

Estudo da interação entre albuminas séricas e moléculas biologicamente ativas

Otávio Augusto Chaves

Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 Km 7,
23970-000, Seropédica - RJ, Brasil
otavio_ufrj@hotmail.com

Studies on the interaction between serum albumins and biologically active molecules – *Exogenous organic compounds, which have biological activity, whether beneficial (drugs) or not (poisons, toxins) are generally distributed through the body in the bloodstream. In a large number of cases their aqueous solubility is limited and, therefore, their interaction with carrier proteins present in blood plasma is essential. Among these carrier proteins, serum albumins stand out. Studies on the interaction between serum albumins and biologically active molecules have been increasing, but, unfortunately, Portugal and Brazil are not among the most scientifically producing countries on this subject. Therefore, the present review article aims to introduce the main experimental and computational techniques used to study the binding ability of serum albumins, which may draw the attention of the Portuguese and Brazilian research groups to this subject. A brief description of the main biological activities of some natural products is also presented.*

Os compostos orgânicos e/ou complexos inorgânicos exógenos que possuem atividade biológica, seja esta benéfica (fármacos) ou não (venenos, toxinas) são, geralmente, distribuídos pelo organismo através da circulação sanguínea. Como muitos destes compostos têm uma solubilidade reduzida em fase aquosa, a sua interação com proteínas transportadoras existentes no plasma sanguíneo é fundamental. Entre estas proteínas, destacam-se as albuminas do soro sanguíneo, também designadas por albuminas séricas. Os estudos de interação entre as albuminas séricas e moléculas biologicamente ativas têm vindo a aumentar, contudo, infelizmente, Portugal e Brasil ainda não estão entre os países que mais produzem artigos científicos sobre este assunto. Este artigo de revisão tem como objetivo apresentar as principais técnicas experimentais e computacionais para este tipo de estudos, na expectativa de atrair o interesse de grupos de investigação destes dois países. Apresenta-se também uma breve descrição das principais atividades biológicas dos compostos naturais citados neste trabalho.

1. Introdução

As albuminas pertencem à classe das proteínas globulares e desempenham um importante papel biológico, estando presentes na clara do ovo, no leite e no sangue. A albumina sérica (AS) é a principal proteína no sangue dos mamíferos e é uma das proteínas mais estudadas. Encontra-se em grande abundância no plasma e é sintetizada no fígado. A concentração normal de AS no sangue animal é de aproximadamente 0,6 mM [1]. Muitos investigadores têm estudado a estrutura e as propriedades das AS, tal como as suas interações com outras proteínas e ligandos com o intuito de compreender as suas funções no organismo.

As AS presentes no sistema circulatório têm diversas funções fisiológicas, incluindo a manutenção da pressão osmótica, o transporte, distribuição e metabolismo (facilita a disponibilidade de substratos para as rotas metabólicas) de diversos ligandos endógenos e exógenos (por exemplo, fármacos, metabolitos, ácidos gordos, aminoácidos, hormonas, esteroides, catiões e aniões), resultando no aumento de solubilidade destes compostos no plasma, o que pode diminuir a sua toxicidade, e/ou protegê-los contra a oxidação ou outro tipo de reação [2,3].

O estudo da ligação entre fármacos e as AS é um fator determinante para a compreensão da interação do organismo com o fármaco (estudo farmacocinético), já que influencia a sua distribuição, excreção, metabolismo e interação com o alvo biológico [4].

Experimentalmente, a albumina sérica humana (ASH) é geralmente substituída pela albumina sérica bovina (ASB) devido à sua maior disponibilidade e menor custo comercial. Como a ASH partilha de 76% de identidade e 88% de similaridade de sequência com a ASB, os resultados obtidos com a variante bovina são, geralmente, muito semelhantes aos que seriam obtidos com a humana [5]. As cadeias polipeptídicas da ASB e ASH consistem em três domínios estruturalmente semelhantes (I, II, e III) e cada um deles contém dois subdomínios, A e B [6]. Nestes subdomínios há uma cavidade de ligação principal e, no total, cada molécula de proteína é constituída por seis cavidades [7].

A ASH é um polipeptídio não-glicosilado com 585 resíduos de aminoácidos, contendo 17 ligações de dissulfureto (que ajudam a manter a estrutura terciária), uma cisteína livre, um resíduo de triptofano (Trp-214) localizado no subdomínio IIA e aproximadamente 67% de estrutura secundária na forma de hélice- α [8,9]. Na ASH, os domínios I, II e III contêm os resíduos de aminoácidos 1–195, 196–383, 384–585, respetivamente [10]. Em contrapartida, a ASB é um polipeptídio não-glicosilado com 582 resíduos de aminoácidos, contendo 17 ligações de dissulfureto, uma cisteína livre, dois resíduos de triptofano (Trp-134 e Trp-212), sendo o primeiro e o segundo localizados no subdomínio IB e IIA, respetivamente, e 68% de estrutura secundária na forma de hélice- α [11]. Na ASB, os domínios I, II e III contêm os resíduos de aminoácidos 1–179, 180–384 e 385–582, respetivamente (Figura 1) [10].

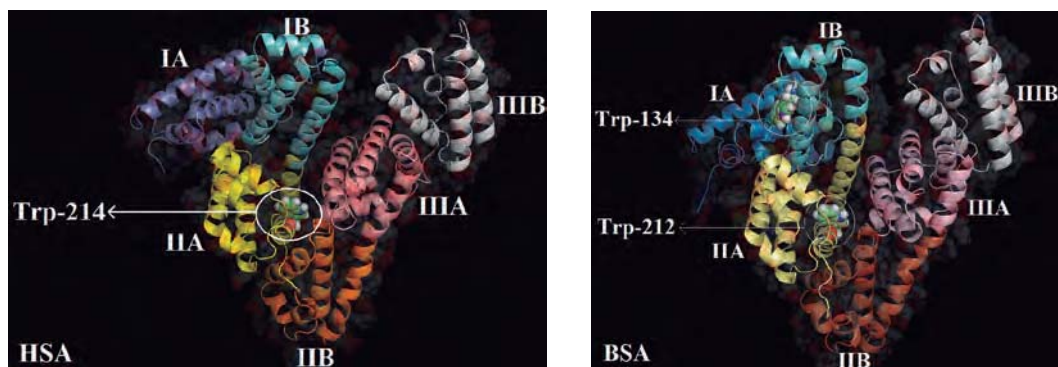


Figura 1 — Da esquerda para direita, estrutura cristalográfica da ASH (código *pdb*: 1N5U) e da ASB (código *pdb*: 3V03) com a distinção de seus subdomínios. Na ASH o Trp-214 está localizado no subdomínio IIA (amarelo), já na ASB o triptofano Trp-134 está localizado no subdomínio IB (azul claro) e o Trp-212 no subdomínio IIA (amarelo). O resíduo de aminoácido Trp está representado na forma de esfera verde. Figura reproduzida da referência [10].

O estudo da interação entre as AS e moléculas biologicamente ativas fornece dados que podem permitir o desenvolvimento de estratégias terapêuticas envolvendo possíveis fármacos e a compreensão da biodistribuição no plasma sanguíneo. O presente artigo apresenta uma breve descrição da importância biológica e farmacêutica dos compostos naturais bem como algumas das técnicas usadas nestes estudos.

2. Compostos biologicamente ativos usados nos estudos de interação com as albuminas séricas

Durante as últimas décadas foram realizados diversos estudos sobre a interação entre as AS e diferentes tipos e classes de moléculas orgânicas e/ou complexos inorgânicos. Estes compostos devem apresentar potencial atividade e/ou aplicação em sistemas biológicos para justificar tais estudos. Os ligandos das AS podem ser metabolitos secundários de plantas, derivados de produtos naturais e/ou simplesmente moléculas obtidas exclusivamente por via sintética. Este trabalho apresenta, como exemplo, a utilização de metabolitos secundários de plantas e explica as principais técnicas usadas. Na seção seguinte descrevem-se as principais aplicações farmacêuticas das moléculas orgânicas usadas e as respetivas origens.

Para o tratamento de certos tipos de cancro por terapia fotodinâmica usa-se preferencialmente moléculas que apresentam bandas de absorção na região do infravermelho próximo (600–900 nm) devido à maior penetração deste tipo de radiação no tecido [12–13]. Neste contexto, as feofitinas são consideradas como bons fotossensibilizadores. A feofitina-18 (18-FP, Figura 2) é um metabolito secundário que pode ser isolado das folhas da *Talinum triangulare*, uma planta predominantemente existente em regiões tropicais e subtropicais da África e da América, sendo popularmente conhecida no Brasil como João Gomes, língua de vaca, caruru do Pará e cariru [14]. A 18-FP apresenta bandas de absorção a 400 nm (banda de Soret), a 550 nm e a 700 nm sendo, portanto, um possível candidato para estudos de viabilidade para terapia fotodinâmica [15].

A *Croton cajucara* Benth. (*Euphorbiaceae*), popularmente conhecida como "sacaca", é uma árvore da região amazônica, norte do Brasil, utilizada na medi-

na popular. A casca do caule da planta tem sido usada para o tratamento de doenças do fígado, estômago, rins, distúrbios e diminuição dos níveis de colesterol no fluido sanguíneo [16]. A *cajucara* é rica em diterpenos do tipo clerodânico, sendo a *trans*-desidrocrotonina (*trans*-DCTN, Figura 2) o principal componente da casca do caule da "sacaca" [17]. Este composto é um dos clerodânicos bioativos mais relatados na literatura e tornou-se um alvo importante para a pesquisa pré-clínica. Na verdade, os estudos farmacológicos empregando *trans*-DCTN confirmaram alguns dos seus efeitos, tais como: anti-inflamatório, analgésico [18], antitumoral [19] e antiúlcera [20].

Plantas de vários gêneros da família *Ochnaceae*, e em particular do género *Ouratea*, são ricas em flavonoides e biflavonoides. Os biflavonoides são encontrados como flavonas, dímeros de calcona e, raramente, como bis-isoflavonas, e podem ser utilizados como marcadores quimiotaxonômicos de género [21,22]. Além dos flavonoides e biflavonoides, outros metabolitos têm sido isolados deste género, tais como triterpenos, diterpenos, esteroides e triacilglicerídeos [23]. Alguns flavonoides prenilados, como a glicopiranosil tri-hidroxi-flavona (PF, Figura 2), bem como extratos de espécies *Ouratea* apresentam atividades biológicas importantes, nomeadamente citotóxica, antitumoral, antiviral, vasodilatador, antimicrobiana e inibidor de ADN topoisomerase [22,24]. Em contrapartida, a lofirona B (LF-B, Figura 2) é um flavonoide que contém uma porção de calcona e pode ser encontrada nas raízes da *Luxemburgia nobilis* (da família *Ochnaceae*) [25]. Estudos biológicos revelaram que a LF-B previne os danos oxidativos induzidos pela AFB1 em hepatócitos de ratos [26], tem atividade anticancerígena, antimutagénica e antioxidante [27].

No Brasil existem aproximadamente 400 espécies da família *Apocynaceae*, entre as quais a *Aspidosperma cylindrocarpon*. Esta espécie apresenta um elevado teor de alcaloides indólicos [28,29]. Devido à atividade biológica que alguns alcaloides indólicos apresentam [30,31], a *Aspidosperma cylindrocarpon* tem sido estudada na área da fitoquímica e farmacologia [29]. O alcaloide plumerânico PIA (Figura 2) é um alcaloide indólico com atividade antimalárica obtido da casca da *Aspidosperma cylindrocarpon* [32].

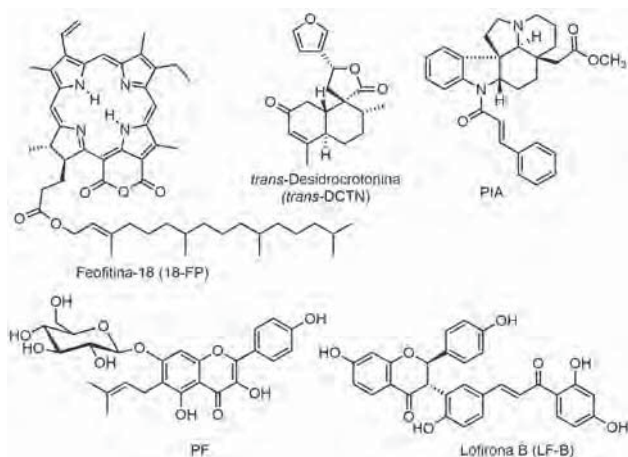


Figura 2 — Estruturas químicas e a simbologia usada na representação dos compostos biologicamente ativos citados neste trabalho.

3. Estudo da interação entre as albuminas séricas e compostos bioativos selecionados

As técnicas mais convencionais utilizadas para detectar a interação entre um composto bioativo e as albuminas são a espectroscopia de absorção molecular no UV-visível, espectroscopia de fluorescência no estado estacionário, espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo, espectroscopia de fluorescência 3D, espectroscopia de fluorescência sincronizada, espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, calorimetria de varrimento diferencial e métodos teóricos via modelação molecular, dinâmica molecular e cálculos semiempíricos [33–38]. Cada técnica possui a sua peculiaridade e diferente capacidade analítica de detecção. Tipicamente, nos estudos sobre a interação entre as AS e os ligandos utilizam-se técnicas convencionais, como a espectroscopia de fluorescência no estado estacionário, para observar determinado fenómeno e em seguida esse fenómeno é analisado por outro método espectroscópico mais sensível para confirmação, como a espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo, por exemplo.

3.1 Espectroscopia de absorção molecular no UV-Visível

A espectroscopia de absorção molecular no UV-Visível é utilizada para avaliar se existe associação entre a albumina e as moléculas biologicamente ativas, através da observação da variação da intensidade do máximo de absorção (a 280 nm, referente à transição $\pi-\pi^*$) e de desvios no máximo de absorção dos resíduos de aminoácidos aromáticos na estrutura proteica: fenilalanina (Phe, $\epsilon_{280\text{nm}} = 200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), tirosina (Tyr, $\epsilon_{280\text{nm}} = 1400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e triptofano (Trp, $\epsilon_{280\text{nm}} = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [39]. Note-se que o resíduo de histidina (His), mesmo sendo aromático e tendo valor de absorvidade molar $\epsilon_{220\text{nm}} = 4800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, não contribui para a absorção a 280 nm pois a His absorve entre 200–235 nm [40]. Como exemplo, na Figura 3 apresentam-se os espectros de absorção da ASB na ausência e na presença de PF. Após a adição de PF é observado um efeito hipercrômico e um desvio hipsocrômico do máximo de absorção da ASB, indicando uma associação entre esta proteína e o PF [36].

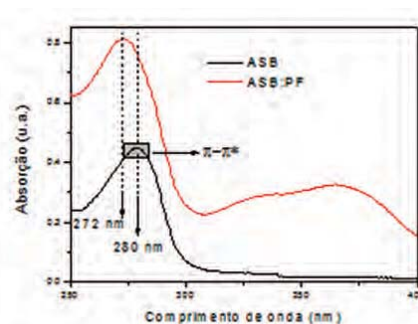


Figura 3 — Espectros de absorção molecular no UV-Visível da ASB livre e do complexo ASB:PF a pH = 7,4. [ASB] = $1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ e [PF] = $3,09 \times 10^{-5} \text{ M}$. Figura adaptada da referência [36].

3.2 Espectroscopia de fluorescência no estado estacionário

A espectroscopia de fluorescência no estado estacionário é um dos métodos mais utilizados para estudar interações envolvendo proteínas. A intensidade máxima de fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano presentes na ASB (Trp-134 e Trp-212) ocorre aos 345 nm, enquanto que na ASH (Trp-214) ocorre aos 340 nm. A supressão de fluorescência destes resíduos de triptofano pode revelar a acessibilidade do supressor (neste caso, os compostos biologicamente ativos) à albumina e, deste modo, ajudar a compreender o mecanismo de ligação e a natureza da associação [15,35,41,42]. Geralmente utilizam-se equações de Stern–Volmer, Stern–Volmer modificado, duplo logaritmo, raio de Förster, van't Hoff e energia livre de Gibbs para prever o mecanismo e o tipo de interação dos compostos bioativos com as AS [36,41,42].

Quanto ao mecanismo, a supressão de fluorescência pode ser induzida por interação dipolo-dipolo a partir de uma certa distância entre o fluoróforo e o supressor, não sendo necessário contacto direto entre eles (transferência de energia do tipo Förster, em inglês *Förster's resonance energy transfer* – FRET) [43]. A supressão da fluorescência também pode ocorrer por troca de eletrões entre o fluoróforo e o supressor (mecanismo de Dexter) e, neste caso, o contacto direto entre ambos é indispensável.

Para que ocorra supressão de fluorescência por FRET é necessário que haja sobreposição espectral entre a fluorescência do estado excitado do doador (fluoróforo) e a absorção do estado fundamental do aceitador (supressor), conforme representado na Figura 4 que mostra dados experimentais relativos à interação entre a ASB e o composto PIA [44].

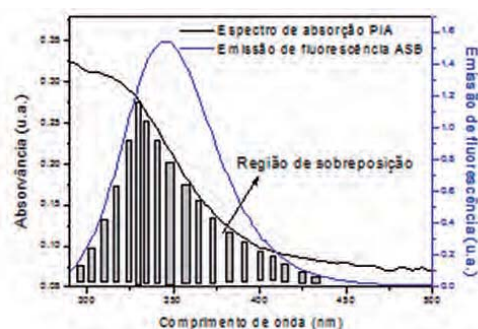


Figura 4 — Espectro de emissão de fluorescência da ASB livre e espectro de absorção no UV-Visível do composto PIA, a pH = 7,4 e a 310 K. [ASB] = [PIA] = $1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$. Figura adaptada da referência [44].

Para averiguar se a supressão de fluorescência do doador (AS) pelo aceitador (molécula biologicamente ativa) via FRET poderá ocorrer com elevada probabilidade, além da análise de sobreposição espectral descrita acima, a distância entre o doador e o aceitador (r), a partir do valor da integral de sobreposição entre os espectros (J), e a distância crítica (R_0) entre eles, deve estar enquadrado na regra $0,5R_0 < r < 1,5R_0$, desde que a eficiência da transferência de energia seja maior ou igual que 50% [44–46].

Alterações da intensidade de emissão de fluorescência intrínseca com o aumento das concentrações de supressores podem ser analisadas aplicando a equação de Stern–Volmer, que permite determinar a constante de supressão K_{sv} e a constante de velocidade de supressão k_q [7,15]. Se os valores de K_{sv} diminuírem com o aumento da temperatura e os valores de k_q forem maiores que o valor da constante de velocidade de difusão ($k_{diff} \approx 5,00 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em água a 298 K) [47], o mecanismo de supressão de fluorescência mais provável é o estático [15], via formação de uma associação no estado fundamental entre o fluoróforo e o supressor. Para confirmar esta hipótese podem ser realizadas experiências de fluorescência resolvida no tempo.

A constante de associação entre moléculas biologicamente ativas e macromoléculas, como as proteínas, é útil para compreender a distribuição das moléculas no plasma sanguíneo [37]. Uma associação muito fraca entre as AS e os ligandos pode dificultar a distribuição de moléculas dentro do corpo. Ao contrário, uma forte ligação entre as AS e os ligandos diminui as concentrações de moléculas biologicamente ativas livres disponíveis no plasma [48]. Se há a possibilidade de mais de um local de ligação acessível ao supressor dentro de AS, pode-se calcular a constante de associação K_b e o número de locais de ligação (n), pela equação de duplo logaritmo [36].

Caso haja apenas uma cavidade principal onde ocorre a interação entre a AS e o ligando (havendo porém fluoróforos noutros locais não acessíveis para o ligando em estudo), pode-se calcular a constante de associação de Stern–Volmer modificada (K_a) para analisar se a interação resulta numa associação forte, moderada ou fraca [49]. Valores de K_a e K_b na ordem de 10^3 M^{-1} geralmente indicam uma associação proteína–ligando fraca [35,42], enquanto que valores na ordem de 10^4 – 10^5 M^{-1} indicam uma associação moderada [15,36] e valores acima de 10^5 M^{-1} correspondem a uma associação forte [37].

A estrutura tridimensional das AS inclui diferentes locais de ligação, com diferentes especificidades (domínios I, II e III). As moléculas biologicamente ativas ligam-se preferencialmente aos subdomínios IIA, IB e IIIA. Na ASB e na ASH o local de ligação I, também chamado de local de ligação da varfarina (para a ASH também é chamado de local de ligação Sudlow I), é onde está localizado o resíduo de aminoácido Trp-212 e Trp-214, respetivamente. O local de ligação II, chamado de local de ligação indol/benzodiazepínico (para a ASH também é chamado de local de ligação Sudlow II) está localizado no subdomínio IIIA. Por último, o local de ligação III é onde está localizado o resíduo de aminoácido Trp-134 da ASB [15,37,50,51]. Para identificar qual o local

de ligação onde a molécula biologicamente ativa estará preferencialmente associada à proteína pode-se fazer estudos de competição na presença dos seguintes marcadores: varfarina ou fenilbutazona (para o local de ligação I); ibuprofeno ou ácido flufenâmico (para o local de ligação II) [50]; e digitoxina ou camptotecina (para o local de ligação III) [51] (Figura 5).

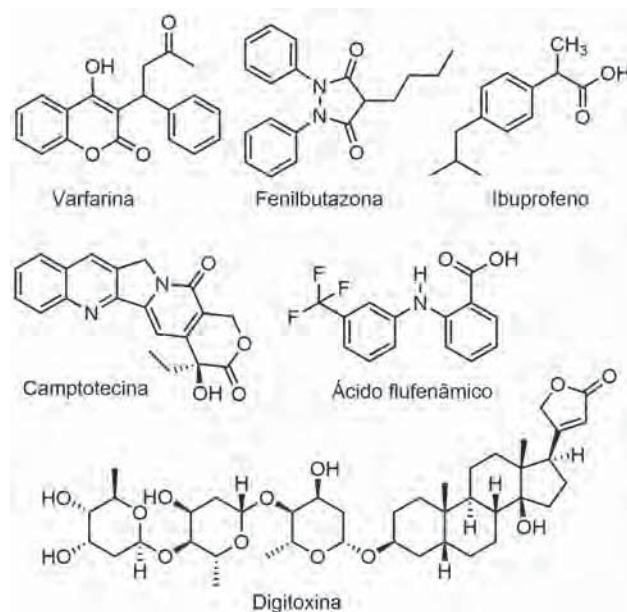


Figura 5 — Estruturas químicas dos principais marcadores utilizados nos estudos de competição com as AS.

Os parâmetros termodinâmicos que caracterizam a interação proteína–ligando (variação de entalpia, ΔH° e variação de entropia, ΔS°) podem ser calculados a partir da equação de van't Hoff [36] e relacionados com os tipos de forças intermoleculares da interação (van der Waals, eletrostáticas, ligação de hidrogénio e efeitos hidrofóbicos) [42,52,53]. Um valor positivo de ΔS° sugere que a interação ocorre principalmente devido a fatores hidrofóbicos, que estão relacionados com a reorganização das moléculas de água de hidratação. Há dois fatores que contribuem para o aumento da entropia do sistema aquando da ligação: dessolvatação da molécula biologicamente ativa, que liberta as suas moléculas de hidratação, e a libertação das moléculas de água da cavidade de ligação proteica [15].

3.3 Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo

Experiências de fluorescência resolvida no tempo são úteis para confirmar o principal mecanismo envolvido no processo de supressão de fluorescência. Um mecanismo estático não apresentará nenhuma mudança significativa no tempo de vida do fluoróforo após adição de diferentes concentrações de supressor (Figura 6A). Por outro lado, um mecanismo dinâmico de supressão de fluorescência tem como característica fundamental uma constante de velocidade de supressão dependente da viscosidade do meio e, por isso, o tempo de vida do fluoróforo sofrerá alterações significativas com o aumento da concentração do supressor (Figura 6B) [39,54].

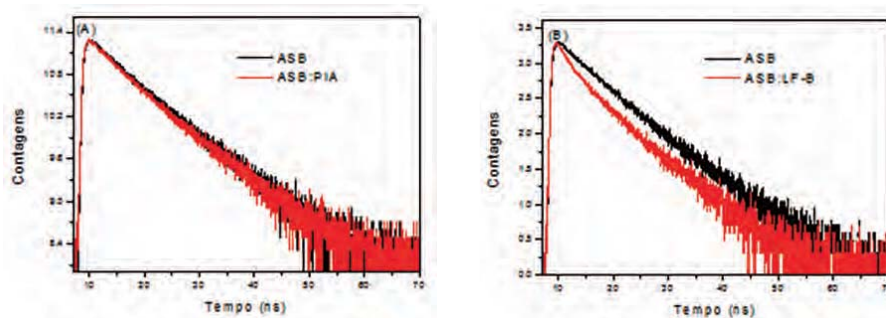


Figura 6 — Decaimentos de fluorescência resolvida no tempo para a ASB livre e para as associações ASB:PIA (A) e ASB:LF-B (B) a pH = 7,4 e 296 K. [ASB] = $1,00 \times 10^{-5}$ M, [PIA] = $2,22 \times 10^{-6}$ M e [LF-B] = $8,66 \times 10^{-6}$ M. Figura 6A adaptada da referência [44].

3.4 Espectroscopia de dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (DC) é uma técnica muito utilizada para estudos qualitativos e quantitativos de alterações conformacionais em macromoléculas, permitindo analisar perturbações na estrutura secundária das AS com a adição de moléculas biologicamente ativas [9,54]. Os espectros de DC-UV longínquo das AS são devidos a transições eletrônicas que ocorrem na ligação peptídica, apresentando uma banda intensa e positiva a 190 nm e uma banda negativa a 208 nm que são resultantes de transições $\pi \rightarrow \pi^*$, e uma banda negativa localizada a 222 nm que surge devido a uma transição $n \rightarrow \pi^*$. Estas bandas são características de proteínas com estrutura secundária majoritariamente em hélice- α [44,55]. Como exemplo, a Figura 7 apresenta alterações qualitativas no espectro de DC da ASB após a adição de *trans*-DCTN [42].

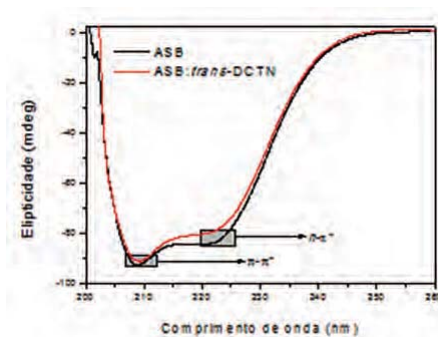


Figura 7 — Espectros de DC da ASB livre e da ASB associada com *trans*-DCTN, a pH = 7,4 e 310 K. [ASB] = $1,00 \times 10^{-6}$ M e [*trans*-DCTN] = $2,40 \times 10^{-5}$ M. Figura adaptada da referência [42].

Para obter dados quantitativos relativos às alterações da estrutura secundária das AS após a adição de moléculas biologicamente ativas, são usados *softwares* específicos (CONTIN, SELCON e CDSSTR, por exemplo) que calculam a percentagem de estrutura secundária com base no espectro DC-UV [37,56]. No entanto, na maioria dos artigos, mesmo nos mais recentes, a variação da percentagem de estrutura secundária é calculada através da elipicidade média por resíduo (*MRE*) a 222 nm e a 208 nm [44,55,57,58].

3.5 Métodos teóricos

Métodos teóricos baseados em simulações de acoplamento molecular (em inglês *Molecular Docking*) são mui-

to utilizados para investigar quais os possíveis locais de ligação de compostos biologicamente ativos a AS. Além disso, permitem identificar os principais resíduos da cadeia peptídica e os tipos de interações intermoleculares envolvidos na associação proteína-ligando, de forma a complementar os resultados espectroscópicos. Existem diversos programas computacionais, de acesso livre, ou pagos, para a construção da estrutura dos ligandos e para o estudo de acoplamento molecular. Como exemplo, a estrutura dos ligandos pode ser construída a partir do programa Spartan'14 (*Wavefunction, Inc*). As suas conformações podem ser otimizadas por minimização da energia potencial com o método semiempírico PM6 ou, preferencialmente, com a Teoria do Funcional de Densidade (DFT), utilizando o funcional Becke-3-Lee Yang Parr (B3LYP) com o conjunto de base padrão 6-31G*. Para o estudo de acoplamento molecular entre as AS e os ligandos, pode-se utilizar o programa GOLD 5.2 (*Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC Software Ltd.*), que se baseia num algoritmo genético para o acoplamento de ligandos flexíveis nos locais de ligação da AS. Os átomos de hidrogénio são adicionados à proteína de acordo com os estados tautoméricos e de ionização inferidos pelo programa em cada corrida; geralmente o número de operações genéticas (cruzamento, migração e mutação) adotado é de 100.000 [15,35,36]. A escolha da melhor função a ser utilizada pelo programa GOLD 5.2: *ChemPLP*, *GoldScore*, *ChemScore* ou *ASP*, é feita a partir do estudo de *redocking*, com ligandos cristalografados com as AS que tenham características estruturais semelhantes às dos ligandos a serem estudados. A pontuação de cada “pose” (conformação) identificada pelo GOLD 5.2 é calculada como o negativo da soma de uma série de termos de potencial envolvidos no processo de interação proteína-ligando, de modo que quanto mais positiva a pontuação, melhor é a interação [42,44].

Para a realização dos estudos de acoplamento molecular utilizam-se estruturas da ASB ou ASH provenientes do Banco de Dados de Proteínas (PDB). Neste banco de dados, até fevereiro de 2017, existiam cerca de 150 estruturas cristalográficas de albuminas séricas, com diferentes níveis de resolução. Destas, 93 estruturas são de ASH (organismo *Homo sapiens*) e 4 estruturas de ASB (organismo *Bos taurus*). Pode-se adotar diferentes raios de cálculo para cada cavidade proteica estudada por acoplamento molecular. Contudo, quando o principal sítio de ligação está localizado na mesma região do resíduo de triptofano, geralmente o melhor raio de cálculo a ser adotado é de 10 Å a partir

do fluoróforo Trp-214 da ASH e dos fluoróforos Trp-134 e Trp-212 da ASB [15,54–55].

Na Figura 8 apresenta-se, como exemplo, a conformação associada ao modo de acoplamento com maior pontuação (*ChemPLP*) para o complexo ASH:18-FP, obtida pelo programa GOLD 5.2. Neste caso, o estudo de acoplamento molecular sugere que a feofitina, mesmo sendo uma molécula bastante volumosa, é acomodada na cavidade onde se encontra o resíduo Trp-214, apresentando um perfil de interações favoráveis com os resíduos da cavidade. Dentro da cavidade, a 18-FP interage via ligação de hidrogénio com quatro resíduos de aminoácidos – um de arginina e três de lisina. Os resíduos Lys-198 e Lys-194 participam em ligações de hidrogénio com os dois oxigénios do grupo éster, sendo as distâncias entre os átomos do dador e aceitador de 3,26 Å e 3,06 Å, respetivamente. O grupo anidrido estabelece ligações de hidrogénio com os resíduos Arg-221 e Lys-443 com uma distância de 3,26 Å e 2,57 Å, respetivamente. Os resultados de acoplamento molecular mostram também que o grupo fitilo, um grupo não polar, está acomodado dentro de uma porção essencialmente hidrofóbica da ASH, interagindo com os resíduos Leu-197, Phe-205, Ala-209, Trp-214, Leu-346 e Val-481 [15].

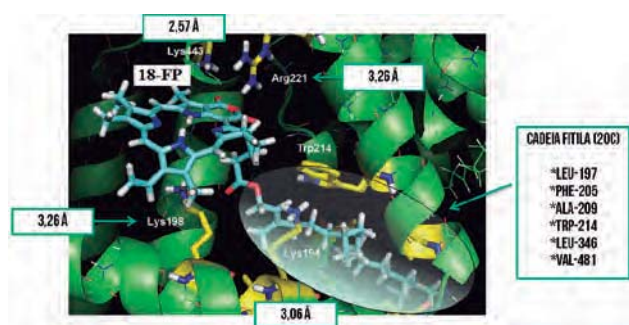


Figura 8 — Modo de interação entre a 18-FP e ASH referente à conformação de maior pontuação (*ChemPLP*) obtida usando o programa GOLD 5.2. Carbono: azul claro (18-FP), verde (ASH), amarelo (resíduos de aminoácidos selecionados); hidrogénio: branco; oxigénio: vermelho; nitrogénio: azul escuro. Figura adaptada da referência [15].

Os cálculos semiempíricos, são mais refinados do que os estudos de acoplamento molecular e por isso são utilizados para obter valores teóricos de variação de entalpia de interação (ΔH°_{int}) da associação proteína–ligando. Desta forma pode-se comparar o valor de entalpia obtido experimentalmente com o cálculo semiempírico e essa comparação pode sugerir qual a principal cavidade de interação dos ligandos na proteína [35]. O melhor resultado de acoplamento molecular determina a esfera de recorte em redor do ligando (geralmente, o valor de recorte é entre os 5 e os 10 Å) usando o programa DeepView-Swiss-PdbViewer 4.1 (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausana, Suíça). As estruturas das AS, ligando e complexo AS/ligando são subsequentemente otimizadas com o método semiempírico de orbital molecular PM7, disponível no programa MO-PAC2012™ (*Molecular Orbital PACKage, Stewart Computational Chemistry*, Colorado, EUA). No caso da cavidade da ASB onde se localiza o resíduo de aminoácido Trp-134, e tratando-se de uma cavidade exposta ao solvente, o meio é descrito por um modelo contínuo caracterizado por uma constante dielétrica de 78,4 (água). Para a cavidade

da ASB e da ASH, onde se localizam os resíduos de aminoácidos Trp-212 e Trp-214, respetivamente, utiliza-se $\epsilon = 4,0$ porque o ligando estará numa região mais interna da albumina. Contudo, para esta mesma cavidade pode-se utilizar o valor de $\epsilon = 30,0$ quando o ligando está próximo da superfície proteica [35–36]. Após a otimização dos átomos de hidrogénio de cada estrutura, a última otimização é feita fornecendo mobilidade somente para a cadeia lateral do recorte proteico e para todos os átomos do ligando. O valor teórico da variação de entalpia de interação (ΔH°_{int}) é obtido a partir da subtração entre a entalpia do complexo AS/ligando ($H_{AS/ligando}$) pelo somatório da entalpia da cavidade proteica ($H_{cavidade}$) e do ligando ($H_{ligando}$) [35,59], conforme representado pela Equação 1:



$$\Delta H^{\circ}_{int} = H_{AS/ligando} - (H_{AS/cavidade} + H_{ligando}) \quad (1)$$

Note-se que os métodos computacionais são aplicados com o intuito de complementar os resultados experimentais (espectroscópicos), fornecendo uma visão atômica da interação AS/ligando. Portanto, tipicamente utilizam-se primeiro as técnicas espectroscópicas (as principais foram apresentadas nas secções anteriores) e posteriormente são efetuados cálculos computacionais [15,35–37,42,59].

4. Conclusão

O estudo da interação entre as AS e potenciais fármacos é um passo importante para a compreensão da resposta do organismo a esses fármacos (estudo farmacocinético). A associação dos fármacos com as AS pode influenciar a sua distribuição e interação com o alvo biológico, o seu metabolismo e excreção. Entre as principais técnicas utilizadas para tais estudos destacam-se as espectroscópicas (absorção no UV-Visível, fluorescência no estado estacionário, fluorescência resolvida no tempo e dicroísmo circular) complementadas com métodos teóricos via acoplamento molecular e cálculos semiempíricos. Cada técnica fornece informações específicas que caracterizam a interação AS/ligando e, em conjunto, contribuem significativamente para as pesquisas desenvolvidas nas áreas da Química Medicinal e da Farmacologia.

Agradecimentos

Aos Professores Dr. Aurélio Baird Buarque Ferreira, Dr. Darí Cesarin-Sobrinho, Dr. Carlos Maurício Rabello de Sant’Anna e Dr. José Carlos Netto-Ferreira pela confiança ao permitirem a minha inserção, desde 2010, nos Grupos de Pesquisa em Fotoquímica e Modelagem Molecular da UFRRJ. Um agradecimento especial também ao Dr. Carlos Serpa, da Universidade de Coimbra, que durante dois anos (2011–2013) contribuiu de forma inexplicável para o meu amadurecimento científico.

Referências

- [1] K.A. Majorek, P.J. Porebski, A. Dayal, M.D. Zimmerman, K. Jablonska, A.J. Stewart, M. Chruszcz, W. Minor, *Mol. Immunol.* **52** (2012) 174–182.
- [2] F.L. Cui, L.X. Qin, G.S. Zhang, X.J. Yao, J. Du, *Int. J. Biol. Macromol.* **42** (2008) 221–228.

- [3] A.K. Shaw, S.K. Pal, *J. Photochem. Photobiol B: Biol.* **90** (2008) 69–77.
- [4] D. Li, B. Ji, H. Sun, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol.* **73** (2009) 35–40.
- [5] S. Curry, *X-ray crystallography of albumin*, in M. Otagiri (ed.), “Human Serum Albumin - New Insights on its Structural Dynamics, Functional Impacts and Pharmaceutical Applications”, Sojo Univ. Pub., Kumamoto, 2011.
- [6] B.K. Paul, A. Samanta, N. Guchhait, *J. Phys. Chem. B.* **114** (2010) 6183–6196.
- [7] J. Tian, X. Liu, Y. Zhao, S. Zhao, *J. Lumin.* **22** (2007) 446–552.
- [8] A.A. Bhattacharya, S. Curry, N.P. Franks, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 38731–38738.
- [9] D. Stan, I. Matei, C. Mihailescu, M. Savin, M. Matache, M. Hillebrand, I. Baci, *Molecules* **14** (2009) 1614–1626.
- [10] A. Bujacz, *Acta Cryst.* **D68** (2012) 1278–1289.
- [11] A. Satheshkumar, K.P. Elango, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **130** (2014) 337–343.
- [12] S. Luo, E. Zhang, Y. Su, T. Cheng, C.A. Shi, *Biomaterials* **32** (2011) 7127–7138.
- [13] S. Ben Dror, I. Bronshtein, Y. Garini, W.G. O’Neal, P.A. Jacobi, B. Ehrenberg, *J. Photochem. Photobiol. Sci.* **8** (2009) 354–361.
- [14] A.P.O. Amorim, A.R. Carvalho-Jr, R.N. Castro, N.P. Lopes, M.C.C. Oliveira, M.G. Carvalho, *Food Chem.* **160** (2014) 204–208.
- [15] O.A. Chaves, A.P.O. Amorim, L.H.E. Castro, C.M.R. Sant’Anna, M.C.C. de Oliveira, D. Cesarin-Sobrinho, J.C. Netto-Ferreira, A.B.B. Ferreira, *Molecules* **20** (2015) 19526–19539.
- [16] L.C. Di Stasi, C.A. Hiruma, E.M. Guimaraes, C.M. Santos, *Fitoterapia* **65** (1994) 529–540.
- [17] M.A.M. Maciel, A.C. Pinto, A.C. Arruda, S.G.S.R. Pamplona, F.A. Vanderlinde, A.J. Lapa, A. Echevarria, N.F. Grynberg, I.M.S. Cólus, R.A.F. Farias, A.M.L. Costa, V.S.N. Rao, *J. Ethnopharmacol.* **70** (2000) 41–55.
- [18] J.C.T. Carvalho, M.F.C. Silva, M.A.M. Maciel, A. Da Cunha Pinto, D.S. Nunes, R.M. Lima, J.K. Bastos, S.J. Sarti, *Planta Med.* **62** (1996) 402–404.
- [19] N.F. Grynberg, A. Echevarria, J.E. Lima, S.S.R. Pamplona, A.C. Pinto, M.A.M. Maciel, *Planta Med.* **65** (1999) 687–689.
- [20] J.A. Rodriguez, C.A. Hiruma-Lima, A.R.M. Souza Brito, *Hum. Exp. Toxicol.* **23** (2004) 455–461.
- [21] J.F.S. Daniel, M.G. de Carvalho, R.S. Cardoso, M.F. Agra, M.N. Eberlin, *J. Braz. Chem. Soc.* **16** (2005) 634–638.
- [22] Q.C. Fidelis, T.A.N. Ribeiro, M.F. Araújo, M.G. de Carvalho, *Rev. Bras. Farmacogn.* **24** (2014) 1–19.
- [23] M.G. de Carvalho, L.R. Suzart, L.C. Cavattia, M.A.C. Kaplan, *J. Braz. Chem. Soc.* **19** (2008) 1423–1428.
- [24] J.F.S. Daniel, C.C.F. Alves, I. Grivicich, A.B. Rocha, M.G. de Carvalho, *Indian J. Pharmacol.* **39** (2007) 184–186.
- [25] M.C.C. de Oliveira, M.G. de Carvalho, N.F. Grynberg, P.S. Brioso, *Planta Med.* **71** (2005) 561–563.
- [26] T.O. Ajiboye, M.T. Yakubu, A.T. Oladiji, *Pharm. Biol.* **54** (2016) 1962–1970.
- [27] T.O. Ajiboye, M.T. Yakubu, A.T. Oladiji, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **28** (2014) 558–567.
- [28] H.A. Guimarães, R. Braz-Filho, I.J.C. Vieira, *Molecules* **17** (2012) 3025–3043.
- [29] M.M. Pereira, R.L.R.P. Jácome, A.F.C. Alcântara, R.B. Alves, D.S. Raslan, *Quim. Nova* **30** (2007) 970–983.
- [30] L. Almagro, F. Fernández-Pérez, M.A. Pedreño, *Molecules* **20** (2015) 2973–3000.
- [31] L. Angenot, M. Dubois, C. Ginion, W. van Dorsser, A. Dresse, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **215** (1975) 246–258.
- [32] H.A. Guimarães, I.J.C. Vieira, R. Braz-Filho, A.E.M. Crotti, V.S. Almeida, R.C. de Paula, *Helv. Chim. Acta* **96** (2013) 1793–1800.
- [33] X. Guo, X. Han, J. Tong, C. Guo, W. Yang, J. Zhu, B. Fu, *J. Mol. Struct.* **966** (2010) 129–135.
- [34] Y.-J. Hu, Y. Wang, Y. Ou-Yang, J. Zhou, Y. Liu, *J. Lumin.* **130** (2010) 1394–1399.
- [35] O.A. Chaves, C.S.H. Jesus, P.F. Cruz, C.M.R. Sant’Anna, R.M.M. Brito, C. Serpa, *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **169** (2016) 175–181.
- [36] O.A. Chaves, D. Cesarin-Sobrinho, C.M.R. Sant’Anna, M.G. Carvalho, L.R. Suzart, F.E.A. Catunda-Junior, J.C. Netto-Ferreira, A.B.B. Ferreira, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **336** (2017) 32–41.
- [37] O.A. Chaves, C.S.H. Jesus, E.S. Henriques, R.M.M. Brito, C. Serpa, *Photochem. Photobiol. Sci.* **15** (2016) 1524–1535.
- [38] P. Alam, A.S. Abdelhameed, R.K. Rajpoot, R.H. Khan, *J. Photochem. Photobiol. A: Biol.* **157** (2016) 70–76.
- [39] J.R. Lakowicz, “Principles of Fluorescence Spectroscopy”, 3.^a ed., Springer: New York, 2006.
- [40] M.O. Iwunze, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **186** (2007) 283–289.
- [41] Y. Yue, Y. Zhang, Y. Li, J. Zhu, J. Qin, X. Chen, *J. Luminesc.* **128** (2008) 513–520.
- [42] O.A. Chaves, B.A. Soares, M.A.M. Maciel, C.M.R. Sant’Anna, J.C. Netto-Ferreira, D. Cesarin-Sobrinho, A.B.B. Ferreira, *J. Braz. Chem. Soc.* **27** (2016) 1858–1865.
- [43] I. Majoul, M. Straub, R. Dudenc, S.W. Hell, H.-D. Soling, *Rev. Mol. Biotechnol.* **82** (2002) 267–277.
- [44] O.A. Chaves, F.S.M. Teixeira, H.A. Guimarães, R. Braz-Filho, I.J.C. Vieira, C.M.R. Sant’Anna, J.C. Netto-Ferreira, D. Cesarin-Sobrinho, A.B.B. Ferreira, *J. Braz. Chem. Soc.* **28** (2017) 1229–1236.
- [45] X. Zhang, L. Li, Z. Xu, Z. Liang, J. Su, J. Huang, B. Li, *PLoS One* **8** (2013) e59106.
- [46] S.N. Khana, B. Islama, R. Yennamalli, A. Sultana, N. Subbarao, A.U. Khan, *Eur. J. Pharm. Sci.* **35** (2008) 371–382.
- [47] D. Brune, S. Kim, *Biophysics* **90** (1993) 3835–3839.
- [48] Y. Zhang, S. Shi, X. Sun, X. Xiong, M. Peng, *J. Inorg. Biochem.* **105** (2011) 1529–1537.
- [49] M.R. Eftink, C.A. Ghiron, *Analytical Bioanal. Chem.* **114** (1981) 199–227.
- [50] G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade, *Mol. Pharmaceutics* **12** (1976) 1052–1061.
- [51] Z.M. Wang, J.X. Ho, J.R. Ruble, J. Rose, F. Ruker, M. Ellenburg, R. Murphy, J. Click, E. Soistman, L. Wilkerson, D.C. Carter, *Biochim. Biophys. Acta* **1830** (2013) 5356–5374.
- [52] P.D. Ross, S. Subramanian, *Biochemistry* **20** (1981) 3096–3102.
- [53] X.X. Cheng, Y. Lui, B. Zhou, X.-H. Xiao, Y. Liu, *Spectrochim. Acta, A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **72** (2009) 922–928.
- [54] O.A. Chaves, C.H.C.S. Oliveira, R.C. Ferreira, J.L.R. Mellos, C.E. Rodrigues-Santos, A. Echevarria, D. Cesarin-Sobrinho, *J. Fluor. Chem.* **199** (2017) 103–112.

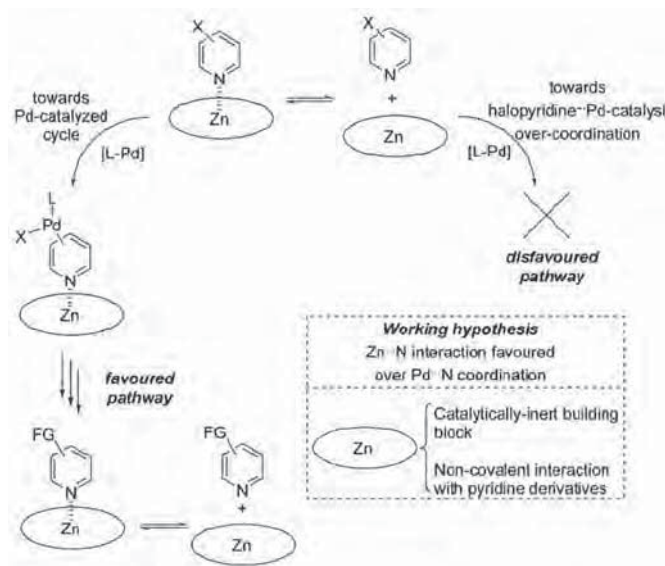
- [55] O.A. Chaves, V.A. Silva, C.M.R. Sant'Anna, A.B.B. Ferreira, T.A.N. Ribeiro, M.G. Carvalho, D. Cesarin-Sobrinho, J.C. Netto-Ferreira, *J. Mol. Struct.* **1128** (2017) 606–611.
- [56] N. Sreerama, R. W. Woody, *Anal. Biochem.* **287** (2000) 252–260.
- [57] J.-H. Shi, H.J. Chem, J. Wang, Y.-Y. Zhu, Q. Wang, *Spectrochim. Acta, A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **149** (2015) 630–641.
- [58] K.M. Naik, S.T. Nandibewoor, *J. Lumin.* **143** (2013) 484–491.
- [59] O.A. Chaves, R.P. Pereira, *SDRP J. Food Sci. Tech.* **2** (2017) 1–8.

ATUALIDADES CIENTÍFICAS

Interações Zn–N controlam a catálise

Devido à elevada importância da catálise por metais de transição na síntese orgânica, os métodos usados para controlar estes processos estão a tornar-se cada vez mais prementes. Nas situações em que o substrato ou produto inibem a atividade do catalisador, o controlo catalítico é particularmente importante. Esse é o caso dos compostos contendo átomos de N, uma classe importante de compostos importantes, nomeadamente na agroquímica, na farmacologia e na ciência dos materiais. Os substratos contendo piridina, por exemplo, possuem um par de eletrões não ligante capaz de interagir com o centro metálico e desativar o catalisador. Uma abordagem clássica para contornar este problema envolve a transformação destas moléculas em sais de piridínio ou *N*-óxidos de piridina antes de realizar o procedimento catalítico.

Rafael Gramage-Doria, da Universidade de Rennes, França, e colegas desenvolveram um método alternativo que passa por promover interações não covalentes entre derivados de piridina (halopiridinas) e complexos cataliticamente inertes de Zn(II) contendo ligandos porfirina e salphen. Este método foi testado em reações de acoplamento cruzado de Suzuki–Miyaura e Mizoroki–Heck. Verificou-se que as propriedades do catalisador de paládio permaneceram inalteradas e que a reatividade dos substratos de halopiridina nas reações de acoplamento cruzado estudadas correlaciona-se com a força da interação entre os complexos de zinco(II) e a halopiridina. Esta observação demonstra que as interações Zn···N entre as halopiridinas e os complexos de Zn previnem, assim, em certa medida, interações indesejáveis entre o substrato e o catalisador de paládio. A abordagem apresentada é operacionalmente simples e particularmente atrativa nos casos em que substratos e/ou produtos desativam (ou parcialmente envenenam) um catalisador de metal de transição. Evita-se, assim, o uso de métodos que implicam a pré-proteção de derivados de piridina ou aqueles que envolvem a alteração das características dos próprios catalisadores. Os autores sugerem a sua aplicabilidade a outros tipos de reações catalisadas por metais de transição, nomeadamente a funcionalização de ligações C_(Ar)–H.



Fontes:

Zn–N Interactions Control Catalysis, http://www.chemistryviews.org/details/ezone/10474918/ZnN_Interactions_Control_Catalysis.html?elq_mid=16128&elq_cid=3941189 (Acedido em 02/04/2017)

M. Kadri, J. Hou, V. Dorcet, T. Roisnel, L. Bechki, A. Miloudi, C. Bruneau, R. Gramage-Doria. **Palladium-catalysed cross-coupling reactions controlled by noncovalent Zn···N interactions.** *Chem. Eur. J.* **23** (2017) 5033–5043.

Paulo Mendes
(pjgm@uevora.pt)