinação da $[\text{ANS}]_{\text{livre}}$, para tanto se faz um gráfico da intensidade de fluorescência (F) em função da $[\text{ANS}]_{\text{total}}$ (C_{ANS}) na condicional da $[\text{ANS}]_{\text{máxima}} = [\text{BSA}]$.

Desta relação linear, se estabelece a seguinte equação: $F = BC_{ANS}$, onde B é o coeficiente de proporcionalidade entre intensidade de fluorescência e C_{ANS} . A $[ANS]_{ligado}$ foi então avaliada a partir da fórmula: $[ANS]_{ligado} = F/B$, sendo a $[ANS]_{livre}$ obtida a partir da diferença entre a $[ANS]_{total}$ e $[ANS]_{ligado}$. Com isso, os valores de K_d e $F_{máx}$ foram obtidos a partir do inverso do coeficiente angular da relação F vs $F/[ANS]_{livre}$ e em função da saturação da BSA com ANS (ZHANG; HU; PAN, 2014). Estes dois parâmetros podem fornecer informações sobre as diferenças nas propriedades de ligação do ANS à BSA na presença e ausência dos ligantes RX e AC. Por conseguinte, o índice de hidrofobicidade da proteína (PSH) foi obtido empregando a equação (8). É possível observar na Figura 19A e Figura 19B redução da afinidade da sonda ANS às regiões hidrofóbicas na superfície da BSA devido à formação do complexo supramolecular a partir da titulação da BSA com os ligantes RX e AC, respectivamente. Este resultado indica que ambos os ligantes modificaram a superfície da BSA (Tabela 5).

A interação da ANS-BSA com RX apresentou aumento de K_d (19%) e diminuição de PSH em relação a interação BSA-AC. Isto está associado ao fato do RX possuir maior K_b e com isso, maior afinidade para interação com a proteína, o que reduz a afinidade da ligação ANS-BSA refletida no aumento do valor de K_d (46,6%). A diminuição de PSH (61,3%) ocasionada pelo RX na BSA está associada à mudança de carga na superfície da BSA o que dificulta a interação ANS-BSA e reduz as regiões hidrofóbicas da BSA.

Figura 19 - Espectro de fluorescência do complexo ANS-BSA com adição dos ligantes (A) RX e (B) AC, sendo ANS ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$), BSA ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$), RX e AC ($0\text{-}350 \mu\text{mol L}^{-1}$). (C) Perfil da ligação do ANS ($0\text{-}50 \mu\text{mol L}^{-1}$) a BSA ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) na ausência presença dos ligantes RX e AC. Condições: pH 7,4 e 30°C .



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Tabela 5 - Valores de K_d , $F_{m\acute{a}x}/[BSA]$ e PSH para os sistemas BSA+ANS, BSA+ANS+RX e BSA+ANS+AC.

Sistemas	K_d	$F_{m\acute{a}x}/[BSA]$	PSH
BSA+ANS	0,58	504	869
BSA+ANS+RX	0,85	286	336
BSA+ANS+AC	0,47	613	1304

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

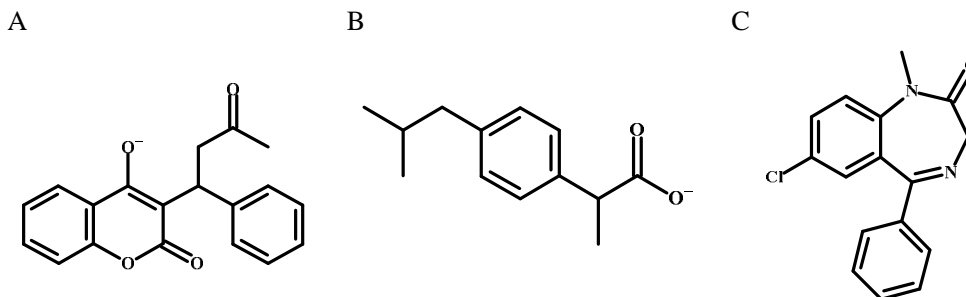
De acordo com a Tabela 5, observa-se aumento do valor de K_d (46,60%) na presença do RX apontando que a magnitude de ligação ANS-BSA é menor quando o ligante está presente. Isto sugere que houve diminuição das regiões hidrofóbicas na presença de RX. Com relação ao valor de PSH, este diminuiu (61,30%) devido a formação do complexo BSA-RX indicando que houve um desfavorecimento de porções hidrofóbicas na superfície da BSA. Em contraste, na presença do ligante AC no sistema BSA-ANS o valor de K_d diminuiu (19%), sugerindo que a presença do ligante promove uma maior interação entre o ANS e a BSA e, desta forma, aumento de regiões hidrofóbicas na superfície protéica. Ademais, o valor de PSH aumentou (50,10%) para o sistema contendo AC confirmando o aumento da hidrofobicidade da superfície protéica decorrente a formação do complexo supramolecular.

Além disso, estes resultados corroboram com a titulação da sonda ANS (0-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) no sistema contendo BSA e o ligante (Figura 19C), uma vez que o complexo BSA-RX evidenciou maior mudanças na hidrofobicidade da superfície da proteína, em comparação ao complexo BSA-AC.

4.6 Avaliação do sítio de ligação preferencial na BSA

Os principais locais de ligação na BSA são denominados sítio I e o sítio II e estão localizados nos subdomínios IIA e IIIA, respectivamente. Com o objetivo de investigar o sítio preferencial de ligação para os ligantes RX e AC foram realizados estudos de competição com os marcadores: varfarina (Figura 20A) (ligação ao sítio I) e ibuprofeno (Figura 20B) (ligação ao sítio II) (ZHANG et al., 2013). Ademais, como o ibuprofeno pode-se ligar a outras regiões da BSA foi empregado outro marcador de maior seletividade para o sítio II, o diazepam (Figura 20C) (ZSILA, 2013).

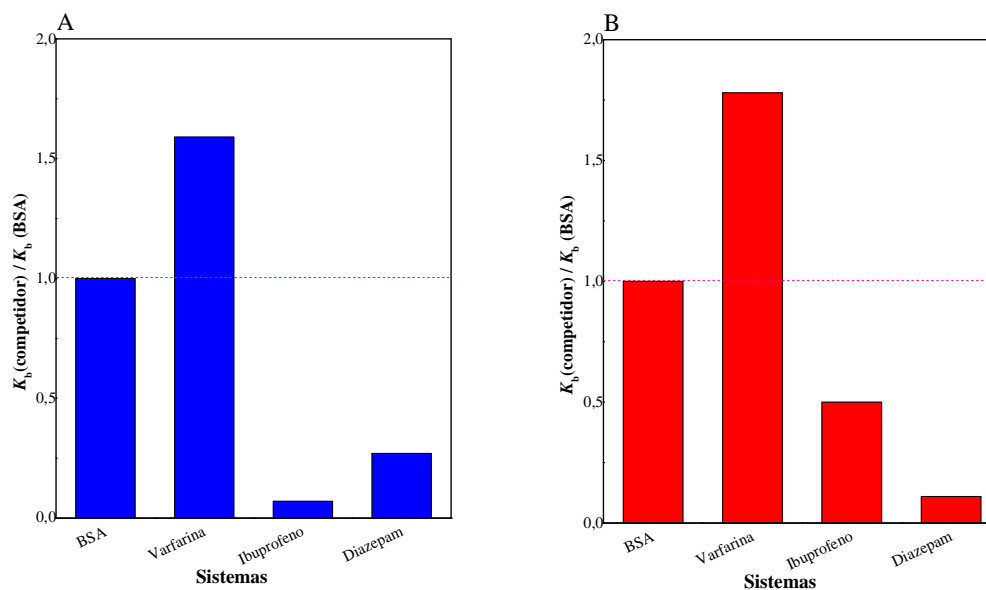
Figura 20 - Estrutura química dos marcadores (A) varfarina, (B) ibuprofeno e (C) diazepam na condição fisiológica de pH (7,4).



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

A partir dos resultados expressos na Figura 21, observa-se que após a adição dos ligantes RX e AC houve redução dos valores de K_b nos sistemas que continham os marcadores ibuprofeno e diazepam, devido o deslocamento desses na presença de ambos os ligantes. Desta forma, o sítio preferencial de ligação para os ligantes RX e AC foi o sítio II. Além disso, na presença de varfarina os ligantes RX e AC apresentam aumento nos valores K_b , provavelmente em função de alterações induzidas pela varfarina ao ligar-se no sítio II. Uddin e colaboradores (2004) obtiveram o mesmo sítio preferencial de ligação (sítio II) para a avaliação da interação do As(III) com a BSA.

Figura 21 - Avaliação do sítio de ligação na BSA ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) a partir da razão dos valores de K_b em na ausência e presença dos marcadores ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$) varfarina, ibuprofeno e diazepam para os ligantes (A) RX e (B) AC.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

4.7 Avaliação de competidores no processo de interação dos ligantes RX e AC

Diversos tipos de espécies estão presentes no sangue humano possuindo a capacidade de ligar-se a proteínas e, desta forma, afetar a ligação de compostos à BSA (WANG et al., 2008). Para investigar o efeito dos íons no processo de interação dos ligantes RX e AC com a BSA, foram selecionadas dez espécies dentre as mais abundantes no plasma e comparados seus valores de K_b com o sistema BSA-RX e BSA-AC na ausência e presença destas espécies (Tabela 6). Ressaltando que para a análise a razão da concentração entre a BSA e os competidores nas condições fisiológicas foi empregada como critério.

Tabela 6 - Espécies presentes no plasma e soro humano.

Espécie	Concentração no plasma/soro (mmol L ⁻¹)	Concentração adotada (mmol L ⁻¹)	Proporção [competidor]/[HSA]	Referência
HSA	0,53 – 0,83	0,70	-	
Glicose	3,88-5,50	5,00	7,6	
Ca(II)	2,15 – 2,50	2,45	3,5	BISHOP; FODEY;
Mg(II)	0,63 – 1,00	0,70	1,0	SCHOEFF, 2005.
H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻	0,87 – 1,45	0,70	1,0	
Fe(III)*	0,65 – 1,70	1,05	1,5	
Zn(II)**	0,013 – 0,014	0,35	0,5	
Cu(II)**	0,037 – 0,044	0,35	0,5	KOBAYASHI et al., 2006.
Acido oleico	1,28 – 3,21	2,80	4,0	GLASER et al., 2010;
Ácido linoleico	2,56 – 4,92	3,50	5,0	ALMEIDA et al., 2002;
HCO ₃ ⁻	21-30	24	3,4	MOTTA, 2009

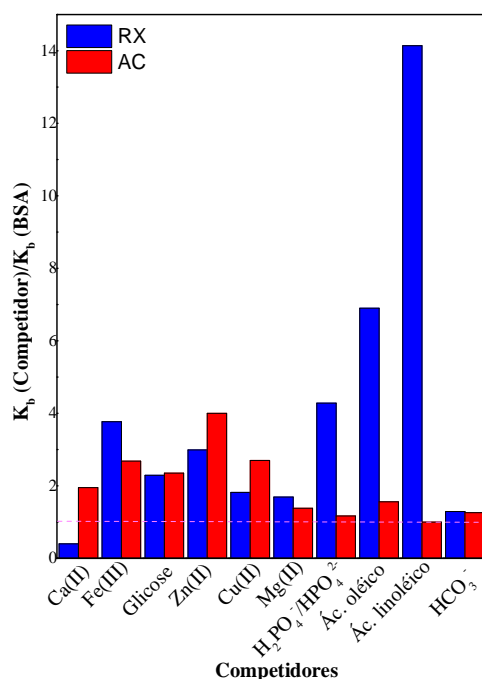
*Concentração de ferro total.

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

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

De acordo com os resultados expostos (Figura 22), a maioria dos competidores influenciou de forma positiva no processo de interação para os sistemas BSA-RX e BSA-AC, devido à razão das constantes ($K_b(\text{competidor})/K_b(\text{BSA})$) ser maior que a unidade. De acordo com trabalho desenvolvido por Roy e colaboradores (2013), observou-se um efeito induzido de íons metálicos sob a estrutura da BSA, aumentando a afinidade da genisteína com a BSA. Uma das explicações para este fato pode ser devido às interações entre íons e resíduos de proteínas serem importantes para a estabilidade das mesmas, possuindo implicações importantes para suas funções biológicas (WU et al., 2008).

Figura 22 - Efeito dos competidores entre a razão dos valores de K_b , na ausência e presença dos competidores para a interação da BSA com RX a AC. Condições: pH 7,4 a 30°C.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

O sistema BSA-RX na presença do competidor Ca(II) apresentou redução do valor da constante. Sabendo-se que o RX interage com a BSA por forças eletrostáticas, as cargas negativas deste ligante podem ser neutralizadas a partir da formação do complexo com o Ca(II) e, neste caso, a interação com a BSA é desfavorecida. O mesmo perfil não pode ser observado para o sistema BSA-AC, uma vez que o processo de interação acontece por interação do tipo ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. Neste caso, a presença do Ca(II) pode induzir a mudanças conformacionais na proteína favorecendo a interação da BSA e AC.

Além disso, observa-se que houve aumento da constante de interação para o sistema BSA-RX na presença dos ácidos linoléico e oléico. Este perfil pode repousar no fato da ligação de ácidos graxos de cadeia longa a regiões hidrofóbicas da BSA induzir modificações na estrutura tridimensional da proteína, tornando os resíduos de aminoácidos de cadeia lateral polar, em especial os com carga negativa, a se localizarem mais internamente. Desta forma, a ligação do RX pode ser favorecida, uma vez que a carga global negativa da proteína pode diminuir e a interação de RX com a BSA ocorre por forças do tipo eletrostáticas (CURRY et al., 1998). Ademais, no trabalho desenvolvido por Bhattacharyaa, Grüne e Currya (2000), os

autores observaram que as mudanças conformacionais nos domínios I e III devem-se a ligações de ácidos graxos nos subdomínios IA e IIA. Este perfil pode também influenciar a ligação de RX e, em menor grau, AC, pois ambos se ligam no sítio II da BSA que está localizado no subdomínio IIIA.

4.8 Transferência de Energia Ressonante de Förster - FRET

A transferência de energia ressonante de Förster (FRET) é frequentemente empregada para calcular a distância no local de ligação entre resíduo de aminoácido (fluoróforo) da proteína com a molécula de interesse e, depende das seguintes condições: (a) o doador pode produzir fluorescência; (b) o espectro de absorção do receptor deve se sobrepor suficientemente com o espectro de emissão de fluorescência do doador e (c) a distância entre o doador e o receptor deve ser inferior a 8 nm (CHENG; JIANG; LIU, 2013).

A integral de sobreposição (J) dos espectros de emissão de fluorescência do doador e o espectro de absorção do receptor (Figura 23), a eficiência de transferência de energia (E , equação (5)), a distância crítica de Förster (R_0 , equação (6)) em que 50% da energia de excitação é transferida para o aceptor e, a distância entre o ligante e o triptofano da proteína (r_0 , equação (6)) para os ligantes RX e AC estão expressos na Tabela 7. De acordo com WANG et al., os valores de K^2 (fator de orientação que está diretamente relacionado com a geometria do dipolo entre o doador e o aceptor é, igual a $2/3$, para orientação aleatória em solução), n (índice de refração do meio é igual a 1,336) e Φ (rendimento quântico da proteína é 0,15 para BSA) foram empregados para os cálculos da interação dos ligantes RX e AC com a BSA.

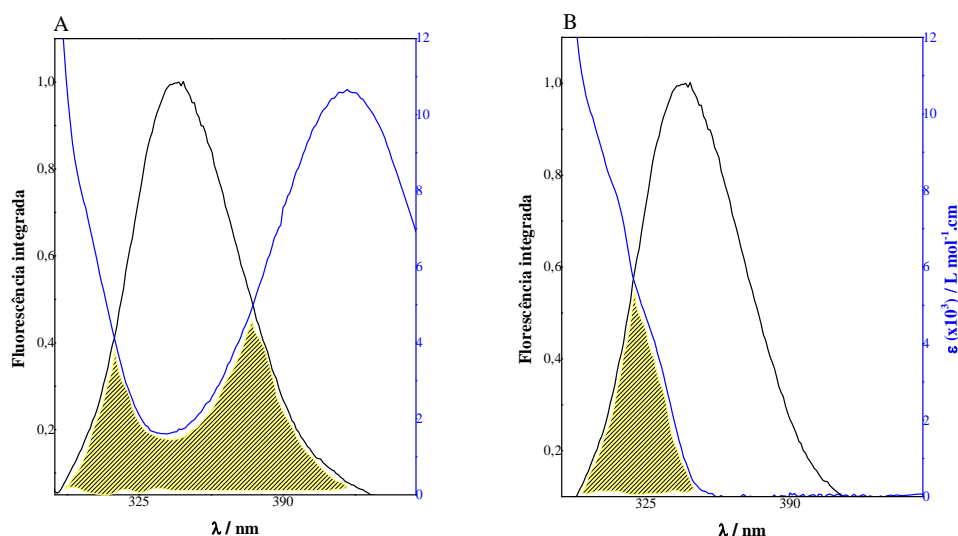
De acordo com os resultados expressos na Tabela 7, houve transferência de energia eficaz entre o resíduo de triptofano da BSA para os ligantes RX e AC em ambas as proporções empregadas, uma vez que o doador (BSA) e os ligantes estão no intervalo de distância crítica (GHOSH; RATHI; ARORA, 2016).

Tabela 7 - Valores de J , E , R_0 e r_0 para a interação dos ligantes RX e AC nas razões 1:1 e 1:2 de BSA:L (ligante).

Ligante (L)	Razão (BSA:L)	J ($10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$)	E (%)	R_0 (nm)	r_0 (nm)
RX	1:1	6,86	3,2	2,27	4,00
	1:2	6,82	7,1	2,26	3,47
AC	1:1	2,45	3,3	1,91	3,35
	1:2	2,45	6,8	1,91	2,95

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Figura 23 - Área de sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência da BSA e o espectro de absorção dos ligantes RX (A) e AC (B).



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

4.9 Avaliação da interação proteína-ligante por espectroscopia de RMN ^1H

Com o emprego da espectroscopia de RMN ^1H é possível mensurar, em alguns casos, a região de interação do ligante na proteína a partir da variação de deslocamento químico ($\Delta\delta$) de cada hidrogênio após a interação do ligante com a proteína (CALA; GUILLIÈRE; KRIMM, 2014). O assinalamento químico dos hidrogênios dos ligantes RX e AC, expostos na Tabela 8, estão de acordo com Lloyd e colaboradores (2008).

De acordo com os resultados obtidos por RMN ^1H , a partir da Tabela 8, observa-se maior variação no deslocamento químico dos hidrogênios do anel aromático após interação da macromolécula com o composto AC quando comparado ao RX. Isso é um indicativo de que, o composto AC interage em uma porção mais interna da proteína, possivelmente devido à interação ocorrer por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, como observado nos ensaios por fluorescência molecular. Este perfil pode ser explicado, pois o grupamento amida pode formar ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos da cadeia lateral da BSA, fazendo com o que os hidrogênios aromáticos tenham seu ambiente químico mais afetado pela interação com a BSA. Apesar da interação por força eletrostática ser mais forte que as por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (GONZÁLEZ-RUIZ et al., 2011), é provável que a interação eletrostática do RX com a BSA aconteça superficialmente e, desta forma, o ambiente químico dos hidrogênios da molécula RX não seja tão afetado, justificando

a menor variação no deslocamento químico. Os espectros de RMN ^1H para os compostos RX e AC estão representados na Figura 24 e Figura 25, respectivamente.

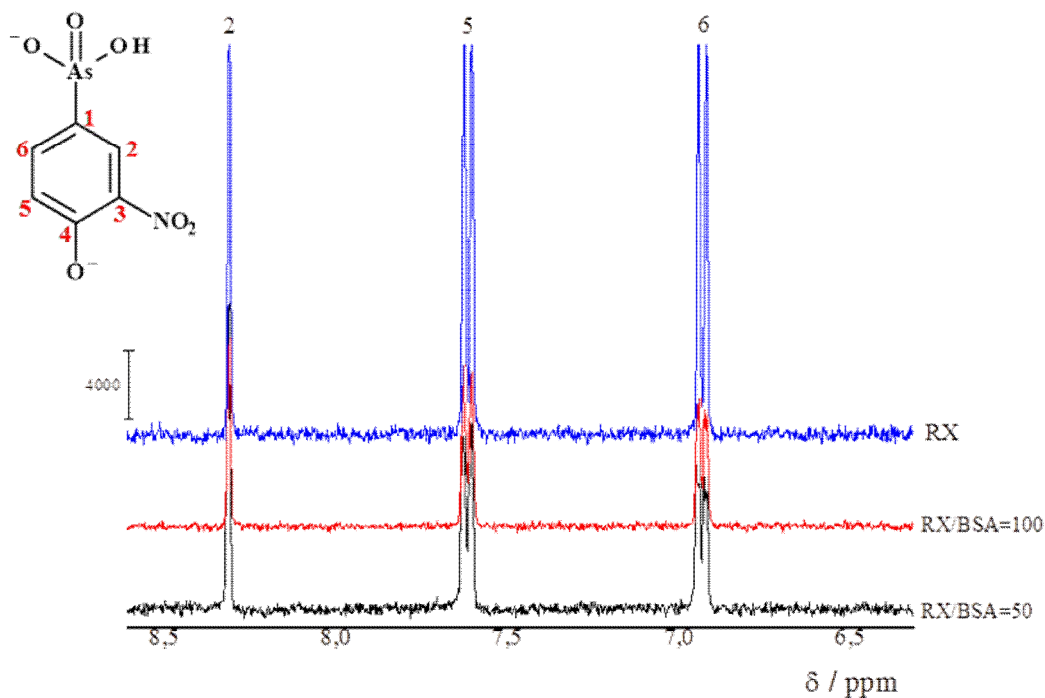
Tabela 8 - Deslocamento químico (δ) RMN ^1H (400 MHz) para os ligantes (L) RX e AC na ausência e presença de diferentes concentrações da BSA. a) L, b) L/BSA = 50, c) L/BSA = 100, em tampão fosfato (10 mmol L $^{-1}$), pH 7,4.

Ligantes (L)	Hidrogênio	L ^a	(a) L	δ / ppm		$\Delta\delta^b$
				L/BSA (proporção)		
				(b) 100	(c) 50	
RX	2	8,19	8,311	8,313	8,312	-0,002
	5	7,31	7,617	7,619	7,618	-0,002
	6	7,84	6,932	6,934	6,933	-0,002
AC	2	-	7,823	7,828	7,838	-0,015
	5	-	7,554	7,556	7,560	-0,006
	6	-	7,131	7,138	7,150	-0,019
	7	-	2,231	2,232	2,237	-0,006

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

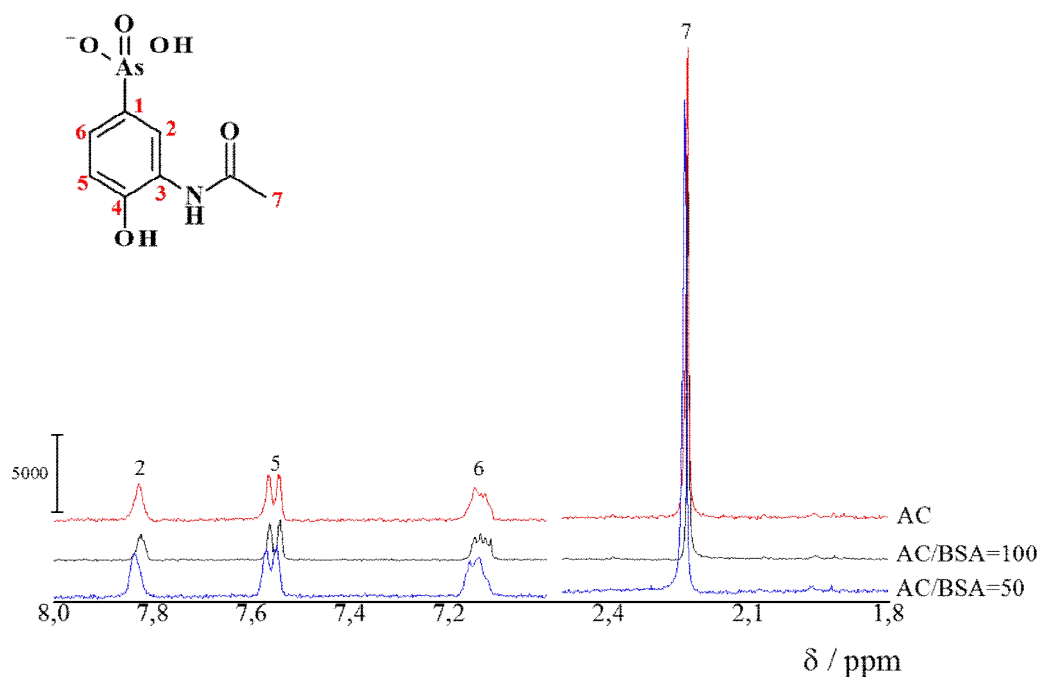
Nota: ^a δ para RX em DMSO- d_6 por Lloyd e colaboradores (2008) / ^b $\Delta\delta$ foi calculado baseado na diferença entre $\delta(L)$ e $\delta(L/BSA = 50)$.

Figura 24 - Espectros de RMN ^1H (400 MHz) para 1 mmol L $^{-1}$ do ligante RX na presença de BSA para RX/BSA=50 e RX/BSA=100.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Figura 25 - Espectros de RMN ^1H (400 MHz) para 1 mmol L^{-1} do ligante AC na presença de BSA para AC/BSA=50 e AC/BSA=100.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

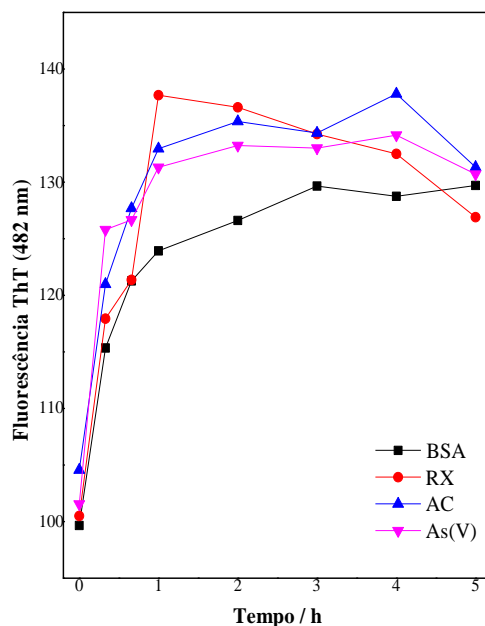
4.10 Avaliação *in vitro* do efeito prejudicial dos COA(V) à funcionalidade de proteínas

4.10.1 Avaliação da cinética de fibrilação na formação de fibrilas amiloides

A formação de fibrilas amilóides está relacionada com uma série de doenças neurodegenerativas (doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington) e, uma das suas causas é a presença de compostos tóxicos que podem induzir a esta formação (JUARÉZ et al., 2009).

A análise cinética de formação de fibrilas amilóides (Figura 26) foi realizado em sistemas contendo BSA na presença e ausência dos ligantes RX e AC durante 78 h, empregando como sonda a ThT (DEY et al., 2015). Os sistemas BSA na ausência e na presença de RX, AC e As(V) foram incubadas a 65°C. Foi empregando como controle positivo arsênio inorgânico As(V), em relação aos compostos avaliados. Os cálculos da cinética de fibrilação para RX, AC e As(V) foi realizado a partir da equação (9) e seus resultados estão expressos na Tabela 9.

Figura 26 - Cinética de fibrilação para a BSA na presença e ausência dos ligantes RX, AC e As(V), todos a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos do processo de fibrilação da BSA para RX, AC e As(V).

Sistemas	ΔF	K_{sp} (h^{-1})	n
BSA	30,06	$2,02 \pm 0,10$	$0,69 \pm 0,04$
BSA+ RX	37,18	$1,95 \pm 1,10$	$0,48 \pm 0,25$
BSA+ AC	33,24	$2,00 \pm 0,57$	$0,50 \pm 0,16$
BSA+ As(V)	32,60	$5,88 \pm 2,58$	$0,41 \pm 0,11$

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

O efeito dos ligantes RX e AC e As(V) para indução de fibrilas proteicas em função do tempo é mostrado na Figura 24B. A presença dos ligantes RX e AC ao sistema contendo BSA não influenciaram a formação de fibrilas amiloides, uma vez que os valores de K_{sp} não apresentaram aumento quando comparado com o sistema contendo apenas BSA. Em contraste, a adição de As(V) no sistema da BSA proporcionou um aumento de 291% no processo de fibrilação proteica quando os valores de K_{sp} foram comparados. Além disso, todos os sistemas apresentaram $n < 1$, indicando que a cinética pode estar associada a múltiplos mecanismos para a formação de amiloides (JUARÉZ et al., 2009). Desta forma, os possíveis efeitos tóxicos dos ligantes RX e AC não estão relacionados ao processo de formação de fibrilas amiloides.

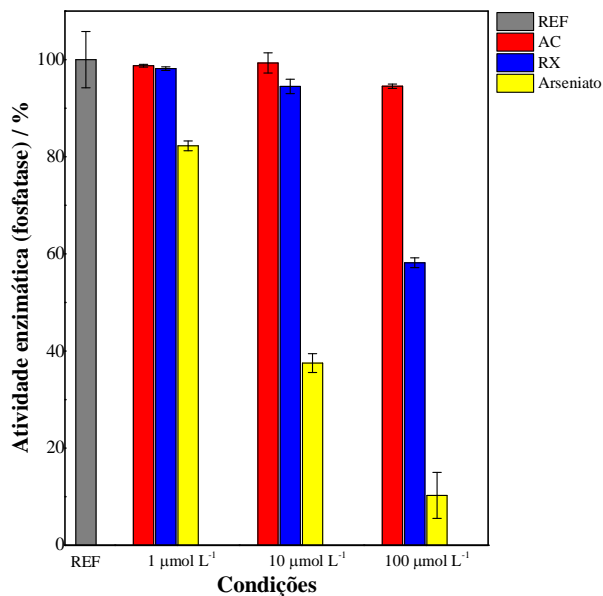
4.10.2 Avaliação da inibição e cinética da fosfatase alcalina

Sabendo-se que a enzima fosfatase alcalina é capaz de hidrolisar monoésteres de fosfato e derivados (SIMÃO et al., 2007) e que, o arseniato, espécie com arsênio em estado de oxidação +5, é um inibidor clássico desta enzima (SHIRAZI; BEECHEY; BUTTERWORTH, 1981), avaliou-se a atividade da fosfatase alcalina na presença dos compostos RX e AC.

Além da avaliação de inibição da atividade enzimática pelos compostos RX e AC, utilizou-se o arseniato como controle positivo. De acordo com os resultados expressos na Figura 27, observa-se inibição da atividade enzimática desde o primeiro incremento ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) do controle positivo e, desta forma, o arseniato pode estar relacionado ao maior grau de efeitos maléficos nas condições avaliadas quando comparado com os compostos de arsênio orgânicos RX e AC. A partir do incremento de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ dos inibidores, observa-se redução enzimática de 63% na presença do arseniato, enquanto que na mesma concentração o RX inibiu a atividade enzimática em 6% e, para o composto AC, não houve inibição. Já na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, o arseniato reduz a atividade enzimática em aproximadamente 90%, enquanto que os compostos RX e AC, a redução da atividade da fosfatase alcalina foi de 42 e 5%, respectivamente.

Como argumentado anteriormente, um dos principais mecanismos relacionados aos efeitos deletérios por espécies de arsênio é a sua ligação a macromoléculas, tais como proteínas e enzimas (REHMANA et al., 2012). Neste ponto de vista, a avaliação da inibição enzimática fornece indícios do efeito danoso à fosfatase alcalina considerando um sistema *in vitro*. Neste sentido e de acordo com os resultados obtidos, por inibir de forma mais efetiva a atividade enzimática, o composto RX pode possuir efeitos mais prejudiciais ao organismo em comparação ao AC, ajudando a esclarecer o perfil inibição enzimático observado.

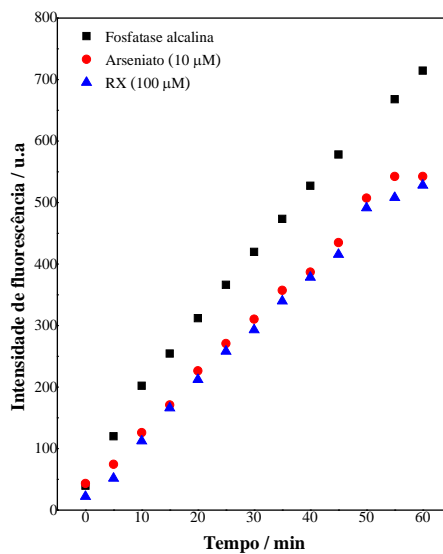
Figura 27 - Avaliação da inibição da fosfatase alcalina ($14,8 \text{ U L}^{-1}$) pelo arseniato, RX e AC em diferentes concentrações ($1, 10$ e $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições: pH 7,4 (Tris-HCl 10 mmol L^{-1}).



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Tendo-se como base os resultados de inibição enzimática, selecionou-se o RX e o arseniato (controle positivo) para avaliação cinética de inibição da atividade da fosfatase alcalina. Para tanto se empregou 100 e $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de RX e arseniato, respectivamente. De acordo com os resultados expostos na Figura 28, os compostos RX e arseniato apresentaram inibição semelhantes. Além disso, a atividade enzimática começa ser inibida desde 5 min , atingindo estabilização do sinal em 55 min de análise por ambos os compostos.

Figura 28 - Cinética da atividade enzimática da fosfatase alcalina ($7,4 \text{ U L}^{-1}$) na presença dos compostos arseniato ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e RX ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições: pH 7,4 (Tris-HCl 10 mmol L^{-1}).



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Por fim, ambos os ensaios, inibição da atividade e cinética de inibição da atividade enzimática, fornece indícios do comportamento dos compostos RX e AC *in vitro* e, desta forma, possibilita uma compreensão preliminar dos possíveis efeitos danosos desses compostos. Apesar de o sistema empregado não possuir tanta complexidade quando comparadas a outros sistemas, tais como mitocôndria, célula, animal, por exemplo, o estudo fornece um direcionamento para análises mais minuciosas posteriores.

5 CONCLUSÃO

Estudos de interação foram empregados para avaliar o comportamento dos ligantes RX e AC com a proteína carreadora BSA por fluorescência, UV-vis e RMN ^1H . De acordo com o que foi visto, os estudos de interação, simulando condições fisiológicas, revelou que o processo ocorre por *quenching* estático para ambos os ligantes. Os dados termodinâmicos revelaram que o processo de interação com os ligantes ocorreu de maneira espontânea e, a natureza das forças envolvidas entre BSA-RX foi preferencialmente por forças eletrostáticas, enquanto que BSA-AC foi por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. Ademais, ambos os ligantes revelaram grau de interação moderada com a proteína sendo de $4,27(\pm 0,01) \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ e $0,27(\pm 0,01) \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ para RX e AC, respectivamente. A ligação ocorreu de forma preferencial pelo sítio II, localizado no subdomínio IIIA, da proteína para os ligantes RX e AC. O ensaio de competição evidenciou que apenas o íon Ca(II) desfavoreceu o processo de interação para o sistema BSA-RX, enquanto que na presença do ácido oléico, ácido linoléico e fosfato houve favorecimento demasiado da interação em relação aos outros competidores. Já no sistema BSA-AC a presença dos íons Zn(II) e Fe(III) favoreceu o processo de interação frente aos demais.

O ensaio de FRET revelou transferência de energia eficaz entre o resíduo de triptofano da BSA com os ligantes, a distância entre resíduo de aminoácido da BSA com os ligantes RX e AC foi de 4,00 e 3,35 nm, respectivamente. O estudo de hidrofobicidade revelou que a interação BSA-RX deslocou de forma mais efetiva a sonda ANS e, desta forma, a interação com RX diminuiu a presença de regiões hidrofóbicas da BSA, enquanto que o sistema BSA-AC aumentou a presença de tais porções na proteína. Além disso, a presença de ambos os ligantes proporcionou mudanças na estrutura terciária da BSA. A espectroscopia de RMN ^1H inferiu que a interação do ligante RX com a BSA deve acontecer na superfície proteica, enquanto que a interação com AC deve ocorrer na porção próxima ao grupo amida.

Por fim, foram empregados ensaios visando avaliar os efeitos danosos dos ligantes RX e AC em sistemas pró-tréicos *in vitro*. O ensaio de fibrilação da BSA não revelou favorecimento da formação de fibrilas para ambos os ligantes. Já no ensaio de inibição da atividade da fosfatase alcalina, o ligante RX (42%) demonstrou inibição enzimática efetiva, quando comparado ao AC (5%), ambos na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Nesta mesma concentração o arseniato (controle positivo) revelou inibição de 90% na atividade da fosfatase alcalina. Este resultado fornece indícios de que o composto RX pode assumir efeitos mais prejudiciais ao organismo em comparação ao AC.

REFERÊNCIAS

- ABEDIN, M. J. Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, p. 962-968, 2002.
- ALBANI, J. R. **Principles and applications of fluorescence spectroscopy**. Estados Unidos: Blackwell Publishing, 2007.
- ALBERTS, B. et al. **Essential Cell Biology**, 3. ed. New York: Garland Science, 2010.
- ALMEIDA, I. T. et al. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. **Clinical Nutrition**, Lisboa, v. 21, p. 219-233, 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, 2015.
- ARIGA, K.; KUNITAKE, T. **Supramolecular chemistry: fundamentals and applications**. Ibaraki: Springer, 2006.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Bookman, 2001.
- BAI, Z. et al. Fluorescence resonance energy transfer between bovine serum albumin and fluoresceinamine. **Luminescence**, v. 31, p. 688-693, May 2016.
- BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; GUARDIA, M. Especificação de arsênio: uma revisão. **Química Nova**, 23, p. 58-70, abr. 2000.
- BASU, A; CHAKRABARTI, A. Hemoglobin interacting proteins and implications of spectrin hemoglobin interaction. **Journal of Proteomics**, v. 128, Oct. 2015.
- BASU, P. et al. Angiogenic potential of 3-Nitro-4-Hydroxy Benzene Arsonic Acid (Roxarsone). **Environmental Health Perspectives**, v. 116, p. 520-523, Jan. 2008.
- BASU, S. et al. Quenching of tryptophan fluorescence in various proteins by a series of small nickel complexes. **Dalton Trans.**, v. 41, 2720-2731, 2012.
- BAYSE, G. S. et al. Permeation of roxarsone and its metabolites increases caco-2 cell proliferation. **Advances in Biological Chemistry**, v.3, p. 389-396, Jul. 2013.
- BHATTACHARYA, A. A.; GRÜNE, T.; CURRYA, S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin1. **Journal of Molecular Biology**, v. 303, p. 721-732, Nov. 2000.
- BIANCALANAA M., KOIDEC, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics**, v. 1804, p. 1405-1412, Jul. 2010.

BISHOP, M.L.; FODEY, E.P.; SCHOEFF, L.E. **Clinical Chemistry**: principles, procedures, correlations. 5. ed. Filadelfia: Lippincott Williams E. Wilkins, 2005.

BRONOWSKA, A. K. **Thermodynamics of ligand-protein interactions**: implications for molecular design, thermodynamics – interaction studies – solids, liquids and gases. Alemanha: InTech, 2011.

BRUNSVELD, L.; PETKAU, K.; UHLENHEUER, D.A. Combining supramolecular chemistry with biology. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 2817-2826, Dez. 2010.

BYSE, G. et al. Permeation of roxarsone and its metabolites increases caco-2 cell proliferation. **Adv. Biol. Chem.**, v. 3, n. 4, p. 389-396, 2013.

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.; GUILLIÈRE, F.; KRIMM, I. NMR-based analysis of protein–ligand interactions. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 406, p. 943-56, 2014.

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

CARUSO, I.P. et al. Exploring the binding mechanism of Guaijaverin to human serum albumin: fluorescence spectroscopy and computational approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, England, v. 97, p.449-455, Nov. 2012.

CELEJ, M. S.; MONTICH, G.G.; FIDELIO, G. D. Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility. **Protein. Sci.**, v. 12, p. 1496-1506, 2003.

CHAKRABORTY, T.; LEDWANI, L. **Research methodology in chemical sciences**: experimental and theoretical approach. Oakville: Apple Academic Press, 2016.

Chang, R. **Physical chemistry for the biosciences**, Califórnia: University Science Book, 2005.

CHATURVEDI, S. K. et al. Elucidating the interaction of limonene with bovine serum albumin: a multi-technique approach. **Mol. BioSyst.**, v. 11, p. 307-316, Oct. 2014.

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

CHEN, B. et al. Therapeutic and analytical applications of arsenic binding to proteins. **Metallomics**, v. 7, p. 39-55, 2015.

CHEN, J. W. et al. Study of the interaction between baicalin and bovine serum albumin by multi-spectroscopic method. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 191, Sept., 2007.

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

CHIOUA, P. W.; CHENB, K.; YUA, B. Effect of dietary organic arsenicals and cupric sulfate on copper toxicity, liver accumulation and residue in eggs and excreta of laying hens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 73, p. 161-171, Jul., 1998.

CHOWDHRY, B. Z.; HARDING, S. E. **Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry**. New York: Oxford University Press, 2001.

COLEMAN, J. E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 21, p. 441-483, 1992.

CURRY, S. et al. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. **Nature Structural Biology**, v. 5, p. 827-835, Sept., 1998.

DAUS, B. et al. Analytical investigations of phenyl arsenicals in groundwater. **Talanta**, v. 75, p. 376-379, 2008.

DEY, J. et al. Effect of sodium salicylate and sodium deoxycholate on fibrillation of bovine serum albumin: comparison of fluorescence, SANS and DLS techniques. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 17, p. 15442-15445, May 2015.

DONGMEI, C. et al. Development of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of four organoarsenic compounds in the feeds of swine and chicken. **Journal of Chromatography B**, v. 879, Apr. 2011.

DOWNING, A. K. **Protein Nuclear Magnetic Resonance Techniques**. 2. ed. Totowa: Humana Press, 2004.

DROBNÁ, Z. et al. Metabolism of arsenic in human liver: the role of membrane transporters. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 3-11, 2010.

GAO, G.; XU, A. A new fluorescent probe for monitoring amyloid fibrillation with high sensitivity and reliability. **RSC Adv.**, v. 3, p. 21092-21098, Aug. 2013.

GETTINS, P.; COLEMAN, J. E. ^{113}Cd NMR: arsenate binding to cd(i1) alkaline phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 4987-4990, 1984.

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

GHISAIDOOBE, A. B. T.; CHUNG, S. J. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 22518-22538, Dec. 2014.

GHOSH, K.; RATHI, S.; ARORA, D. Fluorescence spectral studies on interaction of fluorescent probes with bovine serum albumin (BSA). **Journal of Luminescence**, v. 175, p. 135-140, Jul. 2016.

GIMÉNEZ, R. E. et al. Interaction of singlet oxygen with bovine serum albumin and the role of the protein nano-compartmentalization. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 94, p. 99-109, Feb., 2016.

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

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

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.

GONTIJO, B.; BITTENCOURT, F. Arsenic: a historical review. **Brazilian Dermatology Annals**, v. 80, p. 91-95, Oct. 2005.

GONZÁLEZ-RUIZ, V. et al. An overview of analytical techniques employed to evidence drug-DNA interactions: applications to the design of genosensors. In: KOMOROWSKA, M.; OLSZTYSKS-JANUS, S. **Biomedical engineering: trends, research and technologies**, InTech, 2011. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-trends-research-and-technologies>>. Acesso em 5 jan. 2017.

GORBY, M. S. Arsenic poisoning. **West. J. Med.**, v. 149, p. 308-315, Sept. 1988.

GRUBER, A. et al. **Bioinformatics in tropical disease research: a practical and case-study approach**. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2008.

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

GÜLER, T. et al. Electrochemical study of pyrite-ovalbumin interaction in relation to flotation. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 23, n. 9, Sept. 2013.

GURYANOV, I.; FIORUCCI, S.; TENNIKOVA, T. Receptor-ligand interactions: advanced biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 890-903, nov., 2016.

HAGE, D. S.; TERENCE, A. G.; WAINER, W. Characterization of the protein binding of chiral drugs by high-performance affinity chromatography interactions of R- and S-ibuprofen with human serum albumin. **Journal of Chromatography A**, v. 693, p. 23-32, Feb. 1995.

- HAI-ZAROUBI, M. **The anatomy of the host-guest binding energetics of bicyclic guanidinium-oxoanion ion-pairs**. 2002. 126 f. Dissertação (Mestrado em Química) – University. Department of Organic Chemistry and Biochemistry at the Technical. Munich, 2002.
- HALL, G. M. **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic & Professional, 1996.
- HARDING, S. E.; CHOWDHRY, B. Z. **Protein-ligand interactions: structure and spectroscopy**. New York: Oxford University Press, 2001.
- HEMALATHA, K.; MADHUMITHA, G. Study of binding interaction between anthelmintic 2, 3-dihydroquinazolin-4-ones with bovine serum albumin by spectroscopic methods. **Journal of Luminescence**, v.178, p. 163-171, 2016.
- HILLISCH, A.; LORENZB, M.; DIEKMANNB, S. Recent advances in FRET: distance determination in protein-DNA complexes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, p. 201-207 (202), Apr. 2001.
- HOLMBERG, K. et al. Interactions between a lipase and charged surfactants — a comparison between bulk and interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 88, Dez. 2000.
- HUGHES, M. F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. **Toxicology Letters**, v. 133, p. 1-16, Jul. 2002.
- HUNG, H.; CHANG, G. Differentiation of the slow-binding mechanism for magnesium ion activation and zinc ion inhibition of human placental alkaline phosphatase. **Protein Sci.**, v. 10, p. 34-45, 2001.
- IQBAL, J. An enzyme immobilized microassay in capillary electrophoresis for characterization and inhibition studies of alkaline phosphatases. **Analytical Biochemistry**, v. 414, p. 226-231, 2011.
- ISLAM, K. et al. Dose-response relationship between arsenic exposure and the serum enzymes for liver function tests in the individuals exposed to arsenic: a cross sectional study in Bangladesh. **Environ Health.**, v. 10, p. 1-11, 2011.
- JANG, J. et al. Binding of mitomycin C to blood proteins: A spectroscopic analysis and molecular docking. **Journal of Molecular Structure**, v. 928, p. 72-77, Jun. 2009.
- JOMOVA, K. et al. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. **J. Appl. Toxicol.**, v. 31, p. 95-107, 2011.
- JUARÉZ, J. et al. Influence of electrostatic interactions on the fibrillation process of human serum albumin. **J. Phys. Chem. B**, v. 113, p. 10521-10529, May 2009.
- KADI, N. et al. Unfolding and refolding of bovine serum albumin at acid pH: ultrasound and structural studies. **Biophysical Journal**. v. 91, p. 3397-3404, 2006.

KANDAGAL, P. B. et al. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 393-399, Jan. 2006.

KARBALAEI-HEIDARIA, H. R. et al. Interaction of prodigiosin with HSA and β -Lg: Spectroscopic and molecular docking studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 1504-1512, Apr. 2016.

KAZI, T. G. et al. Hazardous impact of organic arsenical compounds in chicken feed on different tissues of broiler chicken and manure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 87, p. 120-123, Jan. 2013.

KOBAYASHI, K. et al. Rapid and direct determination of selenium, copper, and zinc in blood plasma by flow injection-inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Biological Trace Element Research**, Tokyo, v. 115, p. 87-93, Jun. 2006.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. Baltimore: Springer, 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

LI, Y. et al. Spectroscopic study on the interaction of bovine serum albumin with zinc(II) phthalocyanine. **Luminescence**, v. 30, p. 1367-1374, Dec. 2015.

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

LIU, B. et al. Interaction of avelox with bovine serum albumin and effect of the coexistent drugs on the reaction. **Int. J. Anal. Chem.**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

LIU, C. et al. Arsenic accumulation by rice grown in soil treated with roxarsone. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 172, p.550-556, 2009.

LIU, S. et al. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 2, p. 144, 2016.

LIU, X. Arsenic pollution of agricultural soils by concentrated animal feeding operations (CAFOs). **Chemosphere**, v. 119, p. 273-281, Jun. 2014.

LLOYD, N. C. et al. Substituted phenylarsonic acids; structures and spectroscopy. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 693, p. 2443-2450, 2008.

LURIDIANA, A. et al. A facile strategy for new organic white LED hybrid devices: design, features and engineering. **RSC Adv.**, v. 6, p. 22111-22120, 2016.

MAHDIUNI, H.; DORRAJI, P.S.; JALALI, F. Binding of the neuroleptic drug, gabapentin, to bovine serum albumin: Insights from experimental and computational studies. **Journal of Luminescence**. v. 148, p 347-352 (347), Apr. 2014.

MAHESHA, H. G. et al. A spectroscopic study of the interaction of isoflavones with human serum albumin. **FEBS Journal**, v. 273, p. 451-467, 2006.

MAJOREK, K.A. et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. **Mol. Immunol.**, v. 52, p. 174-182, 2012.

MANGALGIRIA, K. P.; ADAKA, A.; BLANEY, L. Organoarsenicals in poultry litter: Detection, fate, and toxicity. **Environment International**, v. 75, p. 68-80, Feb. 2015.

METI, M. D. et al. Synthesis of a Novel Hydrazone Derivative and Biophysical Studies of Its Interactions with Bovine Serum Albumin by Spectroscopic, Electrochemical, and Molecular Docking Methods. **Journal of physical chemistry B**, v. 5, p. 249-255, Aug. 2015.

MILIUTINAA, M. et al. Synthesis, alkaline phosphatase inhibition studies and molecular docking of novel derivatives of 4-quinolones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 408-420, 2017.

MILLÁN, J. L. Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. **Purinergic Signal.**, p. 335-341, 2006.

MOREIRA, M. B. et al. Investigation of the fluorescence quenching of bovine and human serum albumin by ruthenium complex. **Química Nova**, v. 38, p. 227-232, 2015.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: princípios e interpretações**. 5. ed. Porto Alegre: Medbook, 2009.

NAFISI, S.; SADEGHIC, G. B.; YABA, A. P. Interaction of aspirin and vitamin C with bovine serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 105, p. 198-202, Dec. 2011.

NAIK, K. M.; KOLLI, D. B.; NANDIBEWOR, S. T. Elucidation of binding mechanism of hydroxyurea on serum albumins by different spectroscopic studies. **SpringerPlus**, v. 360, p. 1-13, 2014.

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. Chim. Acta.**, v. 580, p. 206-215, 2006.

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

OBAYASHI, Y.; IINO, R.; NOJI, H. A single-molecule digital enzyme assay using alkaline phosphatase with a coumarin-based fluorogenic substrate. **Analyst**, v. 140, p. 5065-5073, 2015.

OTZEN, D. E. Protein unfolding in detergents: effect of micelle structure, ionic strength, pH, and temperature. **Biophysical Journal**. v. 83, p. 2219-2230, 2002.

OZAKI, Y.; KAWATA, S. **Far- and deep-ultraviolet spectroscopy**. Tokyo: Springer, 2015.

PATGAR, M. et al. Spectroscopic exploration and thermodynamic characterization of desvenlafaxine interacting with fluorescent bovine serum albumin. **J. Mol. Recognit.**, p. 1-12, Mar. 2016.

PETERS, T. J. **All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications**. New York: Academic Press, 1996.

PETERS, T. The albumin molecule: its structure and chemical properties. In: _____. **All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications**. San Diego: Academic Press, 1996.

PEYRIN, E.; GUILLAUME, Y. C.; GUINCHARD, C. Characterization of solute binding at human serum albumin site II and its geometry using a biochromatographic approach. **Biophysical Journal**, v. 77, p. 1206, Sept. 1999.

PIEHLER, J. Spectroscopic techniques for monitoring protein interactions in living cells. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 24, p. 54-62, Feb. 2014.

PRADHAN, N. et al. Detection and monitoring of amyloid fibrillation using a fluorescence “switch-on” probe. **ACS Appl. Mater.**, v. 7, p. 25813-25820, Nov. 2015.

RANJBAR, S. et al. Studies of the Interaction between Isoimperatorin and Human Serum Albumin by Multispectroscopic Method: Identification of Possible Binding Site of the Compound Using Esterase Activity of the Protein. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-13, Sept. 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, n. 73, p. 72-78, Oct. 2016.

REHMANA, K. et al. Mechanisms underlying the inhibitory effects of arsenic compounds on protein tyrosine phosphatase (PTP). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 263, p. 273-280, 2012.

ROSEN, B. P.; AJEES, A. A.; MCDERMOTT, T. R. Life and death with arsenic, arsenic life: An analysis of the recent report “a bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus”. **Bioessays**, v. 33, p. 350-357, 2011.

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

SAHOO, H. Förster resonance energy transfer – A spectroscopic nanoruler: Principle and applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 12, n. 20, p. 20-30, Mar. 2011.

SAUER, M.; HOFKENS, J.; ENDERLEIN, J. **Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging**. Weinheim: Wiley-VCH, 2011.

SCHNEIDER, H. **Applications of supramolecular chemistry**. New York: CRC Press, 2012.

- SEETHARAMAPPAA, J. et al. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41, n. 2, p. 393-399, May 2006.
- SHEN, S. et al. Arsenic binding to proteins. **Chem. Rev.**, v. 113, p. 7769-7792, 2013.
- SHI, J. et al. Characterizing the binding interaction between antimalarial artemether (AMT) and bovine serum albumin (BSA): spectroscopic and molecular docking methods. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 162 p. 14-23, 2016.
- SHIA, J. et al. Binding interaction of ramipril with bovine serum albumin (BSA): insights from multi-spectroscopy and molecular docking methods. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 164, p. 103-111, 2016.
- SHIRAZI, S. P.; BEECHEY, R. B.; BUTTERWORTH, P. J. The use of potent inhibitors of alkaline phosphatase to investigate the role of the enzyme in intestinal transport of inorganic phosphate. **Biochem. J.**, v. 194, p. 803-809, 1981.
- SHOOSHTARYA, S.; BEHTASHA, S.; NAFISI, S. Arsenic trioxide binding to serum proteins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 148, p. 31-36, Jul. 2015.
- SIMÃO, A. M. S. et al. Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 146, p. 679-687, 2007.
- SINGHA, R. et al. Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 247-270, 2015.
- 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, Dec. 2013.
- SOUZA, V. R. et al. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química Nova**, v. 38, n. 2, 227-232, 2015.
- SUDLOW, G.; BIRKETT, D.J.; WADE, D.N. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular Pharmacology**, v. 11, p. 824-832, Jan., 1975.
- SUGIO, S. et al. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Eng.**, v.12, n. 6, p. 439-446, 1999.
- SULKOWSKA, A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 614, p. 227-232, Jan. 2002.
- 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.

- 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, Feb. 2016.
- TABAKI, M. et al. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modeling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1594, n. 85, p. 84-99, Jan. 2002.
- TAYYAB, S. et al. Binding of an anticancer drug, axitinib to human serum albumin: Fluorescence quenching and molecular docking study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 386-394, Sept. 2016.
- TIAN, Z. et al. Spectroscopic study on the interaction between mononaphthalimide spermidine (MINS) and bovine serum albumin (BSA). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 142, p. 103-109, 2015.
- TRYNDA-LEMIESZ, L. Paclitaxel–HSA interaction: binding sites on HSA molecule. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 12, Jun. 2004.
- UDDIN, S. J. et al. determination of binding sites of arsenic on bovine serum albumin using warfarin (site-I specific probe) and diazepam (site II specific probe). **Journal of biological sciences**, v. 4, p. 609-612, 2004.
- VEERALAKSHMI, S. et al. Study of single and double chain surfactant–cobalt(III) complexes and their hydrophobicity, micelle formation, interaction with serum albumins and antibacterial activities. **Inorg. Chem. Front.**, v. 1, p. 393-404, Sept. 2014.
- VINOGRADOVA, O.; QIN, J. NMR as a unique tool in assessment and complex determination of weak protein–protein interactions. **Top Curr Chem.**, v. 326, p. 35-45, 2012.
- VUS, K. et al. Thioflavin T derivatives for the characterization of insulin and lysozyme amyloid fibrils in vitro: Fluorescence and quantum-chemical studies. **Journal of Luminescence**, v. 159, p. 284-293, Nov. 2014.
- WALKER, H. K.; HALL, W. D.; HURST, J. W. **Clinical methods: the history, physical, and laboratory examinations**. 3. ed. Boston: Butterworths, 1990.
- WANG, G. et al. Exploration of interactions between decyl- β -D-glucopyranoside and bovine serum albumin in aqueous solution. **RSC Adv.**, v. 6, p. 19700-19706, 2016.
- WANG, J. et al. Spectroscopic analyses on interaction of Amantadine-Salicylaldehyde, Amantadine-5-Chloro-Salicylaldehyde and Amantadine-o-Vanillin Schiff-Bases with bovine serum albumin (BSA). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 83, p. 511-517 (516), Dec. 2011.
- WANG, L.; WANG, S.; CHEN, W. Roxarsone desorption from the surface of goethite by competitive anions, phosphate and hydroxide ions: significance of the presence of metal ions. **Chemosphere**, v. 152, p. 423-430, Jun. 2016.

WANG, N. et al. Spectroscopic studies on the interaction of efonidipine with bovine serum albumin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, p. 589-595, 2008.

WANG, S. S.; LIU, K.; WANG, L. Effects of dithiothreitol on the amyloid fibrillogenesis of hen egg-white lysozyme. **European Biophysics Journal**, v. 39, p. 1229-1242, Jul. 2010.

WANG, Y. et al. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. **Journal of Luminescence**, v. 126, p. 211-218, Jun. 2006.

WARIS, M. et al. Selective electroanalytical method for the determination of roxarsone in poultry feed and litter. **Food Anal. Methods**, v. 9, p. 2142-2151, Jan. 2016.

WILSON K.; WALKER, J. **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. 7. ed. United Kingdom: Cambridge University Press, 2010.

WU, L. et al. Influence of metal ions on folding pathway and conformational stability of bovine serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 877, p. 44-49, Apr. 2008.

WUANG, Y. et al. Studies of the interaction between paraquat and bovine hemoglobin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 243-250, Aug. 2007.

XIAO, J. 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, Nov. 2007.

XIAO, J. B. et al. Study of the interaction between baicalin and bovine serum albumin by multi-spectroscopic method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 609-615, Aug. 2007.

XIAO, J. B. et al. 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, Sept. 2007.

XIAO, Q. et al. Thermodynamics, Conformation and Active Sites of the Binding of Zn–Nd Hetero-bimetallic Schiff Base to Bovine Serum Albumin. **J. Fluoresc**, v. 19, p. 317-326, Oct. 2008.

YAMAMOTO, S. et al. Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 55, p. 1271-1276, 1995.

YAO, L. et al. Delivery of roxarsone via chicken diet → chicken → chicken manure → soil → rice plant. **Science of The Total Environment**, v. 566, p. 1152-1158, Oct. 2016.

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, Dec. 2014.

YU, X. Spectroscopic studies on the interaction of phacolysin and bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 127, p. 231-236, Jun. 2014.

ZAMAN, M. et al. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, 899-912, Feb. 2014.

ZANG, G. et al. Multispectroscopic studies on the interaction of maltol, a food additive, with bovine serum albumin. **Food Chemistry**, v. 133, p. 264-270, Jul. 2012.

ZHANG, G. et al. Multispectroscopic studies on the interaction of maltol, a food additive, with bovine serum albumin. **Food Chemistry**, v. 133, p. 264-270, Jan. 2012.

ZHANG, G.; HU, Y.; PAN, J. Interaction between toddalolatone and human serum albumin. **Journal of Solution Chemistry**, v. 43, p. 727-745, Abr. 2014.

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

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. 1-17, Mar. 2013.

ZHANG, Y. et al. Assensing the genotoxic potentials of roxarsone in V79 cells using the alkaline comet assay and micronucleus test. **Mutation Research**, v. 741, p. 65-69, 2012.

ZHU, J. P. et al. Characterizing the interaction between roxarsone and humic acid by fluorescence quenching experiment. **Environmental Science**, v. 35, p. 2620-2626, Jul., 2014.

ZHU, X. et al. A fluorescence spectroscopic study of the interaction between epristeride and bovin serum albumine and its analytical application. **Talanta**. v. 73, n. 4, p. 668-673, Oct. 2007.

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

ZSILA, F. Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model. **Mol. Pharmaceutics**, v. 10, p. 1668-1682, Mar. 2013a.