



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG. CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 – Fax: (35) 3299-1063



Poliany Graziella Santos

**Estudo do Mecanismo de Interação de Mangiferina e
Mangiferitina com Soroalbumina**

Alfenas-MG

2010

Poliany Graziella Santos

**Estudo do Mecanismo de Interação de Mangiferina e
Mangiferitina com Soroalbumina**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva.

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos.

Alfenas-MG

2010

Poliany Graziella Santos

**Estudo do Mecanismo de Interação de Xantonas
Naturais com Soroalbumina**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Físico-Química.

Aprovada em: 30/07/2010

Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Assinatura:

Prof. Dr. Márcia Paranho Veloso

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

Assinatura:

Alfenas-MG

2010

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, a meu esposo, aos meus pais, aos meus irmãos e amigos pelo apoio na realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente a Deus, por ter me dado esta oportunidade;

Ao meu orientador Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva e co-Orientador Dr. Marcelo Henrique dos Santos, pelo apoio, orientação, incentivo e amizade durante a realização deste trabalho.

A UNIFAL-MG pela graduação e mestrado;

Em especial a minha família pelo estímulo e paciência;

Aos meus amigos da Pós-Graduação pela amizade;

Aos funcionários do laboratório de bioquímica;

Aos professores que contribuíram neste trabalho;

A Capes pela bolsa de fomento;

E a todos aqueles não citados, mas que acreditaram, verdadeiramente, na minha capacidade e àqueles que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho.

RESUMO

A interação entre mangiferina (MGF) e mangiferitina (MGT) com soroalbumina bovina (BSA) em solução aquosa foi investigada por espectrofotometria (constante de associação, efeito de pH e força iônica), fluorimetria (constante de estabilidade, mudança conformacional, distância de interação), voltametria cíclica (constante de estabilidade, cinética de transferência de carga, efeito de pH) e *docking* molecular. O modelo de interação de MGF-BSA e MGT-BSA apresentam características de cooperatividade e inespecificidade de sítios de ligação e uma classe de sítios de interação específica. A constante de associação interação foi calculada através dos métodos acima com K_a de $3,82 \times 10^4$ e $8,66 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$ para MGF-BSA e MGT-BSA, respectivamente. O efeito de pH e força iônica também foram avaliados por espectro-diferença e foi observado que as interações hidrofóbicas são predominantes, sendo confirmada por *docking* molecular. Os estudos de modelagem molecular mostram que a interação de ambos os ligantes com BSA esta localizada no subdomínio IIA. O espectro de fluorescência sincronizada revelou que ocorreu uma mudança conformacional na proteína quando ligada aos ligantes estudados. A voltametria cíclica de mangiferina exibiu um processo de reação irreversível na superfície do eletrodo de pasta de carbono controlado por difusão com potencial de oxidação de 0,289 V, $E^{0'}$ de 0,264 e 0,248 V para mangiferina livre e ligada a BSA, respectivamente. O efeito do pH também foi avaliado por voltametria e tanto a MGF livre quanto o complexo apresentaram uma menor energia para a oxidação da droga em pH elevado. Os complexos MGF-BSA e MGT-BSA apresentaram estequiometria 1:1. Os parâmetros cinéticos de transferência de carga não revelaram valores significativos de alteração entre MGF livre e ligada. A comparação entre a interação dos ligantes com BSA indicou que o glicosídeo influencia pouco no mecanismo de interação com BSA. Em suma, os resultados obtidos podem ser uteis para a compreensão da farmacocinética de mangiferina e o seu metabolito mangiferitina em sua interação com proteínas plasmáticas.

Palavra-chave: Mangiferina, mangiferitina, soroalbumina bovina, espectroscopia, voltametria, mecanismo de ação de drogas.

ABSTRACT

The binding of mangiferin (MGF), a natural xantone isolated from mangoes, and mangiferitin (MGT), a modified MGF analog without its glycoside group, were both studied with bovine serum albumin (BSA) through difference-spectra using spectrophotometry and spectrofluorimetry, as well cyclic voltammetry and molecular modelling, aiming to disclose binding and stability constants, pH and ionic strength effects, electrical charge transfer, conformational analysis, and interaction mechanisms. The binding model MGF-BSA and MGT-BSA exhibited a specific binding site with 1:1 stoichiometry and with apparent binding constant of 0.38 (MGF) and 0.87 mmol.L⁻¹ (MGT), together with cooperativity and site unspecificity. Salt and pH effects together with docking studies showed prevailing hydrophobic forces and secondarily electrostatic forces involved in the binding of both ligands to the IIA subdomain of BSA. Synchronous fluorescence spectra revealed conformational changes in the polypeptide backbone upon binding with MGF and MGT. Cyclic voltammetry experiments presented an irreversible nature for charge transfer of MGF controlled by diffusion on the electrode surface, with an oxidation peak at 0.289 V and E^{0'} of 0.264 and 0.248 V for free and bound MGF, respectively. Furthermore, it was found no difference between the parameters of kinetic charge transfer, lower oxidation energy for the complex in alkaline medium, and little effects for the additional glycoside group in MGF. The overall results can contribute to the understanding of pharmacokinetics effects of xantone-based drugs, naturally occurred or chemically modified, related to its binding mechanism with plasma proteins.

Keyword: mangiferin, mangiferitin, BSA, spectroscopy, voltammetry, mechanism of action of drugs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔA - Variação de absorbância

ΔE - Variação do coeficiente de absortividade molar

ΔF - variação de fluorescência

ΔF_{\max} - mudança máxima na intensidade de fluorescência

$\Delta \lambda$ - variação do comprimento de onda

A_b - Absorbância de ligante ligado

A_f - Absorbância de ligante livre

A_L - Absorbância de ligante

A_{LP} - Absorbância de ligante após a adição de albumina bovina

C_b - Concentração de ligante ligado

K_{SV} - constante de supressão de Stern-Volmer

K_s - velocidade de transferência de carga

r - distância de interação entre o doador e o receptor

Φ - rendimento quântico de fluorescência do doador

J - integral da área de sobreposição do espectro de emissão do doador e o espectro de absorção do receptor

N - índice de refração do meio

κ^2 - fator de orientação entre o dipolo de emissão do doador e o dipolo de absorção do receptor

R_0 - distância crítica onde a eficiência de transferência é 50%

K - constante de Stern-Volmer modificada

τ - tempo de meia vida da biomolécula

K_p - constante da taxa de supressão da proteína

f - fração de fluorescência inicial

F - Intensidade de fluorescência de BSA após a adição de ligante

F_0 - Intensidade de fluorescência de BSA

K_a - constante de associação

K_d - constante de dissociação

L_t - concentração de ligante total

n - número de sítios de ligação

n_e^- - número de elétrons

P_t - concentração total de BSA

E - energia do fóton

R - coeficiente de correlação

h - constante de Planck

ms - milisegundos

mV - milivolts

α - cooperatividade específica

β - cooperatividade não-específica

I_0 - intensidade da luz

b - espessura do passo óptico

c - concentração molar

ϵ - coeficiente de absorvidade molar de mangiferina

G - estado fundamental

λ - comprimento de onda

Q - rendimento quântico

V - volts

λ_{max} - comprimento de onda máximo

v – razão de ligante ligado por mol de proteína

v - velocidade de varredura

Do - coeficiente de difusão

A – área do eletrodo

Co - concentração da espécie em solução

HSA – soroalbumina humana

KDa – kilodaltons

mg – miligramas

MGF- Mangiferina

MGT-Mangiferitina

mL – mililitros

mM – milimolar

nm – nanômetros

PDB – banco de dados de proteína

pH – potencial hidrogeniônico

pK – potencial de dissociação

RMN - ressonância magnética nuclear

S1 – primeiro estado excitado

T – temperatura

Tab. – tabela

Tyr – Tirosina

Trp – Triptofano

UV – ultravioleta

VG – nível vibracional do estado fundamental

VS – nível vibracional do estado excitado

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura básica de xantonas..... | 5 |
| Figura 2. Estrutura química de mangiferina..... | 8 |
| Figura 3. Estrutura química de mangiferitina..... | 9 |
| Figura 4. Ilustração da ligação de moléculas do fármaco com albumina extravascular no plasma em um dado instante, e difusão através do endotélio em um pequeno vaso sanguíneo..... | 12 |
| Figura 5. Representação da albumina de soro humano (HSA)..... | 13 |
| Figura 6. Estrutura geral da α -hélice direita, estrutura comumente encontrada nas proteínas. Os pontilhados são ligações de hidrogênio entre o grupo NH (azul) e átomos de oxigênio..... | 16 |
| Figura 7. Esquema da estrutura secundária de HSA com subdomínios codificados por cores da seguinte forma: IA; IB; IIA; IIB; IIIA; IIIB..... | 16 |
| Figura 8. Esquema mostrando os sítios de vários ligantes de HSA..... | 18 |
| Figura 9. Diagrama típico diagrama de níveis de energia mostrando o estado fundamental e o primeiro estado excitado. Os níveis vibracionais são mostrados como linhas horizontais mais finas..... | 21 |
| Figura 10. Parte do espectro eletromagnético com destaque para os comprimentos de onda da luz visível..... | 22 |
| Figura 11. Diagrama de níveis de energia de um cromóforo. G e S1 indicam o estado fundamental e o primeiro estado excitado, respectivamente. Os estados vibracionais são representados pelas linhas finas horizontais. Esta molécula absorve luz pelas transições | |

indicadas no diagrama. Depois da excitação, há perdas vibracionais para o nível mais baixo do primeiro estado excitado e então é capaz de emitir luz por fluorescência a partir desse estado.....24

Figura 12. Espectros típicos de absorção (tracejado), excitação (pontilhado) e emissão (contínuo) de fluorescência (a), bem como espectros de excitação e emissão de fluorescência do triptofano (b).....25

Figura 13. Esquema mostrando a célula conectada a um sistema potenciostático.....29

Figura 14. Formas de aplicação do potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada.....33

Figura 15. Curva analítica de mangiferina e mangiferitina em tampão fosfato pH = 7,4. Equação de regressão linear $[y = a + bx]$. Parâmetros de regressão $a_{MGF} = 2,260 \pm 0,012 \times 10^4$, $b_{MGF} = -0,040 \pm 0,006$, $a_{MGT} = 1,9 \pm 0,016 \times 10^4$ e $b_{MGT} = -0,007 \pm 0,01$44

Figura 16. Curva analítica dos ligantes livre e ligados com BSA. (A) Coeficiente de absorvidade de MGF livre e MGF ligado, respectivamente, $\epsilon_{MGF} = 2,62 \pm 0,03 \times 10^4 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{MGF-BSA} = 2,30 \pm 0,95 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. (B) Coeficiente de absorvidade de MGT livre e MGT ligado, respectivamente, $\epsilon_{MGT} = 2,26 \pm 0,06 \times 10^4 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{MGT-BSA} = 1,89 \pm 0,05 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 45

Figura 17. Espectro de absorção eletrônica de mangiferina e mangiferitina na ausência e na presença de BSA em tampão fosfato pH = 7,4.....46

Figura 18. Espectro-diferença em diferentes tempos de incubação para a formação dos complexos em tampão fosfato pH = 7,4.....47

Figura 19. Espectro-diferença do efeito de pH na formação dos complexos.....48

Figura 20. Efeito da força iônica na formação dos complexos em tampão fosfato pH = 7,4.....49

- Figura 21.** Espectrofluorograma da interação de BSA com MGF. (a) BSA 2,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (b) – (o): 0,5-100,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ MGF em presença de BSA 2,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, (p) MGF 2,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ na ausência de BSA. $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 348 \text{ nm}$50
- Figura 22.** Espectrofluorograma da interação de BSA com MGT. (a) BSA 2,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (b) – (o): 3,0 - 10,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ MGT em presença de BSA 2,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, (p) MGT 2,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ na ausência de BSA. $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 349 \text{ nm}$51
- Figura 23.** Representação de Stern-Volmer a partir da eq. 10 para a interação de BSA com mangiferina e mangiferitina, respectivamente.....52
- Figura 24.** Curva de Stern-Volmer modificado para os complexos de MGF-BSA e MGT-BSA em tampão fosfato pH = 7,4. Parâmetros da regressão (eq.11) linear para mangiferina: inclinação $2,90 \pm 0,145 \times 10^{-5}$, intercepto $1,02 \pm 0,28$; mangiferitina: inclinação $3,26 \pm 0,22 \times 10^{-5}$, intercepto $2,22 \pm 0,35$53
- Figura 25.** Sobreposição do espectro de emissão de fluorescência de BSA 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (a) ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$) com o espectro de absorção de MGF 2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (b).....55
- Figura 26.** Sobreposição do espectro de emissão de fluorescência de BSA 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (a) ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$) com o espectro de absorção de MGT 3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (b).....56
- Figura 27.** Efeito de MGF no espectro sincronizado de BSA. (a) $C_{\text{BSA}} = 2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, (b) - (p): 0,5 - 100,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (A) resíduo tirosina (Tyr) e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (B) resíduo triptofano (Trp).....57
- Figura 28.** Efeito de MGT no espectro sincronizado de BSA. (a) $C_{\text{BSA}} = 2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, (b) - (o): 3,0 – 9,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (A) resíduo tirosina (Tyr) e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (B) resíduo triptofano (Trp).....58
- Figura 29.** Voltamograma cíclico de 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ mangiferina em eletrodo EPC. Velocidade de varredura 100 mV.s^{-1} , eletrólito tampão fosfato pH = 7,4.....59

| | |
|---|----|
| Figura 30. Voltamograma cíclico de mangiferina ($40 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em potencial de taxa de varredura. (a) - (n): $10 - 300 \text{ mV.s}^{-1}$ | 60 |
| Figura 31. Efeito da intensidade de corrente de pico pela variação da taxa de velocidade de varredura de MGF $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em eletrodo de pasta de carbono e tampão fosfato $\text{pH} = 7,4$ como eletrólito..... | 61 |
| Figura 32. Teste para processo controlado por difusão ou adsorção para mangiferina $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ | 62 |
| Figura 33. Dependência do potencial de pico E_p com a taxa de velocidade de varredura v : (●) MGF $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (○) MGF $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na presença de BSA $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $\text{pH} 7,4$ | 63 |
| Figura 34. Dependência do potencial de pico E_p com logaritmo da taxa de velocidade de varredura $\log v$: (●) MGF $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (○) MGF $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na presença de BSA $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $\text{pH} 7,4$. Parâmetros da regressão linear (eq. 16) MGF: inclinação $2,70 \pm 0,06 \times 10^{-2}$, intercepto $3,160 \pm 0,006 \times 10^{-1}$, $R^2 = 0,99$; MGF-BSA: inclinação $3,22 \pm 0,121 \times 10^{-2}$, intercepto $3,170 \pm 0,013 \times 10^{-1}$, $R^2 = 0,98$ | 64 |
| Figura 35. Efeito da variação de pH com MGF na ausência e na presença de BSA. (●) MGF $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (○) MGF $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na presença de BSA $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Potencial de taxa de velocidade de varredura 100 mV.s^{-1} , eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$ | 66 |
| Figura 36. Isoterma de interação MGF com BSA. Curva (○) resultados obtidos por voltametria, curva (●) resultados obtidos por espectrofotometria..... | 67 |
| Figura 37. Interação entre MGF com HSA em menor energia de Gibbs. Somente os resíduos do sítio ativo que participam das interações de vdws e ligações de hidrogênio são exibidos. Os resíduos de HSA são representados por modelo em vara de cor cinza, e a estrutura mangiferina é representada em verde. Os resíduos formando H-ligação com o mangiferina no complexo HSA foi estabelecido por uma linha tracejada amarela..... | 69 |

Figura 38. Interação entre MGF com BSA em menor energia de Gibbs. Somente os resíduos do sítio ativo que participam das interações de vdws e ligações de hidrogênio são exibidos. Os resíduos de BSA são representados por modelo em vara de cor cinza, e a estrutura mangiferina é representada em verde. Os resíduos formando H-ligação com o mangiferina no complexo BSA foi estabelecido por uma linha tracejada amarela.....69

Figura 39. Interação entre MGT com HSA em menor energia de Gibbs. Somente os resíduos do sítio ativo que participam das interações de vdws e ligações de hidrogênio são exibidos. Os resíduos de HSA são representados por modelo em vara de cor cinza, e a estrutura mangiferitina é representada em verde. Os resíduos formando H-ligação com o mangiferina no complexo HSA foi estabelecido por uma linha tracejada amarela.....71

Figura 40. Interação entre MGT com BSA em menor energia de Gibbs. Somente os resíduos do sítio ativo que participam das interações de vdws e ligações de hidrogênio são exibidos. Os resíduos de BSA são representados por modelo em vara de cor cinza, e a estrutura mangiferina é representada em verde. Os resíduos formando H-ligação com o mangiferina no complexo BSA foi estabelecido por uma linha tracejada amarela.....72

Figura 41. Isotherma da interação de soroalbumina com mangiferina e mangiferina, respectivamente. Regressão não linear eq. 8.74

Figura 42. Insaturação de MGF e MGT por inflexão dos dados.....75

Figura 43. Tratamento gráfico dos dados fluorimétricos a $\lambda_{exc} = 280$ nm.....76

Figura 44. Voltamograma cíclico: 5×10^{-4} mol.L⁻¹ MGF (a); 5×10^{-4} mol.L⁻¹ MGF + $1,87 \times 10^{-4}$ (b); 5×10^{-4} mol.L⁻¹ MGF + $3,53 \times 10^{-4}$ (c); 5×10^{-4} mol.L⁻¹ MGF + 5×10^{-4} (d); 5×10^{-4} mol.L⁻¹ MGF + $6,31 \times 10^{-4}$ (e); 5×10^{-4} mol.L⁻¹ MGF $7,5 \times 10^{-4}$ (f); solução tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,4 (g). Potencial de taxa de velocidade de varredura de 100 mV.s⁻¹77

Figura 45. Representação semilogaritma da interação de MGF com BSA obtido por voltametria cíclica.....78

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Usos medicinais da casca de <i>Mangifera indica</i> L. no mundo..... | 3 |
| Tabela 2. Atividades farmacológicas de mangiferina..... | 8 |
| Tabela 3. Matriz de identidade entre as seqüências de algumas albuminas (os valores indicam o número de resíduos conservados)..... | 19 |
| Tabela 4. Parâmetros da supressão de fluorescência a 298 K. Eq. 11..... | 53 |
| Tabela 5. Comparação dos parâmetros cinéticos de mangiferina na ausência e na presença de BSA. Equação 15 e 16..... | 65 |
| Tabela 6. Comparação de parâmetros de regressão com os diferentes modelos testados. Equação 8..... | 73 |
| Tabela 7. Parâmetros físico-químicos de interação. Equação 8..... | 74 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Plantas Medicinais..... | 1 |
| 1.2. <i>Mangifera Indica</i> Linn..... | 2 |
| 1.3. <i>Garcinia gardneriana</i> (Planchon & Triana) Zappi..... | 4 |
| 1.4. Xantonas..... | 5 |
| 1.5. Mangiferina (MGF)..... | 6 |
| 1.6. Magiferitina (MGT)..... | 8 |
| 1.7. Fármacos na circulação sanguínea..... | 9 |
| 1.8. Ligação às proteínas plasmáticas..... | 11 |
| 1.9. Funções e estrutura de albumina..... | 12 |
| 1.9.1. Estrutura primária de soroalbumina..... | 15 |
| 1.9.2. Estrutura especial de soroalbumina..... | 15 |
| 1.9.3. Estrutura terciária..... | 17 |
| 1.10. Sítios de ligação de soroalbumina..... | 18 |
| 1.11. Comparação entre soroalbumina humana e bovina..... | 19 |
| 1.12. Métodos para determinação de interação de ligante-proteína..... | 19 |
| 1.12.1. Espectroscopia de absorção..... | 20 |
| 1.12.1.1. Teoria de absorção de luz por molécula..... | 20 |
| 1.12.2. Fluorescência no estado estacionário..... | 23 |
| 1.12.2.1. Teoria da Fluorescência..... | 24 |
| 1.12.2.2. Medidas de fluorescência intrínseca para estudo de proteínas..... | 26 |
| 1.12.3. Voltametria..... | 28 |
| 1.12.3.1. Célula de três eletrodos..... | 29 |
| 1.12.3.2. Eletrodo de trabalho..... | 30 |
| 1.12.3.3. Voltametria Cíclica..... | 31 |
| 2. Justificativa | 33 |
| 3. Objetivos | 34 |
| 3.1. Objetivo Geral..... | 34 |
| 3.2. Objetivos Específicos..... | 34 |
| 4. Material e Método | 35 |
| 4.1. Materiais..... | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2. Equipamentos..... | 35 |
| 4.3. Métodos..... | 36 |
| 4.3.1. Espectrofotometria..... | 36 |
| 4.3.1.1. Dosagem de soroalbumina..... | 36 |
| 4.3.1.2. Determinação espectrofotométrica dos fármacos..... | 36 |
| 4.3.1.3. Ensaio de complexação dos fármacos com proteína..... | 36 |
| 4.3.1.4. Espectro-diferença da região UV..... | 37 |
| 4.3.1.5. Estudo da variação de pH dos complexos..... | 38 |
| 4.3.1.6. Estudo da variação de força iônica dos complexos..... | 38 |
| 4.3.1.7. Determinação de parâmetros de interação dos complexos..... | 39 |
| 4.3.2. Espectrofluorimetria..... | 39 |
| 4.3.2.1. Ensaio de complexação dos fármacos com proteína..... | 39 |
| 4.3.2.2. Determinação de parâmetros de interação dos complexos..... | 40 |
| 4.3.2.3. Investigação conformacional..... | 40 |
| 4.3.2.4. Determinação da energia de transferência de ressonância..... | 40 |
| 4.3.3. Voltametria Cíclica..... | 40 |
| 4.3.3.1. Elaboração e otimização de eletrodo de trabalho..... | 40 |
| 4.3.3.2. Determinação voltamétrica de mangiferina..... | 41 |
| 4.3.3.3. Ensaio de complexação de mangiferina com proteína..... | 41 |
| 4.3.3.4. Determinação dos parâmetros cinéticos de transf. de carga..... | 42 |
| 4.3.3.5. Estudo de variação de pH..... | 42 |
| 4.3.4. Modelagem molecular..... | 42 |
| 4.4. Análise de dados..... | 43 |
| 5. Resultados e Discussão..... | 43 |
| 5.1. Espectrofotometria..... | 43 |
| 5.1.1. Absorção espectrofotométrica..... | 43 |
| 5.1.2. Determinação do coeficiente de absorvidade molar..... | 44 |
| 5.1.3. Espectro-diferença dos complexos..... | 45 |
| 5.1.4. Teste de estabilidade dos complexos..... | 46 |
| 5.1.5. Efeito de pH e força iônica..... | 47 |
| 5.2. Espectrofluorimetria..... | 49 |
| 5.2.1. Análise de fluorescência..... | 49 |
| 5.2.2. Mecanismo de supressão da fluorescência de BSA..... | 51 |
| 5.2.3. Energia de transferência de ressonância..... | 54 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.4. Investigação conformacional..... | 56 |
| 5.3. Voltametria Cíclica..... | 58 |
| 5.3.1. Comportamento eletroquímico de mangiferina..... | 58 |
| 5.3.2. Efeito da velocidade de varredura..... | 59 |
| 5.3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de transferência de carga..... | 62 |
| 5.3.4. Efeito da variação de pH..... | 65 |
| 5.3.5. Comparação entre resultados metodológicos..... | 66 |
| 5.4. Modelagem molecular..... | 67 |
| 5.4.1. Mangiferina..... | 67 |
| 5.4.2. Mangiferitina..... | 70 |
| 5.5. Determinação dos parâmetros de complexação..... | 72 |
| 5.5.1. Modelo de formação dos complexos por espectrofotometria..... | 72 |
| 5.5.2. Espectrofluorescência..... | 76 |
| 5.5.3. Eletroquímica..... | 77 |
| 6. Conclusões..... | 79 |
| 7. Referências Bibliográficas..... | 80 |

1. Introdução

1.1. Plantas Medicinais

O uso de plantas medicinais é milenar e difundido por todo o mundo, seja no uso em rituais místicos/religiosos ou como medicamento. O emprego empírico de produtos naturais era e continua sendo, uma das formas usuais de se buscar cura e alívio para as doenças que acometem o homem.¹

Plantas e seus derivados são as maiores fontes de drogas, movimentando cerca de 30% do mercado farmacêutico mundial.² Entre os anos de 1981 e 2002, de 877 novas moléculas introduzidas no mercado, em torno de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semi-sintéticos ou moléculas sintetizadas tomando como modelo estruturas de origem natural.³ Em termos históricos, a pesquisa com plantas medicinais tomou impulso após o isolamento da morfina no século XIX. As plantas possibilitaram a descoberta de vários medicamentos, entre os quais podemos citar os alcalóides bisindólicos vimblastina e vincristina isolados de *Catharanthus roseus* G., a atropina, obtida a partir de *Atropa belladonna* e também a lactona sesquiterpênica artemisina isolada de *Artemisia Annuua L.*, utilizada como antimalárico. Apesar do enorme desenvolvimento da síntese química, atualmente 25% das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal.⁴

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial utilizam plantas medicinais, em sua maioria nos países em desenvolvimento.⁵ No Brasil, 20% da população são responsáveis por 63% do consumo de medicamentos alopáticos; os 80% restantes encontram nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos.⁶

Apesar do uso de plantas medicinais e seus derivados serem bastante difundido, muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. Em todo o mundo, apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos.⁶ O Brasil possui uma enorme biodiversidade, detendo aproximadamente um terço da flora mundial. Este fato aliado à escassez de estudos farmacológicos para a maioria das espécies vegetais demonstra o enorme potencial do estudo de plantas para a descoberta de novas moléculas terapêuticamente úteis.⁷

1.2. *Mangifera Indica* Linn

Mangifera indica L. (mangueira) é uma espécie pertencente à família Anacardiaceae, gênero *Mangifera*, que se disseminou por uma ampla região do globo terrestre, climaticamente favorável ao seu desenvolvimento.⁸ A mangueira é uma planta nativa do sul e do sudeste asiático, desde o leste da Índia até as Filipinas, e vem sendo cultivada há mais de quatro mil anos. Seu fruto, a manga, é o segundo fruto tropical mais importante cultivado no mundo.⁹ O cultivo da mangueira está presente em vários países do mundo, constituindo uma importante atividade econômica em muitos deles (Índia, China, Tailândia, México, Paquistão, Indonésia, Filipinas, Brasil e Nigéria).⁹

As mangueiras são grandes árvores, atingindo até 35-40 m de altura, com um raio de sua copa próximo de 10 m. Suas folhas são perenes, com 15-35 cm de comprimento e 6-16 cm de largura; quando jovens estas folhas são rosa-alaranjadas. As flores são diminutas, em inflorescências paniculadas nas extremidades dos ramos e com perfume agradável.¹⁰

A utilização das cascas de *M. indica* em diversos países e seus usos medicinais em todo mundo são relatados na Tab. 1. Com base nos conhecimentos etnofarmacológicos, uma solução aquosa padronizada do extrato da casca do caule de *M. indica* L. com propriedades antioxidante, anti-inflamatória e imunomodulatória foi desenvolvida recentemente em Cuba. Esse extrato foi proposto como suplemento nutricional (antioxidante) e no tratamento anti-inflamatório, analgésico e imunomodulatório para prevenir o progresso da doença ou aumentar a qualidade de vida de pacientes com distúrbios gástricos e dermatológicos, AIDS, câncer e asma.¹¹ Este extrato aquoso das cascas de *M. indica* resultaram em uma formulação farmacêutica com nome fantasia de Vimang[®]. O principal componente deste extrato é a xantona glicosilada mangiferina. Porém, além desta substância, o extrato contém também uma mistura de componentes terpenóides, esteróides, ácidos graxos e microelementos.¹² Encontra-se descrito na literatura que Vimang[®] apresenta atividades imunoestimulante,¹³ antiinflamatória,¹⁴ citotóxica e antineoplásica.¹⁵

Estudos realizados com o extrato aquoso das cascas de *M. indica* demonstraram que ele é um poderoso seqüestrador de radicais hidroxil e ácido hipocloroso, exercendo efeito inibitório sobre a peroxidação de fosfolipídios em cérebro de ratos e inibição de danos ao DNA. Além destes, apresenta propriedades de proteção contra a produção de espécies reativas de oxigênio, sendo mais ativo que as vitaminas C e E, mangiferina e β -caroteno. Vimang[®] mostrou proteção dos tecidos hepático e cerebral de camundongos contra o estresse oxidativo induzido.¹⁶

O extrato de *M. indica* também demonstrou efeito inibitório sobre a produção de radicais livres em macrófagos de ratos, mostrando-se interessante para o tratamento de doenças de origem imunopatológica, especificamente em certas desordens auto-imunes.¹⁷ Recentemente foi descrita a ação antiulcerogênica do extrato aquoso das flores de *M. indica*. Ele mostrou-se eficaz em inibir as lesões gástricas induzidas por etanol, etanol acidificado, estresse e piroxican. O extrato também reduziu a acidez total gástrica em ratos com piloro ligado e acelerou o processo de cicatrização num modelo subagudo de úlcera induzida por ácido acético. O efeito gastroprotetor deste extrato parece envolver a participação de grupos sulfidrilas não-proteicos endógenos.¹⁸ A contribuição da mangiferina no efeito gastroprotetor do extrato aquoso das flores de *M. indica* ainda não foi elucidado.

Tabela 1. Usos medicinais da casca de *Mangifera indica* L. no mundo.¹⁹

| País | Parte da casca ^(a) | Preparação ^(b) | Administração ^(c) | Uso medicinal | Referência(s) |
|-----------------|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|---|--|
| África Central | StB | S | ER | Diarréia | Ake Assi <i>et al.</i> 1978 |
| Republica Benin | StB | D* | O | Tosse | Ake Assi <i>et al.</i> 1978 |
| Brasil | StB | D | NR | Anemia, hipotensão Cocceira | Ajanohoun <i>et al.</i> 1986 Schemda and Rojas 1992 |
| Caribe | StB | I | NR | Diurético, reumatismo | Grenard <i>et al.</i> 2004 |
| Congo | B | D | NR | Câncer, gengivite, diarréia, disenteria | Boullard 2001 |
| Cuba | StB | W | NR | Câncer, diabetes, asma, infertilidade, lúpus, hiperplasia prostática, distúrbio gástrico, dor de dente, feridas na boca | Nuñez-Selles 2005 |
| Fiji | DB | I | O | Sífilis | Ross 1999 |
| Gabão | B | NR | NR | Emético | Boullard 2001 |
| Guiana | DB | NR | NR | Diarréia, distúrbios gástricos | Grenard <i>et al.</i> 1987 |
| Haiti | DB | I | O | Distúrbios hepáticos | Weniger <i>et al.</i> 1986 |
| Ilhas Canárias | DB | I | O | Diarréia | Ross 1999 |
| | DB | I | O | Leucorréia, sangramento de hemorróida, hemorragia pulmonar | Deka <i>et al.</i> 1983 |
| Índia | B | D | NR | Diabetes | Alam <i>et al.</i> 1983 |
| | B | I | NR | Adstringente | Maheshwari <i>et al.</i> 1975 |
| | B | I | NR | Tônico Menorragia | Chopa 1933 |

| | | | | | |
|--------------------------------|-----|-----|--------|---|---------------------------------------|
| | B | D | O ou I | Icterícia | Singh <i>et al.</i> 1994 |
| | StB | E | NR | Contraceptivo | Ross 1999 |
| | B | NR | NR | Melancolia | Chopa <i>et al.</i> 1956 |
| Madagascar | B | NR | NR | Obstrução do fígado | Pernet <i>et al.</i> 1997 |
| Mali | DB | NR | NR | Emético | Boullard 2001 |
| Nicarágua | IB | P/W | E | Ferimentos | Dennis 1988 |
| | DB | I | O | Feridas na boca, bochecho para dor de dente, desinteira, diarréia | Kerharo <i>et al.</i> 1974, Ross 1999 |
| Senegal | | | E | Afecção cutânea | Ross 1999 |
| Tonga | StB | DW | O | Dismenorréia | Adjanooun <i>et al.</i> 1986 |
| Tanzânia | StB | D | O | Dor de dente | Ross 1999 |
| | StB | I | O | Diarréia, dor no peito, tosse, anemia, diabetes, perfusão do trato urinário | Muanza <i>et al.</i> 1994 |
| Republica Democrática do Congo | | | E | Feridas infectadas | Muanza <i>et al.</i> 1994 |
| | | | O | Carie dental | Muanza <i>et al.</i> 1994 |

(a) StB = casca do caule, B = Casca, DB = casca seca, IB = casca interna

(b) S = embeber, D* = Decocção com sal e pimenta, D = Decocção, I = infusão, W = extrato aquoso, E = pó de vinho alcoólico, P/W = extrato água/fenol, Dw = decocção em vinho, NR = não relatado.

(c) ER = Enema, E = uso externo, O = oral, I = inalação, NR = não relatado.

1.3. *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi

A família Guttiferae (Clusiaceae) apresenta-se constituída de 900 espécies distribuídas em 20 gêneros e tem sido objeto de estudo desde a década de 60, principalmente pela ocorrência de xantonas, substâncias naturais que têm despertado um grande interesse dos pesquisadores de saúde, estimulados pelas comprovações de variadas atividades farmacológicas.²⁰

A *Garcinia gardneriana* pertence à família Clusiaceae, pode ser encontrada sob a sinonímia botânica de *Rheedia gardneriana*, da família Guttiferae, e é conhecida popularmente como “bacupari”, “bacopari”, “bacupary miúdo” ou “mangostão amarelo”. É uma árvore de porte médio, copa piramidal, folhas opostas, pecioladas, que floresce nos meses de agosto a setembro. Possui um fruto amarelo com polpa mucilagínosa, branca, comestível.²¹ A espécie *Rheedia gardneriana* é nativa da região Amazônica e cultivada em todo o território brasileiro. A madeira é usada em construção civil, marcenaria e carpintaria. A

casca exsuda resina amarela que serve para curtume e tem aplicações medicinais.²⁰ Na medicina popular é indicada para o tratamento de inflamações, dores, infecções urinárias e outros tipos de infecções.

A *G. gardneriana*, com sua constituição rica em metabólitos farmacologicamente ativos, ampla distribuição e fácil cultivo; características somadas às atividades anti-inflamatórias mostram-se como promissora fonte para o desenvolvimento de alternativas aos anti-inflamatórios em uso atualmente.²²

Estudos fitoquímicos com a *G. gardneriana* têm demonstrado que o gênero *Rheedia* ou *Garcinia*, é rico em compostos fenólicos, nomeadamente as benzofenonas, xantonas e flavonóides.^{23, 24} Dos frutos de *Rheedia brasiliensis* separados em pericarpo e semente foram isoladas as benzofenonas e xantonas naturais.

1.4. Xantonas

Xantonas são compostos polifenólicos naturais presentes em plantas superiores, fungos e líquens.²⁵ Elas são metabólitos secundários derivados da dibenzo- γ -pirona. Seu nome é proveniente do grego *xanthos* que significa amarelo, decorrente de sua coloração característica.²⁶ Podem ser classificadas em cinco grandes grupos: (a) xantonas simples oxigenadas, (b) xantonas glicosiladas, (c) xantonas preniladas e seus derivados, (d) xantonolignoides, e (e) xantonas variadas.²⁷

As xantonas são formadas pela combinação das vias do chiquimato e do acetato e possuem a mesma estrutura básica (Fig. 1). Neste esqueleto básico das xantonas podemos observar os carbonos numerados de 1-4, derivados do anel acetato A, e os carbonos 5-8 derivados do chiquimato. Hoje em dia as xantonas e seus derivados são isolados das plantas ou sintetizados quimicamente.²⁶

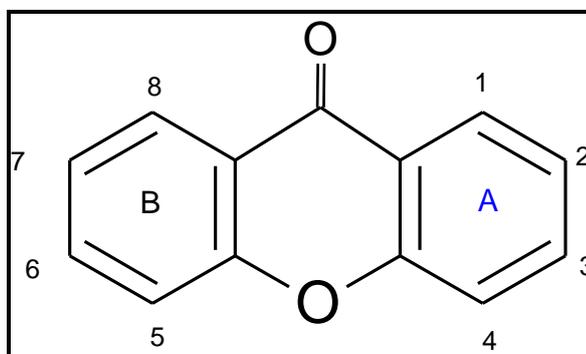


Figura 1. Estrutura básica das xantonas.²⁶

As xantonas são quimicamente diferentes dos flavonóides, porém são muito similares em suas reações de coloração e em sua mobilidade cromatográfica. Sua presença pode ser detectada por cromatografia em camada delgada por sua coloração sob luz UV. Para seu isolamento são utilizadas frequentemente técnicas cromatográficas. Diversas técnicas espectroscópicas podem ser utilizadas para determinação estrutural das xantonas. Os espectros obtidos na região do infravermelho, assim como aqueles de RMN-H e RMN-C apresentam sinais característicos para essas substâncias.²⁶

De 2000 a 2004 foram identificadas 278 novas xantonas naturais oriundas de 20 famílias de plantas superiores (122 espécies e 44 gêneros), de 19 espécies de fungos e de 3 espécies de líquens.²⁵ No total foram descritas em torno de 1.000 diferentes xantonas com substituintes em diferentes posições, o que promove uma grande variedade de atividades biológicas e farmacológicas a esses compostos.^{27, 28} O estudo de xantonas é interessante não só pela investigação quimiosistemática, mas também devido à sua importância farmacológica. Um número substancial de estudos demonstra que as xantonas e seus derivados apresentam diversas atividades farmacológicas tais como anti-inflamatória, anti-hepatotóxica, antialérgica, anticonvulsivante, anti-diabética, gastroprotetora, entre outras.^{27, 29, 30} Diversos trabalhos têm apresentado as xantonas como potenciais substâncias para o tratamento de diversos tipos de câncer, como o de pulmão, fígado e estômago.^{31, 32, 33, 34, 35, 36, 37} Algumas xantonas (naturais e sintéticas) apresentaram, ainda, ação antimicrobiana, inclusive contra *Mycobacterium tuberculosis*³⁸ e ação antifúngica³⁹.

Xantonas também são excelentes antioxidantes, atuando através da eliminação de radicais livres, inibindo a peroxidação lipídica e quelando metais.⁴⁰ Os antioxidantes naturais, como as xantonas, protegem o corpo humano dos radicais livres e retardam a progressão de muitas doenças crônicas, além de desempenhar papel importante na patogênese de várias doenças degenerativas.⁴¹ Neste sentido, o uso das xantonas naturais como agentes antioxidantes em patologias que envolvem estresse oxidativo, como a úlcera gástrica, tem se mostrado promissor.

1.5. Mangiferina (MGF)

Mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxixantona-C2-beta-D-glicose; $C_9H_{18}O_{11}$; massa molecular 422,35 $gmol^{-1}$; Fig. 2) é uma glicosilxantona presente em várias plantas, incluindo *Mangifera indica* L.⁴² onde esta presente em varias partes como folhas,⁴³ frutos,⁴⁴ casca do

caule,⁴⁵ cerne,⁴⁶ e raízes⁴⁷. Esta substância polifenólica foi primeiramente isolada de manga, em 1956, por Shun Iseda utilizando reagentes colorimétricos específicos e espectroscopia na região do infravermelho para identificação química.⁴⁸ Passados dez anos, Haynes e Taylor⁴⁹ confirmaram sua estrutura por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Axel Prox⁵⁰ obteve o espectro de massas de mangiferina, em um estudo de caracterização espectrométrica de compostos naturais C-glicosilados.

A mangiferina é um sólido amarelo com ponto de fusão maior que 260 °C que absorve fortemente a luz ultravioleta, apresentando atividade óptica devido à presença do resíduo de glicose.⁵¹ A partir do estudo espectral UV-vis e RMN por Gómez-Zaleta et al determinou-se que a mangiferina possui quatro constantes de dissociação ($pK_{a1} = 6,52$; $pK_{a2} = 7,97$; $pK_{a3} = 9,44$ e $pK_{a4} = 12,10$).⁵² Em razão da ligação heterosídica ocorrer através de uma ligação carbono-carbono, sua estrutura mostra-se mais resistente à hidrólise ácida, alcalina e enzimática do que a dos O-heterosídeos.⁵³ Por meio de difração de raio-X, Cruz et al. descobriram que a estrutura cristalina de mangiferina é constituída por duas moléculas da xantona ligadas a cinco de água de cristalização, sendo estabilizada pela formação de ligações de hidrogênio intermoleculares.⁵⁴ Em razão de C-glicosilxantonas serem encontradas em associação com C-glicosilflavonas,⁵⁵ foi proposto, e posteriormente comprovado biossinteticamente, que mangiferina é formada a partir de um precursor flavônico. Assim, mangiferina é produzida pelo acoplamento de *p*-hidroxi-cinamato com duas moléculas de malonato, resultando na benzofenona iriflofenona, a qual é oxidada na posição C-3' e posteriormente glicosilada no carbono C-3. Por fim, a xantona é gerada pelo acoplamento oxidativo dos carbonos C-4 e C-6'.⁵⁶ Aparentemente o ácido benzóico não está envolvido na rota biossintética da mangiferina, diferentemente do que é observado para as demais xantonas. Dessa forma a rota biossintética da mangiferina assemelha-se mais à descrita para as flavonas do que para as outras xantonas.⁵⁷

Sinteticamente, mangiferina foi obtida pela primeira vez por meio de uma reação de glicosilação da 1,3,6,7 tetrahidroxixantona (noratiriol) com acetobromoglicose, utilizando-se iodeto de sódio, realizada por Nott e Roberts (1967).⁵⁸ No entanto, a primeira síntese total somente foi desenvolvida um ano depois por Bhatia e Seshadri (1968), os quais promoveram a reação de condensação do ácido 2,5-dihidroxi-4-metoxibenzóico com floroglucinol anidro, seguida por desmetilação, gerando a xantona noratiriol.⁵⁹ O passo seguinte, reação de glicosilação, foi semelhante à proposta original.

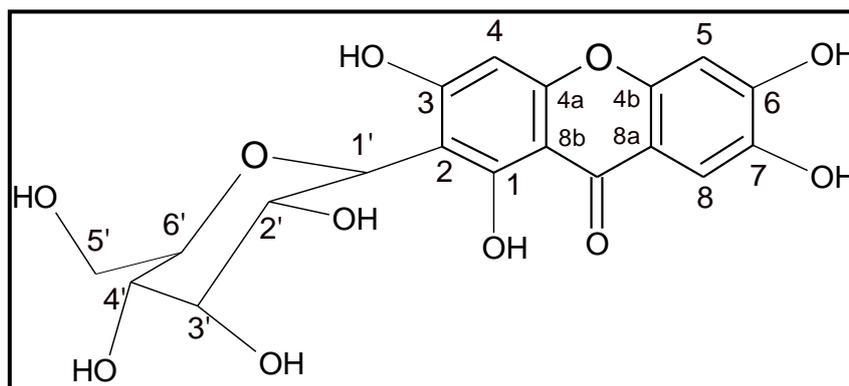


Figura 2. Estrutura química de mangiferina.⁶⁰

A mangiferina é um composto farmacologicamente ativo ocorre entre diferentes famílias de angiospérmias,^{61, 62} é amplamente distribuído nas famílias Anacardiaceae e Gentianaceae especialmente nas folhas e casca.⁶³

Diversas atividades farmacológicas da mangiferina têm sido descritas na literatura resumida na Tab. 2.

Tabela 2. Atividades farmacológicas de mangiferina.¹⁹

| Atividade Farmacológica | Referência (s) |
|---|---|
| Antioxidante | Sanchez <i>et al.</i> 2000; Muruganandan <i>et al.</i> 2002; Leiro <i>et al.</i> 2003; Stoilova <i>et al.</i> 2005 |
| Radioprotetor | Jagetia and Baliga 2005; Jagetia and Venkatesha 2005 |
| Imunomodulatório | Chattopadhyay <i>et al.</i> 1987; Guha <i>et al.</i> 1996; Moreira <i>et al.</i> 2001; Garcia <i>et al.</i> 2002, 2003; Leiro <i>et al.</i> 2003, 2004a, 2004b; Sarkar <i>et al.</i> 2004 |
| Antialérgico | Rivera <i>et al.</i> 2006 |
| Ant-inflamatório e anti-nociceptiva | Beltran <i>et al.</i> 2004; Garrido <i>et al.</i> 2004 |
| Antitumoral | Guha <i>et al.</i> 1996; Yoshimi <i>et al.</i> 2001 |
| Antidiabético | Ichiki <i>et al.</i> 1998; Miura <i>et al.</i> 2001a, 2001b, 2001; Muruganandan <i>et al.</i> 2005 |
| Atividade inibitória sobre enzimas do metabolismo de carboidratos | Yoshikawa <i>et al.</i> 2001 |
| Atividade lipolítica | Yoshikawa <i>et al.</i> 2002 |
| Reabsorção óssea | Li <i>et al.</i> 1998 |
| Antiviral | Zheng <i>et al.</i> 1990, 1993; Guha <i>et al.</i> 1996 |
| Antibacteriana | Srinivasan 1982; Stoilova <i>et al.</i> 2005 |
| Antifúngico | Stoilova <i>et al.</i> 2005 |
| Antiparasítico | Perrucci <i>et al.</i> 2006 |
| Atividade inibidora de monoaminaoxidase | Bhattacharya <i>et al.</i> 1972 |

1.6. Magiferitina (MGT)

Magiferitina ou noratiriol (1,3,6,7-tetrahidroxixantona; $C_{13}H_8O_6$; massa molecular 260,2 $gmol^{-1}$; Fig. 3) é uma xantona presente no pericarpo de *Rheedia gardneriana* e folhas de

Senecio mikanioides. Esta substância polifenólica apresenta vários efeitos farmacológicos,⁶⁴ incluindo anti-inflamatório,^{64, 65} vasorelaxante,⁶⁶ e antiplaquetário⁶⁷.

Em trabalhos prévios mangiferitina foi isolada a partir de mangiferina, por incubação com bactéria intestinal e reação com ácido hidriódico,⁶⁸ respectivamente. A mangiferitina foi detectada como o principal metabólito de transformação de mangiferina, depois de submetido à bactéria intestinal denominada de *Bacteroides* sp. MANG, envolvendo a eliminação de uma cadeia de C-glicosilados, no entanto esta bactéria não está presente na flora intestinal normal, mas foi encontrada em condições patológicas.⁶⁴ Além da flora intestinal a conversão para aglicona de mangiferina pode ser realizada após a absorção pelas células capazes de metabolizar mangiferina.⁶⁹ Recentes investigações extensivas sobre as atividades biológicas sugerem que as agliconas são geralmente mais ativas do que os glicosídeos. Mangiferina se demonstrou ser menos ativas do que noratiriol na inibição de PPAR e, no que dizem respeito a transportadores multifármacos, muitos compostos fenólicos têm sido mostrados para interagir melhor com os derivados de glicosídeos quando estão na forma aglicona, ao invés da forma glicosídica.

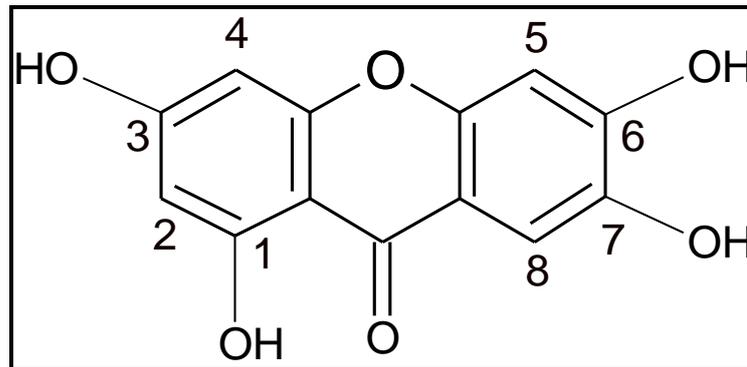


Figura 3. Estrutura química de mangiferitina.

1.7. Fármacos na circulação sanguínea

Um fármaco na circulação sanguínea pode estar livre ou ligado a proteínas e apenas a forma livre ter o efeito farmacológico desejado, ou ainda somente a forma livre poder ser metabolizada. Por isso, tanto o efeito do fármaco quanto o tempo de duração desse efeito no organismo dependem da força da ligação do fármaco às proteínas do sangue. O monitoramento clínico de drogas presentes em amostras complexas, como as matrizes biológicas (plasma, soro, urina, sêmen, saliva, fluido cérebro-espinhal, bile etc), é necessário na determinação dos parâmetros farmacocinéticos.⁷⁰ Esses, por sua vez, são importantes para se avaliar as diferenças inter-individuais em relação à absorção, distribuição, metabolismo e

eliminação de fármacos, especialmente daqueles com baixo índice terapêutico. Nesses casos, as concentrações plasmáticas devem ser monitoradas dentro do intervalo terapêutico, de forma a evitar o surgimento de toxicidade.⁷¹ No entanto, as análises de fármacos presentes em matrizes biológicas são dificultadas pelas baixas concentrações frequentemente encontradas; e.g., fármacos altamente hidrofílicos apresentam difícil extração em amostras aquosas alcalinas; eles podem apresentar instabilidade frente a solventes orgânicos ou variações de pH e ainda, ligar-se às proteínas plasmáticas.⁷² Após administração do medicamento por via intravascular, ocorrem os processos de absorção e distribuição do fármaco. No sangue, o fármaco se encontra em duas formas, constituindo duas frações sob equilíbrio dinâmico: uma livre, dissolvida no plasma, e outra ligada às proteínas plasmáticas, especialmente à albumina.⁷³ É a fração livre ou não ligada do fármaco, ao invés de sua concentração total, que está correlacionada ao efeito clínico.⁷⁴ As propriedades farmacocinéticas das drogas podem ser modificadas pelo grau de ligação às proteínas plasmáticas, em função da afinidade de ambos (fármaco e proteínas), da concentração sanguínea do fármaco e do tipo de proteínas presentes no fluido em questão.⁷⁵ As alterações farmacocinéticas decorrem da distribuição seletiva da droga apenas na forma livre por mecanismo de difusão ou transporte através das células de parede de membranas de vasos sanguíneos, que finalmente atingem os sítios ativos, *p.e.* receptores, enzimas e DNA.⁷⁶ A ligação do fármaco às proteínas plasmáticas é um processo saturável e não linear.⁷⁷ Nos estados patológicos, como na cirrose hepática, síndrome nefrótica e infarto do miocárdio observam-se uma diminuição nas concentrações de albumina (hipoalbuminemia), podendo acarretar no aumento dos níveis da fração livre do fármaco. Em oposição, em queimaduras, câncer e alguns processos crônicos onde há elevação dos níveis de α -1-ácido glicoproteínas, pode haver a diminuição da fração livre do fármaco, com conseqüente elevação da resposta farmacológica frente às drogas.⁷⁸

Sendo assim, a determinação das concentrações livres das drogas pode ser necessária quando são administrados fármacos altamente ligados às proteínas plasmáticas (mais de 75%) acarretando em diferença terapêutica significativa.⁷⁹ Informações precisas em relação ao percentual de fração livre do fármaco são essenciais para o desenvolvimento e determinação da segurança clínica dos fármacos⁸⁰ relativamente à ação farmacológica, distribuição e eliminação.

1.8. Ligação de fármacos às proteínas plasmáticas

A ligação de um fármaco às proteínas plasmáticas (Fig. 4) limita sua concentração nos tecidos e no seu local de ação, visto que apenas o fármaco livre está em equilíbrio estável através membranas. A quantidade de um fármaco que se liga a proteínas vai depender da concentração do fármaco livre, afinidade do fármaco pelos locais de ligação e a concentração de proteína. A ligação com as proteínas plasmáticas não é seletiva, pois os fármacos podem competir entre si por locais de ligação nas proteínas plasmáticas e podem deslocar outro fármaco da sua ligação na proteína, um fato importante nas interações medicamentosas. Compostos químicos podem se combinar a macromoléculas covalentemente ou por adsorção.⁸¹

Um fármaco na corrente sanguínea pode estar de duas formas, ligado e não ligado a proteínas plasmáticas (Fig. 4). Dependendo da afinidade específica do fármaco pela proteína plasmática, uma proporção do fármaco pode se ligar com as proteínas, sendo o restante não ligado. Se a interação com a proteína é reversível, então ocorrerá o equilíbrio químico entre a fração ligada e não ligada a proteína. A fração não ligada é que exibirá efeito farmacológico, sendo essa fração podendo ser metabolizada e/ou excretada. Por exemplo, a fração ligada de anticoagulante warfarina é 97%, isso significa que há apenas 3% da fração não ligada que é realmente ativa ou excretada. Desde fármacos básicos, ácidos e neutros primeiramente se ligam com albumina. Se a albumina torna-se saturada o fármaco poderá se ligar a outras proteínas plasmáticas, mas a principal ligação ocorre com albumina devido a sua quantidade existente no corpo humano.⁸² Esses fatos que tornam a albumina uma proteína modelo para os estudos de interações com fármacos.

Ligação covalente de ligantes às proteínas tem sido empregada, paralelamente a procedimentos de etiquetagem, em estudos conformacionais das mesmas. Ajtai e Burghardt avaliaram diversos sinais espectroscópicos de rodamina e fluoresceína ligados covalentemente à sulfidril reativa de subfragmento SH1 de miosina.⁸³ Estudando a conformação desses ligantes de xanteno, antes e após sua ligação com SH1, os autores descobriram um sinal dicróico dependente de tempo, na interação de rodamina com SH1, sugerindo uma conversão do ligante entre duas formas diméricas distintas.

Cooper et al. identificaram mudanças conformacionais em polilisina modificada por espiropirano, monitorando o sinal dicróico como uma função de fotocromismo e da composição do solvente, e evidenciando uma estrutura helicoidal para o biopolímero, quando submetido a trifluoroetanol.⁸⁴ Oliveira et al. realizaram estudos de modificação química em

tripsina utilizando 4,4'-diazamino-bis-benzamidina, e obtiveram uma azotripsina modificada no resíduo de Tyr-151 presente no sítio secundário da tripsina bovina. Essa modificação resultou em uma enzima cataliticamente mais eficiente e permanentemente ativada.⁸⁵ Desde o início do século do milênio passado, é conhecida a participação de interações eletrostáticas como força primária na adsorção de ligantes a proteínas,⁸⁶ peculiaridade explorada na determinação de resíduos protéicos ácidos e básicos.⁸⁷

O pioneirismo do trabalho de Irving Klotz e seus colaboradores, na investigação de combinações entre ligantes e proteínas por espectrofotometria e equilíbrio de diálise, possibilitou a determinação dos princípios físico-químicos gerais de interação de ligantes com macromoléculas.⁸⁸

Esses princípios são expressos na participação de interações eletrostáticas entre coligadores e resíduos protéicos, na colaboração de ligações de hidrogênio, e na participação de interações hidrofóbicas, essa última creditadas aos radicais arila dos ligantes.^{89,90} A intensidade das combinações ligante-proteína está diretamente relacionada com o teor local desses radicais.⁹¹

A ligação de ligantes às macromoléculas tem sido reportada através de estudos conformacionais das mesmas, visando à compreensão dos processos físico-químicos que acompanham tais interações. Os principais resultados desses estudos apontam para a participação de ligantes em fenômenos que vão desde cooperatividade de sítios de ligação,⁹² até drásticos efeitos na estrutura tridimensional protéica e suas associações quaternárias.⁹³

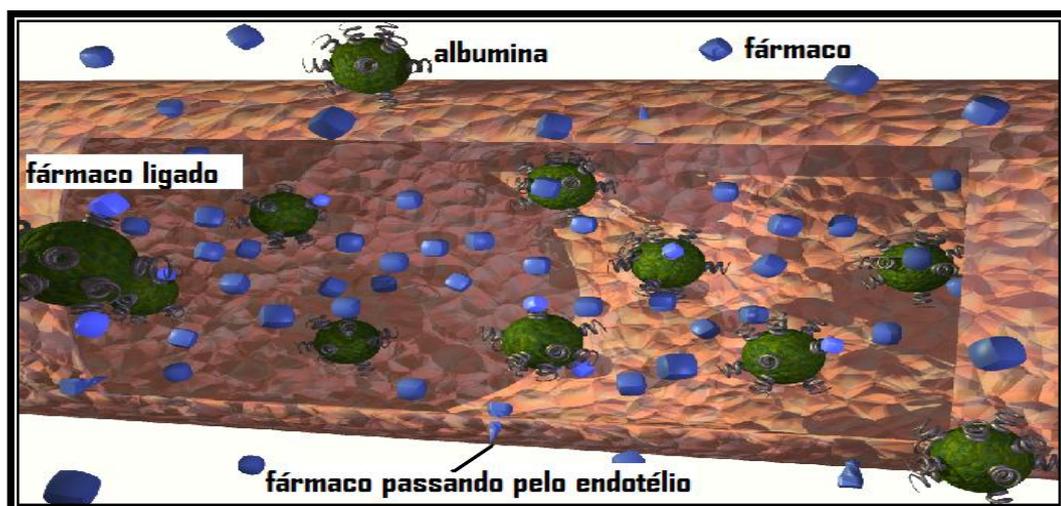


Figura 4. Ilustração da ligação de moléculas do fármaco com albumina extravascular no plasma em um dado instante, e difusão através do endotélio em um pequeno vaso sanguíneo.⁹⁴

1.9. Funções e estrutura de albumina

A albumina (Fig. 5) é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo produzida pelo fígado é um monômero de 66 KD, totalizando 52% da sua composição protéica, contra 20% das α -globulinas (imunoproteínas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), 11% de β -globulinas (lipoproteínas, transferrina), 11% de aglobulinas (lipo e glicoproteínas, e macro e haptoglobulinas), 5% de fibrinogênio e 1% de outras proteínas como as metaloenzimas. Pesquisas anteriores referem-se à proteína como albúmem derivado do latim *albus* após a cor branca dos precipitados floculentos produzidos por várias proteínas.⁹⁵

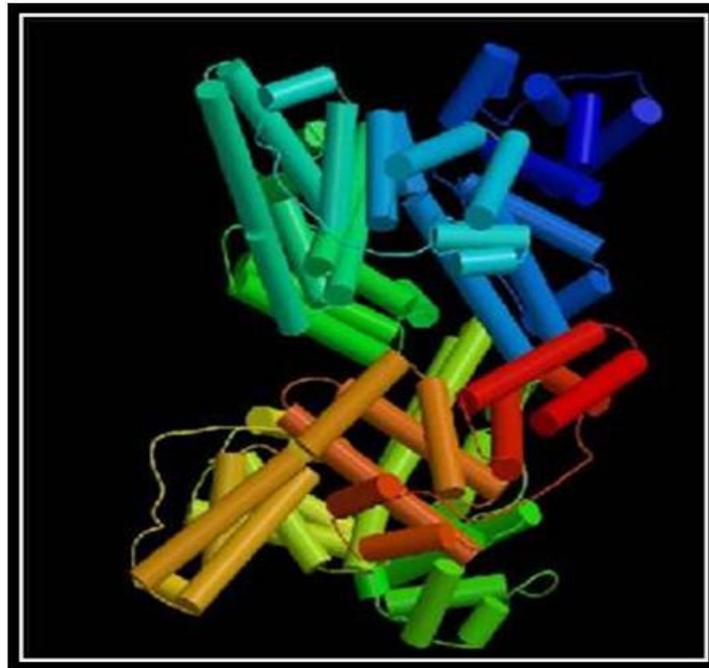


Figura 5. Representação da albumina de soro humano (HSA).⁹⁶

Nos mamíferos a albumina é sintetizada inicialmente como prealbumina pelo fígado. Após a remoção do peptídeo sinal, tem-se a proalbumina que será modificada pela remoção de seis resíduos de propeptídeo do novo terminal N. A albumina enviada para a circulação sanguínea possui uma meia-vida de 19 dias. Em indivíduos normais, está presente em concentrações tipicamente ao redor de 40 mg/mL ($\sim 0,6$ mM)⁹⁷ contribuindo em 80% da pressão osmótica sanguínea. Sua função fisiológica ainda é controversa, precisamente pela enorme variedade de papéis que ela desempenha, e que incluem o controle da pressão osmótica, manutenção do pH do sangue e o transporte, excreção e distribuição de várias substâncias endógenas ou exógenas, como hormônios, aminoácidos, ácidos graxos, íons metálicos e drogas.⁹⁸ Esta proteína pode ser considerada um quelante fisiológico. A albumina é a principal transportadora de ácidos graxos, que são insolúveis no plasma sanguíneo. Ácidos graxos são essenciais para duas funções principais em nosso corpo. Eles são os precursores de fosfolipídios e esfingolipídios, formadores de membranas celulares e de organelas, e podem,

pelo ciclo bioquímico de Lynen, converter-se em ATP, o que resulta nas reservas de triglicerídeos do tecido adiposo. Sob sinais transduzidos do metabolismo celular, ácidos graxos são mobilizados desse tecido à corrente sanguínea, onde são transportados pela albumina sérica até os tecidos alvos de sua oxidação metabólica.

Dentre suas funções primordiais está a manutenção da pressão osmótica coloidal. A proteína é negativamente carregada e, por conseguinte, atrai íons de sódio, os quais por sua vez retêm a água. A albumina também atrai outros íons positivos osmoticamente ativos (efeito Gibbs-Donnan) os quais aumentam a retenção da água.⁹⁹ Outras funções têm-lhe sido sugeridas, como sua ação antioxidante e/ou protetora contra radicais livres no meio extracelular.¹⁰⁰ Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são extremamente capazes de reagir com outras moléculas, que dão origem à acumulação de produtos tóxicos finais e dano celular. Estudos *in vivo* têm mostrado que a soroalbumina humana (HSA) pode ligar e, por conseguinte, remover neutrófilos derivados de espécies reativas de oxigênio, regulando a sinalização celular que é ativada nos processos inflamatórios.¹⁰¹ HSA também influencia o *status* redox do plasma ao ligar metais como o ferro e o cobre que de outra forma se transformariam em formas redox-ativas.¹⁰²

Desta forma o HSA tem um papel antioxidante importante em situações de inflamação. Como a albumina é sintetizada no fígado, a diminuição de sua quantidade no plasma (hipoalbuminemia) pode ser produto de uma doença hepática, como por exemplo, a cirrose, mas também pode ser o resultado de uma doença renal que permita que a albumina escape pela urina (síndrome nefrótica) ou pela perda no intestino devido a uma redistribuição e hemodiluição, como na gravidez por incremento da permeabilidade vascular. Sua diminuição pode também estar relacionada à desnutrição ou uma dieta pobre em proteínas. A hiperalbuminemia, o aumento de quantidade de albumina no plasma, é um sinal de desidratação.

A degradação da albumina pode provavelmente se constituir numa fonte de aminoácidos para alguns tecidos.¹⁰³

Grande parte da importância fisiológica dessa proteína é consequência precisamente da possibilidade de dissolução no meio biológico que ela oferece a substâncias que, originalmente, são hidrofóbicas, como os ácidos graxos. Curry e colaboradores determinaram cristalograficamente cinco sítios de ligação de miristato distribuídos assimetricamente pela molécula de HSA,^{97, 104} e Sugio et al. (1999)¹⁰⁵ designaram três sítios de coordenação de ácidos graxos de cadeia longa na superfície da HSA.

1.9.1. Estrutura primária de soroalbumina

Do ponto de vista químico, a molécula de albumina humana consiste em uma única cadeia polipeptídica de 585 resíduos de aminoácidos (massa molecular aproximada de 66.000 daltons), cuja seqüência foi determinada pela combinação de métodos de seqüenciamento direto e de seqüenciamento de nucleotídeos de clones de DNA recombinante. Algumas características da albumina humana, são:^{100, 102}

a) presença de um único resíduo de triptofano (na posição 214);

b) conteúdo de metionina baixo em relação ao de cisteína (respectivamente, 6 e 35 resíduos). O número ímpar de resíduos de cisteína é de importância fundamental para a estabilização da estrutura e das características de ligação de alguns íons metálicos com a HSA;

c) conteúdo elevado de aminoácidos com carga, como ácido aspártico (36), ácido glutâmico (61), lisina (59) e arginina (23), que conferem à proteína uma carga líquida (-17, em pH fisiológico) e portanto uma boa hidrossolubilidade. De fato, é possível preparar-se soluções fisiológicas de HSA com finalidade medicinal até 30% (massa:volume de solução);

d) ausência de sítios de glicosilação, ao contrário de outras proteínas da família das albuminas, como a α -fetoproteína.

A albumina possui uma distribuição de carga assimétrica em sua estrutura primária. Em pH neutro, Peters calculou uma carga total -10, -8, 0 para os domínios I, II e III, respectivamente para a albumina humana, sendo que uma distribuição semelhante está para outras albuminas. Portanto, a carga negativa é bem alta no sítio N-terminal e menor no domínio C-terminal proporcionando, então uma molécula com assimetria elétrica ou de cargas.

1.9.2. Estrutura secundária

Diversos modos de avaliação do conteúdo de sub-estruturas organizadas da HSA, como α -hélices e folhas β , (Fig. 6) foram empregados antes que resultados conclusivos fossem obtidos via difração de raios-X. Esses métodos baseiam-se em medidas espectroscópicas de dicroísmo circular e previsões por regras de probabilidade, nas quais se determina empiricamente a frequência de um dado aminoácido numa dessas sub-estruturas.

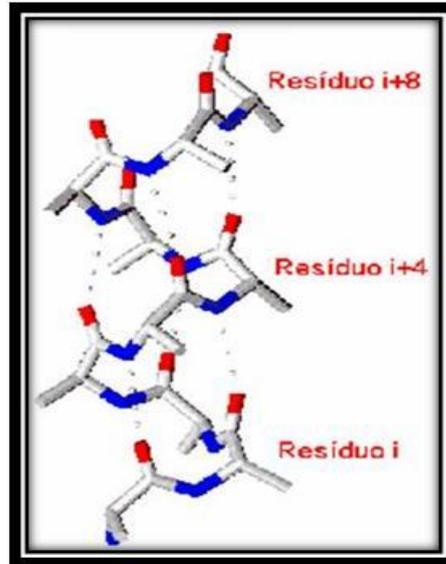


Figura 6. Estrutura geral da α -hélice direita, estrutura comumente encontrada nas proteínas.¹⁰⁶ Os pontilhados são ligações de hidrogênio entre o grupo NH (azul) e átomos de oxigênio.

Coerentemente com as evidências oriundas daqueles métodos, dados cristalográficos mostram que a HSA é constituída principalmente por α -hélices (~ 67%), e quase nenhuma contribuição de folhas β .¹⁰¹ Assim a albumina é estruturalmente composta de vários segmentos em alfa hélice, que se agrupam para formar dois subdomínios (A e B). Três pares idênticos destes subdomínios se unem para formar a albumina (Fig. 7).

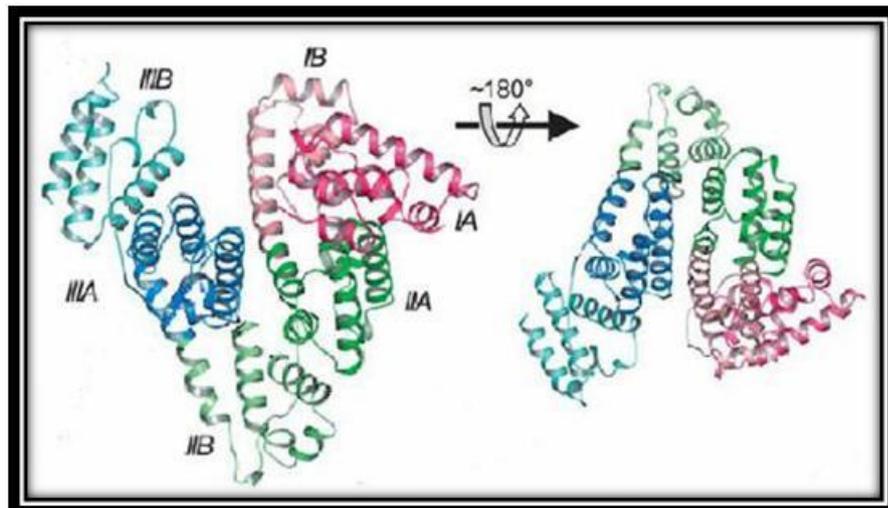


Figura 7. Esquema da estrutura secundária de HSA com subdomínios codificados por cores da seguinte forma: IA; IB; IIA; IIB; IIIA; IIIB.¹⁰⁶

HSA pode se ligar rapidamente e com grande afinidade a vários ligantes diferentes, tendo as reações de equilíbrio HSA-ligante constantes de velocidade de pseudo primeira ordem típicas de 10^{-5} s^{-1} , ou seja, que a reação atinge o equilíbrio na ordem de 1 microssegundo.¹⁰⁷ Isso sugere a capacidade da proteína de alterar sua conformação interna de modo rápido. “Bolsões” hidrofóbicos, por um lado, e grupos substituintes carregados, por outro, devem auxiliar esses ligantes a se fixarem na proteína. Contudo, essa capacidade de alteração conformacional não é ilimitada; o próprio ligante tem que preencher certos requisitos estéricos para ligações de alta afinidade.

Além disso, a presença de um ligante pode impedir a ligação de outro (competição pelos sítios de ligação) e proteger a proteína contra desnaturação pelo calor ou pela ação da uréia; contra hidrólise enzimática, etc. Uma decorrência importante desse fato é que, apesar das alterações conformacionais na proteína induzidas pelos ligantes, a quantidade de hélices alfa não se altera significativamente.¹⁰³

1.9.3. Estrutura terciária

A albumina foi reconhecida pela primeira vez como um importante componente do plasma sanguíneo em 1839, e seus cristais têm sido obtidos desde o final do século XIX. Numerosos estudos espectroscópicos foram empregados na tentativa de elucidar sua estrutura terciária, porém, foi só muito recentemente que resultados conclusivos de difração de raios-X foram apresentados, em resoluções de $2,8 \text{ \AA}^{98}$ e $2,5 \text{ \AA}^{105}$, quer por limitações na resolução dos aparelhos até então disponíveis, quer pela obtenção de cristais com perfil de difração insatisfatório, quer ainda pela falta de reprodutibilidade dos experimentos. Na faixa de pH entre 4,5-8,0; a molécula de HSA tem a forma de coração, aproximadamente igual a um triângulo equilátero de lados $\sim 80 \text{ \AA}$ e com $\sim 30 \text{ \AA}$ de profundidade.

Outra característica da HSA consiste na posição das 17 pontes de dissulfeto (ligações S-S entre resíduos de cisteína topologicamente próximas), que se dão quase exclusivamente entre segmentos helicoidais protegidos do solvente. A albumina é a única proteína conhecida cujo arranjo tridimensional depende inteiramente desse motivo estrutural. Isso talvez explique a notória estabilidade dessa proteína frente às condições desnaturantes mais adversas.¹⁰⁰ Interações hidrofóbicas entre as hélices conferem maior estabilidade à estrutura da proteína.

1.10. Sítios de ligação de soroalbumina

A organização estrutural globular da HSA dá a possibilidade de se ligar com várias substâncias em múltiplos sítios da molécula, unindo-se assim a vários componentes endógenos e exógenos. Estes compostos incluem ácidos graxos, bilirrubina, metal, tiroxina e triptofano, assim como drogas que têm características ácidas ou eletronegativas (e.g. warfarina, diazepam e ibuprofeno). Estas características fazem com que a HSA seja um dos maiores transportadores de fármacos no sangue (Fig. 8).

A HSA pode facilitar a ativação de várias substâncias, tais como hormônios ou drogas, ou diminuir a presença de toxinas no plasma. Por exemplo, a ligação do triptofano a HSA regula a deposição deste nos tecidos. Em pacientes com uma avançada cirrose e hipoalbuminemia, a diminuição dos sítios de ligação gera uma quantidade adicional de triptofano livre o qual pode gerar o desenvolvimento de encefalopatia hepática.¹⁰⁸

A ligação de HSA também afeta a farmacocinética e eficácia de muitas drogas. Por exemplo, drogas com alta afinidade pelo HSA têm que ser administradas em altas doses para atingir uma efetiva concentração *in vivo*; sua distribuição nos sítios de ação poderia ser reduzida ou mesmo eliminada. Apesar disso, uma alta ligação da droga com a HSA poderia ser desejável porque ajudaria a solubilizar compostos que de outra forma formariam agregados e seriam eliminados.

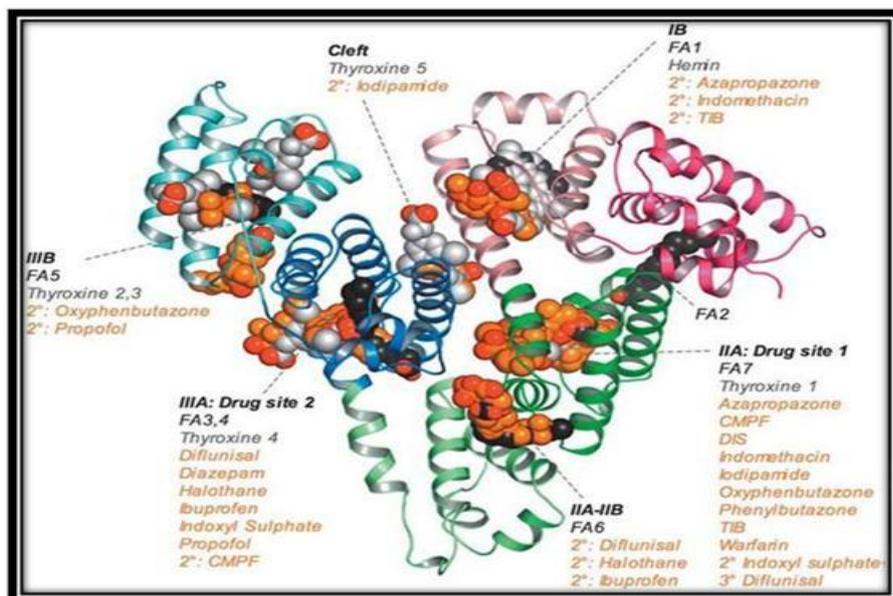


Figura 8. Esquema mostrando os sítios de vários ligantes de HSA.¹⁰⁹

1.11. Comparação entre soroalbumina humana e bovina

As albuminas de mamíferos possuem uma sequência de aminoácidos bem conservada, o que sugere uma diferenciação evolutiva antiga. Na Tabela 3 podemos verificar essa identidade para algumas albuminas conhecidas. Em geral, as albuminas de mamíferos possuem um baixo conteúdo de triptofano e metionina e um alto conteúdo de cisteína e de aminoácidos carregados como os ácidos aspártico, glutâmico e lisina. A albumina bovina apresenta dois triptofanos (Trp 134 e Trp 212) o que a diferencia da albumina humana que apresenta apenas um triptofano (Trp 214). Além disso, a diferença entre a BSA e a HSA no sítio N-terminal resume-se a um aminoácido, sendo Asp-Thr-His para a BSA e Asp-Ala-His para HSA.

Tanto a albumina bovina quanto a humana apresentam uma sequência N-terminal X-Y-His que constitui um forte sítio fisiológico de coordenação para íons de cobre II. Este sítio é estável, pois os quatro nitrogênios do tripeptíio amino-terminal formam uma forte ligação quadrado planar com o metal. Assim, a albumina humana apresenta, por exemplo, aproximadamente 75% de homologia com as seqüências das albuminas bovina e equina.¹⁰⁰

Atualmente albumina sérica do boi (BSA) similar a HSA é utilizada em pesquisa quando se necessita de uma albumina genérica.

Tabela 3. Matriz de identidade entre as seqüências de algumas albuminas (os valores indicam o número de resíduos conservados).¹⁰⁰

| Origem | Humano | Bovino | Equino | Ovino | Rato | Sapo |
|---------------|--------|--------|--------|-------|------|------|
| Bovina | 441 | | | | | |
| Equino | 442 | 430 | | | | |
| Ovino | 435 | 539 | 438 | | | |
| Rato | 426 | 409 | 422 | 404 | | |
| Sapo | 221 | 218 | 222 | 216 | 225 | |
| Salmão | 161 | 170 | 153 | 165 | 159 | 154 |

1.12. Métodos para determinação de interação de ligante-proteína

A determinação experimental de parâmetros termodinâmicos, constantes de afinidade e de parâmetros como a estequiometria da formação de complexos é uma poderosa ferramenta

para os estudos envolvendo processos de reconhecimento molecular. Tais medidas adicionam informação a estudos teóricos e experimentais auxiliando na construção de modelos que permitam a elucidação de mecanismos bioquímicos, função de proteínas, relação entre propriedades de compostos e sua atividade biológica, entre outros. Com base no conhecimento da interação de determinadas moléculas com uma proteína alvo é possível, por exemplo, desenhar compostos capazes de controlar sua atividade, interrompendo ou estimulando as rotas metabólicas das quais a proteína alvo participa. Existe um conjunto grande de técnicas para a determinação da interação ligante-proteína, dentre as quais podem ser citadas o equilíbrio de diálise, cromatografia de Hummel-Dreyer, ressonância plasmônica, dicroísmo circular, difração de raios-X, potencial zeta, espectroscopia de absorção no infravermelho, ultracentrifugação analítica, titulação hidrogeneiônica, dentre outros. Nesse trabalho utilizamos a espectroscopia de absorção UV-VIS, de fluorescência, voltametria e modelagem molecular.

1.12.1. Espectroscopia de absorção¹¹⁰

Moléculas absorvem luz. Os comprimentos de onda que são absorvidos e a eficiência da absorção dependem tanto da estrutura da molécula como do meio onde está a molécula, fazendo da espectroscopia uma ferramenta útil para caracterizar pequenas e grandes macromoléculas.

1.12.1.1. Teoria de absorção de luz por molécula

Teoria da absorção da luz por moléculas, em seu aspecto ondulatório, consiste de campos elétrico e magnético mutuamente perpendiculares, que oscilam senoidalmente à medida que se propagam pelo espaço.

Mas a luz também se comporta como um feixe de partículas, os fótons. A energia E do fóton é $E = hc/\lambda = hv$, sendo h a constante de Planck, c a velocidade da luz, λ o comprimento de onda e v a frequência. Quando uma onda eletromagnética encontra uma molécula, ela pode ser espalhada (sua direção de propagação muda) ou pode ser absorvida (sua energia é transferida à molécula). A probabilidade relativa da ocorrência de cada processo é uma propriedade particular da molécula encontrada. Se a energia eletromagnética da luz é

absorvida, a molécula é dita estar excitada ou em um estado excitado. Uma molécula ou parte de uma molécula que pode ser excitada pela absorção é chamada de cromóforo.

Esta energia de excitação é usualmente convertida em calor (energia cinética) pela colisão de moléculas excitadas com outras moléculas (por exemplo: uma molécula do solvente). Com algumas moléculas esta energia é reemitida como fluorescência (o que veremos na próxima seção). Em ambos os casos, a intensidade da luz transmitida por um conjunto de cromóforos é menor que a intensidade da luz incidente.

Uma molécula excitada possuirá uma das possíveis quantidades discretas de energia descritas pelas leis da mecânica quântica, os níveis de energia da molécula. Os níveis de energia, em maioria, são determinados pelas possíveis distribuições espaciais dos elétrons e são chamados níveis eletrônicos de energia; sobre estes níveis existem os níveis vibracionais, que indicam os vários modos de vibração da molécula (o estiramento e dobra de várias ligações covalentes). Há também, subdivisões menores chamados de níveis rotacionais, que apresentam uma importância menor na espectroscopia de absorção. Todos estes níveis de energia são geralmente descritos por um diagrama de níveis de energia (Fig. 9). O mais baixo nível eletrônico é chamado de estado fundamental e todos os outros são estados excitados.

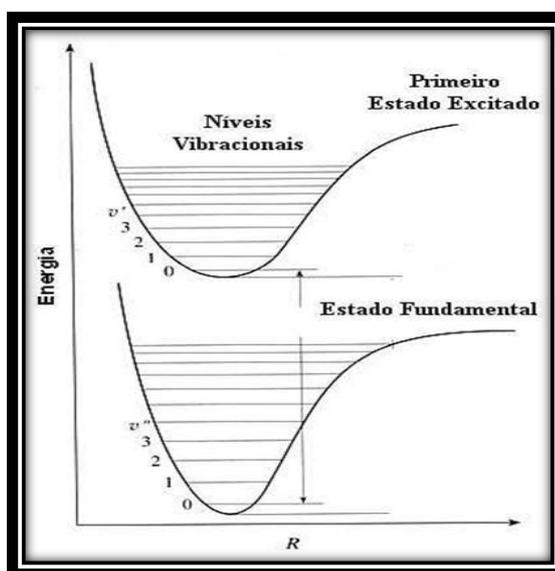


Figura 9. Diagrama típico diagrama de níveis de energia mostrando o estado fundamental e o primeiro estado excitado. Os níveis vibracionais são mostrados como linhas horizontais mais finas.¹¹⁰

A absorção da energia é possível somente se a quantidade absorvida corresponde à diferença entre níveis de energia. Isto pode ser expresso pela expressão que correlaciona o comprimento de onda da luz (λ) com o nível de energia da molécula antes da absorção (E_1) e o nível de energia alcançado após a absorção (E_2): $\lambda = hc / (E_2 - E_1)$. A mudança entre níveis

de energia é chamada de transição. Uma transição entre níveis eletrônicos de energia representa a energia requerida para mover um elétron de uma órbita a outra. As transições são representadas por setas verticais no diagrama dos níveis de energia. (todas as transições não ocorrem com alta probabilidade, são determinadas pelas regras de seleção da mecânica quântica). A representação da probabilidade de absorção *versus* o comprimento de onda é chamado espectro de absorção e a espectroscopia de absorção tem por objetivo obter e analisar os dados de absorção. Se todas as transições estão somente entre o nível vibracional mais baixo do estado fundamental e o primeiro estado excitado, então o espectro de absorção consistirá de uma seta, linhas discretas. No entanto, como as transições são possíveis do estado fundamental para qualquer dos níveis vibracionais e rotacionais do primeiro estado excitado e porque as linhas têm largura finita, o espectro aparecerá como uma curva relativamente suave. Para a maioria das moléculas, os comprimentos de onda correspondentes as transições entre o estado fundamental e qualquer nível vibracional do primeiro estado excitado estarão no intervalo da luz ultravioleta e da luz visível. Transições de baixa energia também são possíveis entre níveis vibracionais no interior de um mesmo nível eletrônico. Estas transições estarão na faixa do infravermelho. A Fig. 10 mostra o espectro eletromagnético.

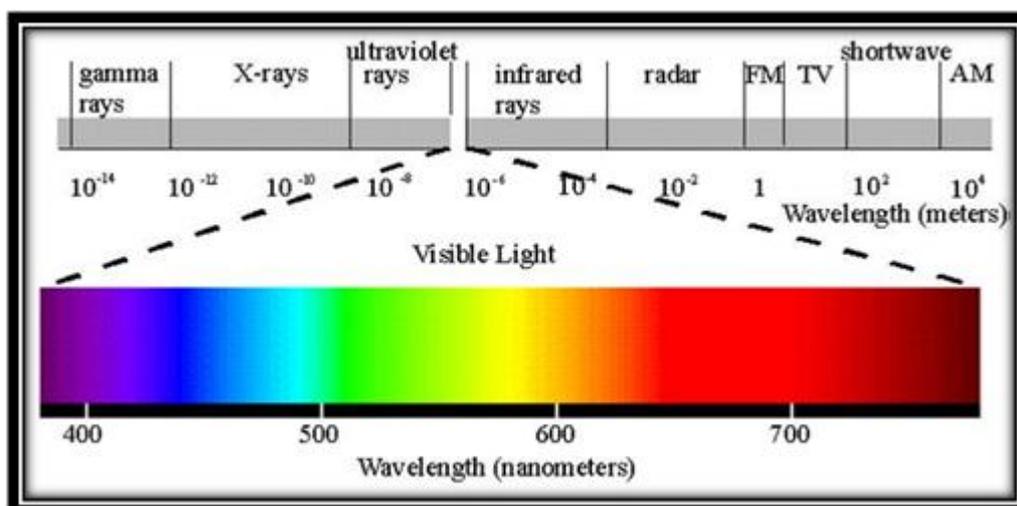


Figura 10. Parte do espectro eletromagnético com destaque para os comprimentos de onda da luz visível.¹¹⁰

A probabilidade de absorção para um único comprimento de onda é caracterizada pelo coeficiente de absorção molar para aquele comprimento de onda. Isto é mais facilmente definido em termos de como ele é medido. Se a luz de intensidade (I_0) passa através de uma

substância (que pode estar em solução) de espessura (b) e concentração molar (c), a intensidade da luz transmitida (I) obedece à lei de Beer-Lambert:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon d c} \quad \text{ou} \quad \log I/I_0 = -\varepsilon b c \quad \text{ou} \quad A = \varepsilon b c \quad (1)$$

em que (ε) é o coeficiente de absorção molar. Os dados de absorção podem ser colocados em porcentagem (%) de transmissão ($T = 100 I / I_0$) ou, mais comumente, como a absorbância [$A = \log (I_0 / I)$]. Quando ($b = 1 \text{ cm}$), A é comumente chamado de densidade ótica ($OD\lambda$), em que o índice λ informa o comprimento de onda em que a medida foi feita. A densidade ótica é conveniente, pois é igual a (εc). Em alguns casos, se c é alto, (ε) aparece como uma função de (c) e pode ser dito que a lei de Beer-Lambert foi violada. Isto pode resultar do espalhamento ou das mudanças estruturais (por exemplo: dimerização, agregação, ou mudanças químicas) para concentrações altas.

1.12.2. Fluorescência no estado estacionário

Em algumas moléculas, a absorção de um fóton é seguida por emissão de luz de um comprimento de onda maior (menor energia). Esta emissão é chamada de fluorescência, transição de estado singleto para singleto (ou fosforescência, se a transição for de estado tripleto para singleto). Como na espectroscopia de absorção, há muitos fatores que alteram o espectro de fluorescência, portanto a eficiência da fluorescência é dependente desses fatores relacionados ao meio em que a amostra está inserida. As medidas de fluorescência são mais sensíveis que as medidas de absorbância, apesar da espectroscopia de absorção ser mais simples de se realizar. As medidas de fluorescência de macromoléculas podem nos dar informações sobre: conformação, sítios de ligação, interações com solventes, grau de flexibilidade, distâncias intermoleculares e coeficiente de difusão rotacional de macromoléculas.

A teoria da fluorescência não é ainda adequada para permitir uma correlação positiva entre o espectro de fluorescência e as propriedades do meio da amostra emissora. Mais uma vez a utilidade da técnica é baseada em princípios experimentais estabelecidos a partir de estudos com compostos modelos.

1.12.2.1. Teoria da Fluorescência¹¹¹

Como já mencionado na seção anterior, as moléculas têm níveis discretos de energia. Os níveis de energia de uma molécula são descritos pelo diagrama de níveis de energia da Fig. 11.

No diagrama são mostrados dois níveis eletrônicos, o de menor energia ou estado fundamental (G) e um de maior energia ou primeiro estado excitado (S1) e alguns dos níveis vibracionais de cada um.

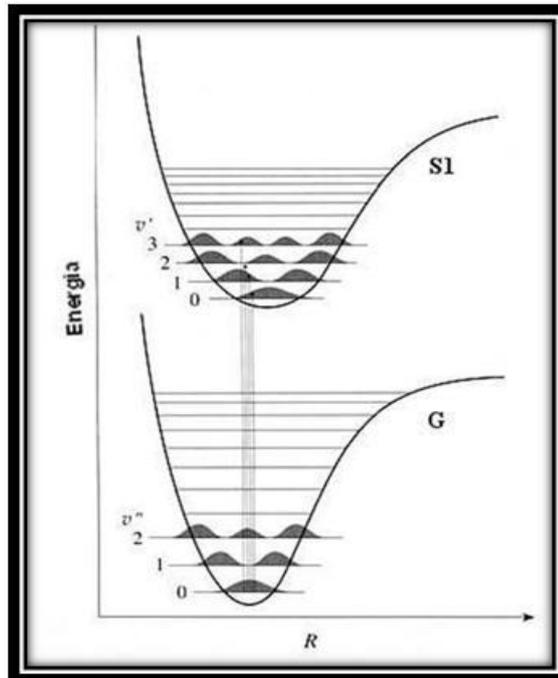


Figura 11. Diagrama de níveis de energia de um cromóforo. G e S1 indicam o estado fundamental e o primeiro estado excitado, respectivamente. Os estados vibracionais são representados pelas linhas finas horizontais. Esta molécula absorve luz pelas transições indicadas no diagrama. Depois da excitação, há perdas vibracionais para o nível mais baixo do primeiro estado excitado e então é capaz de emitir luz por fluorescência a partir desse estado.¹¹¹

Quando a energia da luz é absorvida, a molécula passa de um nível de energia mais baixo para um mais alto (nem toda transição é possível, as transições possíveis são definidas pelas regras de seleção da mecânica quântica). Cada transição está indicada no diagrama por linhas verticais. Se a molécula está inicialmente não excitada (no seu estado fundamental, (G)) e a energia absorvida é maior que aquela necessária para passar ao primeiro estado

eletrônico excitado, (S1), o excesso de energia pode ser absorvido como energia vibracional e a molécula estará em um dos níveis vibracionais mostrados na Fig. 11. Esta energia vibracional é rapidamente dissipada como calor pelas colisões com as moléculas do solvente (se a molécula excitada está em solução), e a molécula passa ao nível vibracional mais baixo de (S1). A molécula excitada, então, retorna a (G) pela emissão de luz (fluorescência) ou por uma transição não-radiativa. Como parte da energia é perdida para o nível mais baixo de (S1), a luz emitida terá menos energia (maior comprimento de onda) que a luz absorvida. Assim, a luz de fluorescência terá sempre um comprimento de onda maior que a luz de excitação. No entanto, ao retornar para (G), a molécula pode ficar em um nível vibracional que não seja o fundamental absoluto; esta energia vibracional será, também, dissipada em forma de calor. Se existirem diferentes absorvedores, a luz emitida será composta de diferentes comprimentos de onda (todos maiores que aqueles da luz absorvida); a probabilidade de decaimento do primeiro estado excitado para cada nível vibracional do estado fundamental determina a forma do espectro de fluorescência. Na Fig. 12 são mostrados espectros típicos de absorção, de excitação e emissão de fluorescência (a), bem como espectros de excitação e emissão de fluorescência do triptofano (b).

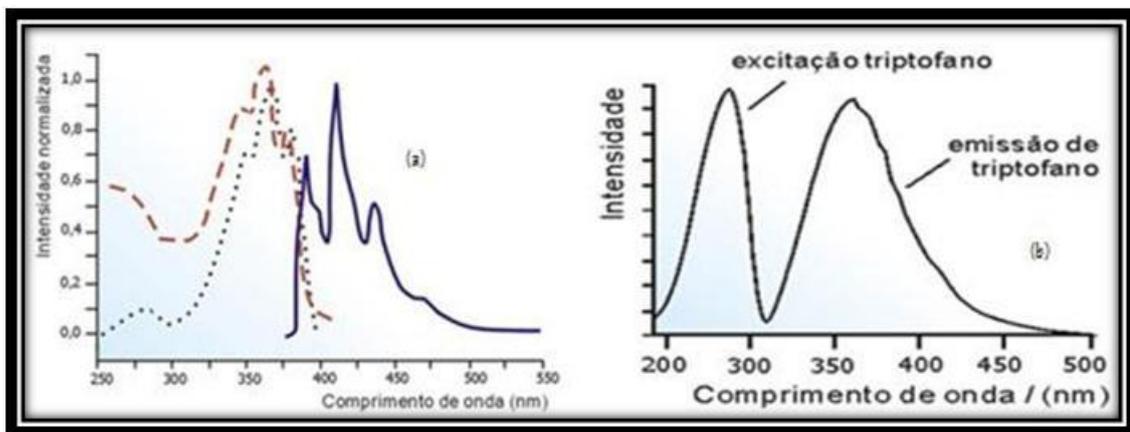


Figura 12. Espectros típicos de absorção (tracejado), excitação (pontilhado) e emissão (contínuo) de fluorescência (a), bem como espectros de excitação e emissão de fluorescência do triptofano (b).¹¹¹

Como visto antes, uma molécula excitada nem sempre fluoresce. A probabilidade da fluorescência é descrita pelo rendimento quântico, Q , que é a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos. Muitos fatores determinam Q , alguns deles são propriedades da própria molécula (fatores internos) e outros são devidos ao meio em que se encontra (ambiente). Os fatores internos derivam principalmente da distribuição dos níveis

vibracionais entre G e S. Por exemplo, se um nível vibracional (VG) do estado fundamental tem a mesma energia de um nível vibracional de ordem mais baixa do primeiro estado excitado (VS), pode ocorrer uma transição não-radiativa de VS para VG, seguido da conversão da energia de VG em calor. Isto é o que normalmente acontece com moléculas flexíveis, devido aos muitos níveis vibracionais altos de G. Este é o meio mais comum para dissipar a energia de excitação e devemos considerar que as moléculas fluorescentes (fluoróforos) são raras e que são quase invariavelmente compostas por anéis aromáticos rígidos ou por sistemas de anéis.

Os fatores internos não são geralmente de interesse para estudos de propriedades das macromoléculas. Os fatores do meio são mais importantes. O efeito do meio é, primariamente, fornecer processos não-radiativos que competem com a fluorescência e dessa forma reduzem o rendimento quântico Q; esta redução de Q é chamada de supressão da fluorescência. Em sistemas biológicos, a supressão é normalmente o resultado dos processos de colisão (desde uma reação química até uma simples colisão com troca de energia) ou um processo radiativo mais longo chamado transferência ressonante de energia. Estes três fatores são expressos em uma situação experimental, envolvendo soluções e compostos dissolvidos que interagem com o fluoróforo (chamados supressores de fluorescência), da temperatura, do pH, dos grupos químicos vizinhos, ou da concentração do fluoróforo. O fluoróforo isolado não apresenta processos não radiativos para perda de energia, mas somente fluorescência.

1.12.2.2. Medidas de fluorescência intrínseca para estudo de proteínas

Dois tipos de fluoróforos são usados em análise de fluorescência de macromoléculas – fluoróforos intrínsecos (contidos nas macromoléculas) e fluoróforos extrínsecos (adicionados ao sistema, normalmente ligados a um de seus componentes).

Para proteínas, há somente três fluoróforos intrínsecos – triptofano, tirosina e fenilalanina (em ordem de maior para menor Q). A fluorescência de cada um deles pode ser distinguida pela excitação e observação em comprimentos de onda apropriados. Na prática, a fluorescência do triptofano é a mais comumente estudada, porque a fenilalanina tem um Q muito baixo e a fluorescência da tirosina é frequentemente muito baixa devido à supressão. A fluorescência da tirosina é quase totalmente suprimida se ela estiver ionizada, ou próxima de um grupo amino, um grupo carboxil, ou um triptofano. Em situações especiais, no entanto, pode-se detectá-la com excitação de 280 nm.

A principal razão para estudar a fluorescência intrínseca de proteínas é obter informações sobre sua conformação. Isto é possível porque a fluorescência tanto do triptofano quanto da tirosina dependem fortemente do seu ambiente (por exemplo: solvente, pH, a presença de um inibidor, uma molécula pequena ou um grupo vizinho na proteína).

O uso das medidas de fluorescência intrínseca em proteínas é baseado em regras empíricas obtidas de estudos de compostos modelos cujas estruturas e conformações são bem conhecidas. As regras de uso mais comuns são:

1. Toda fluorescência de uma proteína é devido ao triptofano, tirosina e fenilalanina.
 2. O $\lambda_{\text{máx}}$ do espectro de fluorescência do triptofano desvia-se para comprimentos de onda menores e a intensidade aumenta quando a polaridade do solvente diminui.

a. Se $\lambda_{\text{máx}}$ é desviado para comprimentos de onda menores quando a proteína está em um solvente polar, o triptofano deve estar internamente e em um ambiente não polar. (Um desvio do $\lambda_{\text{máx}}$ em uma macromolécula é em relação ao $\lambda_{\text{máx}}$ do aminoácido livre na água).

b. Se $\lambda_{\text{máx}}$ é desviado para comprimentos de onda menores quando a proteína está em um meio não polar, ou o triptofano está na superfície da proteína ou o solvente induz uma mudança conformacional que traz o triptofano para a superfície.

3. Se a substância for um inibidor (se ela inibe a fluorescência de um aminoácido livre), como iodeto, nitrato ou íons de cério, suprimem a fluorescência do triptofano ou da tirosina, os aminoácidos devem estar na superfície da proteína. Se não ocorrer a supressão, então:

a. O aminoácido pode ser interno.

b. O aminoácido pode estar em uma fresta de dimensões tão pequenas que o inibidor não pode entrar em contato com ele.

c. O aminoácido pode estar em uma região altamente carregada e a carga pode repelir o supressor. Por exemplo, o íon iodeto (um inibidor negativo) falha em inibir a fluorescência do triptofano se o triptofano estiver em uma região carregada negativamente; o íon Cs^+ não atua se o fluoróforo estiver em uma região positiva. O supressor neutro, acrilamida, não é afetado pela carga.

4. Se a substância não afeta o rendimento quântico do aminoácido livre, mas afeta a fluorescência da proteína, então deve estar ocorrendo uma mudança conformacional na proteína.

5. Se triptofano ou tirosina estão em um meio polar, seus rendimentos quânticos (Q) diminuem com o aumento da temperatura, T, ao passo que, em um meio não-polar, ocorre uma mudança pequena. Conseqüentemente, desvio do decréscimo padrão (monotônico) de Q com aumento de T indica que o aquecimento está induzindo uma mudança conformacional,

pois a polaridade das regiões nas quais o triptofano está sendo exposto devem estar se modificando. Um aumento da dependência de Q com a temperatura, quando a proteína está em um solvente polar, como a água, indica que mais moléculas de triptofano estão sendo expostas ao solvente, ou seja, a proteína está se desenovelando.

6. O rendimento quântico (Q) do triptofano e da tirosina decresce se o grupo α -carboxil destes aminoácidos estiver protonado.

7. A fluorescência do triptofano é suprimida pela presença de grupos ácidos protonados. Conseqüentemente, se o pK medido por monitoração da fluorescência do triptofano é o mesmo que o pK de um grupo ionizável conhecido (por exemplo: o imidazol de histidina ou a ligação SH de cisteína), então este grupo deve estar muito perto de um triptofano. No entanto, esta regra só se aplica se for possível mostrar, de modo independente, que a mudança de pH não leva a mudança conformacional.

8. Se uma substância qualquer liga-se a uma proteína e a fluorescência do triptofano é suprimida, pode estar ocorrendo: i) mudança conformacional total devido à ligação; ou ii) algum triptofano está no sítio de ligação, ou muito próximo dele.

Observações: Dois pontos importantes devem ser ressaltados sobre as regras acima:

1- A fluorescência é muito sensível a fatores do meio. Então outras interpretações devem sempre ser levadas em conta, para os resultados descritos nessas regras.

2- Se uma proteína contém muitos triptofanos, como geralmente acontece, cada um pode ter um rendimento quântico diferente. Portanto, a magnitude absoluta das mudanças não pode ser usada para determinar a fração em um dado meio, por exemplo, interno *versus* externo.

1.12.3. Voltametria

A voltametria é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie em uma cela eletroquímica constituída de pelo menos dois eletrodos, sendo um deles um microeletrodo (o eletrodo de trabalho) e o outro um eletrodo de superfície relativamente grande (usualmente um eletrodo de referência). O potencial é aplicado entre os dois eletrodos em forma de varredura, isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente. A curva corrente *versus* potencial obtida é chamada de voltamograma.

1.12.3.1. Célula de três eletrodos

Nesta célula, os eletrodos são conectados a um amplificador operacional, pertencente ao circuito eletrônico do polarógrafo. O amplificador operacional atuará quando for aplicada uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, fazendo com que a resistência do eletrodo de referência aumente e a do eletrodo auxiliar diminua (Fig. 13). Assim a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios (como eletrólise, por exemplo) no eletrodo de referência. Com este recurso o eletrodo de referência realizará o seu papel sem interferências, que é o de manter o seu potencial constante durante as medidas. Por isto pode-se usar além do eletrodo de trabalho e do auxiliar, um eletrodo de referência de dimensões pequenas, o que facilita o uso de recipientes polarográficos/voltamétricos de tamanho reduzido. De um modo geral, a célula de três eletrodos apresenta as vantagens:

1. é mais adequada para soluções diluídas,
2. pode ser usada para soluções de alta resistência (solventes orgânicos, mistura água mais solvente orgânico) e
3. pode ser usada com eletrólitos de suporte mais diluídos.

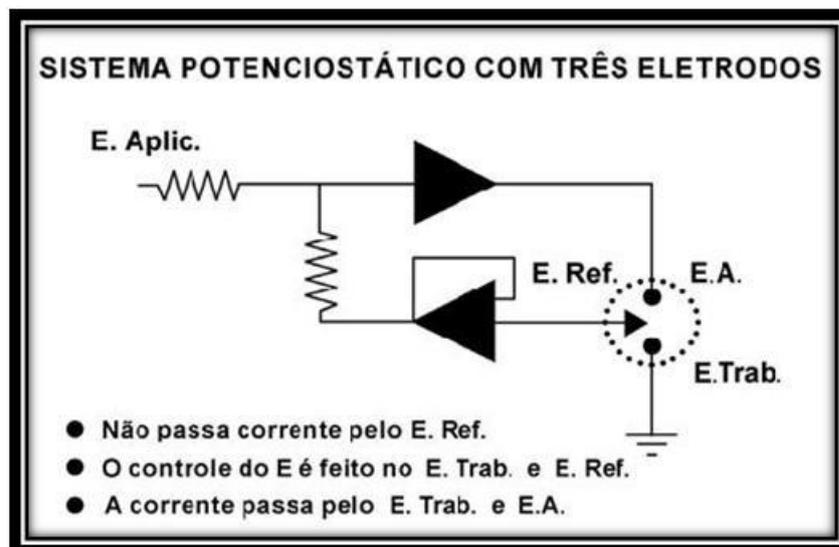


Figura 13. Esquema mostrando a célula conectada a um sistema potenciostático.¹¹²

1.12.3.2. Eletrodo de trabalho

O eletrodo de trabalho mais importante usado em voltametria ainda é o eletrodo de mercúrio. Ele pode ser usado tanto no modo gotejante quanto no modo estático. Nesse modo, a gota de mercúrio, depois de formada, permanece imóvel na ponta do capilar e o voltamograma é registrado nessa única gota. O eletrodo de mercúrio também pode ser usado na forma de filme de mercúrio. Neste caso, o filme é depositado eletroquimicamente em superfícies sólidas, como de platina e carbono vítreo. A sua atuação (do eletrodo de mercúrio) é marcadamente na região catódica, em potenciais que podem variar de +0,3 V a -2,3 V *versus* o eletrodo de calomelano saturado (ECS), dependendo do meio utilizado. Esta região de potencial é onde ocorrem as reações eletródicas da maioria dos íons metálicos e de grande número de espécies orgânicas, daí a sua importância. No modo gotejante ele é um eletrodo de superfície renovável, evitando problemas, entre outros, devido aos chamados envenenamentos superficiais.

Entre os eletrodos sólidos o de platina é um dos mais importantes. Ele atua na região de potencial de cerca de +1,1V a -0,5 V *versus* ECS, dependendo do eletrólito de suporte utilizado. É útil na região anódica, onde o eletrodo de mercúrio não atua. Outro eletrodo sólido útil na região anódica é o de ouro, que pode ser utilizado em intervalos de potencial de +1,5 a -0,8 V *versus* ECS.

Muito usados na região anódica são os eletrodos de carbono, principalmente o de carbono vítreo, que atua no intervalo de +1,5 V a -1,1 V *versus* ECS, dependendo do meio utilizado.

Embora diversos eletrodos sólidos possam ser usados em parte da região catódica, todos têm desempenho inferior ao eletrodo de mercúrio, devido principalmente as suas propriedades envolvendo a renovação superficial e formação de amálgamas com vários metais.

Mais recentemente tem tido sido desenvolvidos novos tipos de eletrodos de trabalho para serem usados em voltametria, tais como os eletrodos quimicamente modificados e os ultra-microeletrodos.

1.12.3.3. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é provavelmente uma das técnicas eletroquímicas mais versáteis para o estudo de espécies eletroativas em solução ou imobilizadas sobre eletrodos, fornecendo informações tanto quantitativas quanto qualitativas sobre o sistema. Esta versatilidade combinada com a facilidade de medida, tem resultado num extensivo uso da voltametria cíclica nos campos da eletroquímica, química inorgânica, química orgânica e bioquímica. O voltamograma resultante é análogo a um espectro convencional, o qual fornece informação de uma determinada espécie como função da varredura de potencial.¹¹²

A eficiência desta técnica resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos.¹¹³

Inicia-se a aplicação do potencial de um valor no qual nenhuma redução ocorre, com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódica) ocorre à redução do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto, quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso, até o valor inicial, e no caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão oxidados, gerando um pico simétrico ao pico da redução. O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos.

Existem dois componentes principais que determinam as reações que ocorrem no eletrodo: a transferência difusional de massa do analito em solução para a superfície do eletrodo, e a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo; em alguns casos ainda pode ocorrer reações químicas acopladas a algum destes processos. A eq. (2) de Butler-Volmer,¹¹⁴ equação básica da cinética eletroquímica, expressa estas relações.

$$I = A \cdot i_0 \exp \left[\frac{(1-\alpha) \cdot n e \cdot F}{R \cdot T} (E - E_{eq}) \right] - \exp \left[\frac{-\alpha \cdot n e \cdot F}{R \cdot T} (E - E_{eq}) \right] \quad (2)$$

onde I é a corrente do eletrodo (A); i_0 densidade de corrente (A/m^2); E potencial do eletrodo (V); E_{eq} potencial de equilíbrio (V); A área de superfície do eletrodo (m^2); T temperatura

absoluta (K); n número de elétrons envolvidos na reação do eletrodo; F constante de Faraday; R constante universal dos gases e α coeficiente de transferência de elétrons.

Para uma reação reversível, ou seja, uma reação que ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface, a equação de Butler-Volmer se reduz na equação de Nerst (eq. 3), pois como a cinética da reação de transferência de carga é rápida ($K_s > 10^{-1} \text{ cm.s}^{-1}$) apenas a etapa de transferência de massa irá ditar as regras do processo. A corrente do pico (em amperes) neste caso é dada por:

$$i_{pc} = (2,69 \times 10^5) n e^{2/3} A D_0^{1/2} v^{1/2} C_0 \quad (3)$$

Sendo que n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D_0 é o coeficiente de difusão (cm^2s^{-1}) e C_0 é a concentração da espécie em solução (mol.cm^{-3}), v é a velocidade de varredura (V.s^{-1}).

Para uma reação reversível a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Outros critérios para reversibilidade são a razão da corrente de pico anódico e catódico igual à unidade e independente de v , o potencial de pico não variando com a velocidade de varredura de potencial e a razão $i_p/v^{1/2}$ constante e independente de v .¹¹⁵

Quando a velocidade de transferência de carga é lenta comparada com a velocidade de varredura ($K_s < 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) as concentrações das espécies oxidadas (O) e reduzida (R) não serão mais função apenas do potencial, não possuindo, portanto um comportamento nerstiano. Neste caso, os termos α (coeficiente de transferência) e K_s (velocidade de transferência de carga) devem ser considerados. Nestas circunstâncias, a equação que descreve a corrente de pico (i_{pc}) é dada por:

$$i_{pc} = (2,99 \times 10^5) n e (\alpha n e)^{\frac{1}{2}} A C_0 D_0^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

Nestes casos, o voltamograma costuma apresentar apenas pico anódico, que irá deslocar-se como aumento da velocidade de varredura. Além disso, este pico varia também com α e K_s . Para uma reação eletródica quase-reversível ($10^{-1} > K_s > 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$) a corrente é controlada tanto pela etapa de transferência de massa como pela etapa de transferência de carga. A equação de Nernst é apenas aproximadamente satisfeita.

A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica está representada na Fig. 14, o potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho estacionário, em uma

solução sem agitação, usando um potencial em forma de triângulo (Fig. 14a). Dependendo da informação desejada, simples ou múltiplos ciclos podem ser utilizados. Durante a varredura do potencial, o potenciostato mede a corrente resultante desta corrente *versus* o potencial aplicado. Em alguns casos, instrumentos digitais não possuem este mesmo padrão de aplicação de potencial. Porém, o potencial é aplicado na forma de escada (*staircase*) como pode ser visto na Fig. 14b, com degraus de potenciais pequenos (da ordem de 10 mV) e tempo de duração pequena (50 ms), onde a corrente é lida apenas no final deste intervalo. Esse método *staircase* substitui a contento a varredura linear. O objetivo desta variação é conseguir uma minimização da contribuição da corrente capacitiva na corrente total. Como as etapas de potencial são pequenas, as equações para as respostas da voltametria cíclica *staircase* são consideradas como idênticas das provenientes da voltametria cíclica de varredura linear.

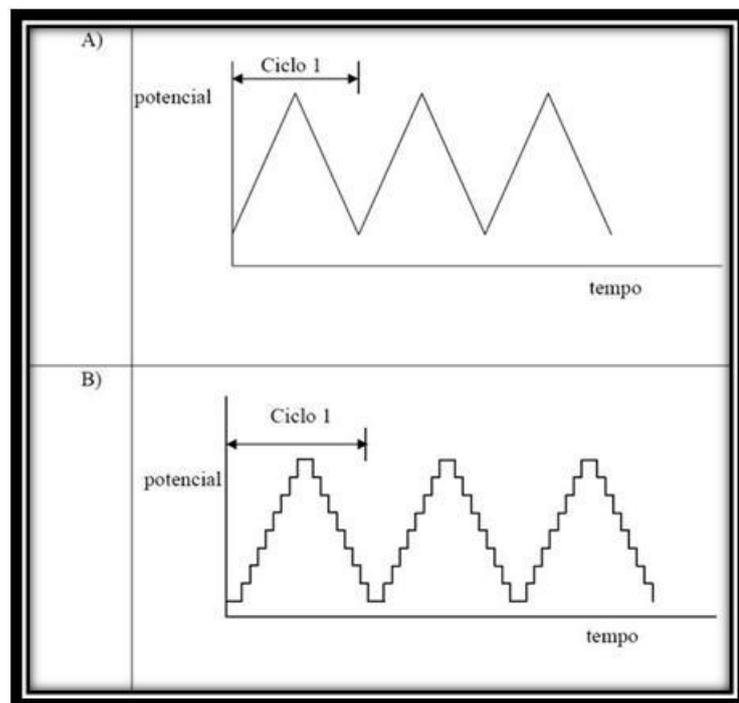


Figura 14. Formas de aplicação do potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada.¹¹²

2. Justificativa

Os fenômenos físico-químicos desencadeados pelas interações intermoleculares entre ligantes e receptores macromoleculares são a chave para o entendimento dos processos biológicos. A determinação experimental de parâmetros adiciona informações a estudos teóricos e experimentais auxiliando na construção de modelos que permitam a elucidação de

mecanismos bioquímicos, função de proteínas, relação entre propriedades de compostos e sua atividade biológica. Com base no conhecimento da interação de determinadas moléculas com uma proteína alvo é possível, por exemplo, desenhar compostos capazes de controlar sua atividade, interrompendo ou estimulando as rotas metabólicas das quais a proteína alvo participa. A albumina tem sido uma das proteínas mais estudadas devido à sua importância biológica.

A transformação de uma matéria-prima vegetal em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do fármaco, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de sua utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. Para garantir esses objetivos, a pesquisa para o desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas envolvendo um processo interdisciplinar, multidisciplinar e interinstitucional.

As xantonas mangiferina e mangiferitina apresentam um amplo espectro de atividades farmacológicas. Para que essas xantonas causem o efeito terapêutico, existe a necessidade dessas xantonas de serem transportadas por proteínas plasmáticas na corrente sanguínea para o seu local de ação. O estudo do mecanismo de ligação e transporte de mangiferina e mangiferitina por proteínas plasmáticas, pode fornecer informações sobre a farmacocinética desses compostos no organismo. Portanto, buscou-se nesse trabalho avaliar a interação de mangiferina e mangiferitina com albumina por métodos espectroscópicos, eletroquímicos e modelagem molecular.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho visou o estudo dos mecanismos de formação do complexo e estabilidade de interação entre as xantonas mangiferina e mangiferitina com soroalbumina bovina.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar o número de sítios de interação e a constante de dissociação de proteínas com ligantes de interesse;

- Determinar as principais forças físico-químicas envolvidas na interação ligante-macromolécula;
- Avaliar efeitos de cooperatividade e adsorção inespecífica na interação do ligante com albumina;
- Avaliar possíveis mudanças conformacionais na macromolécula sob interação com o ligante;
- Estudar os mecanismos de ação envolvidos na interação proteína-ligante;
- Determinar parâmetros cinéticos de transferência de carga entre o ligante e BSA.

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Soroalbumina bovina (pureza 98%) Acros Organics[®], mangiferina (pureza 98%) e mangiferitina (pureza 96%) concedidas pelo Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL-MG, Nujol[®] óleo mineral (pureza 100%).

4.2. Equipamentos

- Sistema de purificação de água contendo deionizador, destilador e ELGA (Purelab maxima);
- Microcomputador PENTIUM IV, Impressora HP Deskjet 950 C series. - estabilizador de equipamento científico de 3 Kva;
- Balança analítica Kern 410 (NY, EUA);
- Potenciostato/Galvanostato PG39CVSM, Ominimetra Instrumentos Científicos Ltda;
- Espectrofotômetro Biochrom Libra S22 integrado a software específico para aquisição de dados;
- Fluorímetro Varian, Cary Eclipse (Austrália);

- Medidor de pH Marte, modelo MB-10.

4.3. Métodos

4.3.1. Espectrofotometria

4.3.1.1. Dosagem de soroalbumina

As proteínas por serem formadas por resíduos de aminoácidos e considerando-se que os aminoácidos aromáticos absorvem luz na região ultravioleta. As proteínas podem ser detectadas através da absorção de luz a 280 nm. A concentração de proteína foi determinada espectrofotometricamente usando $\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}}$ de 6,67 em 279 nm para BSA.¹¹⁶

4.3.1.2. Determinação espectrofotométrica dos fármacos

Para a determinação espectrofotométrica de mangiferina e mangiferitina foram preparadas soluções estoque nas concentrações de 1 mmol.L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,4. A partir de volumes conhecidos da solução estoque foram preparadas diferentes concentrações de 5-90 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 30-150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato para mangiferina e mangiferitina, respectivamente. A determinação das concentrações foram realizadas em 240 nm (MGF) e 235 nm (MGT) para a obtenção da curva analítica e o coeficiente de absorvidade molar seguindo a lei de Beer com 1 cm de caminho óptico, e em cubeta de quartzo.

4.3.1.3. Ensaio de complexação dos fármacos com proteína

O ensaio de complexação foi realizado com diferentes concentrações na faixa de 15-90 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 30-150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ a partir das soluções estoque de MGF e MGT com volume final 3 mL, respectivamente. A solução estoque de soroalbumina bovina 2,48 mmol.L⁻¹ e 93,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foram preparadas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 para complexar com MGF e

MGT, respectivamente. Por varredura espectral foram feitas as leituras das diferentes concentrações de cada fármaco, sendo o branco a solução tampão. Após a varredura foi adicionado 0,1 mL da solução estoque de BSA onde se obteve uma concentração final de 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de BSA nas soluções amostra de MGF e MGT, respectivamente. Cada amostra do ensaio foi misturada por vortex, sendo incubada por 15, 60, 180, 1020, 1440, 1800 minutos e em temperatura ambiente para verificar o melhor tempo de incubação. A varredura espectral após a adição de albumina foi realizada com 0,1 mL de BSA estoque a um volume final de 3,1 mL como branco.

Para a determinação do coeficiente de absorvidade molar do ligante ligado foi realizado um ensaio com a concentração de albumina 100 vezes maior que a concentração de ligante livre.¹¹⁷ A faixa de concentração utilizada de MGF foi de 1- 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com 600 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de BSA. Para MGT faixa de concentração 5 – 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com 1mmol.L⁻¹ de BSA. Posteriormente foi elaborada a curva analítica e determinado o coeficiente de absorvidade do ligante ligado através da lei de Beer com 1 cm de caminho óptico na região do ultravioleta a 245 nm (MGF-BSA) e 240 nm (MGT-BSA).

4.3.1.4. Espectro-diferença da região UV

A partir da varredura espectral de diferentes concentrações de MGF e MGT antes e após a adição de BSA descrito no item 4.3.1.3 foi realizado a espectro-diferença da interação do ligante com a proteína na região do ultravioleta. A absorbância do ligante livre para as várias concentrações foi registrada em 240 e 235 nm e, após a adição de BSA foram registradas as absorbâncias em 245 e 240 nm para MGF e MGT, respectivamente. A variação de absorbância foi obtida através da subtração da absorbância do ligante livre e a absorbância após o ligante ligado (eq. 5).¹¹⁸

$$\Delta A = A_L - A_{LP} = A_L - (A_f + A_b) \quad (5)$$

Onde ΔA é a variação de absorbância, A_L é absorbância de MGF antes da adição de proteína e A_{LP} é a absorbância de MGF após a adição de albumina bovina, A_f é absorbância de ligante não ligado e A_b é absorbância de ligante ligado.

4.3.1.5. Estudo da variação de pH dos complexos

A variação de pH foi realizada preparando soluções de tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ variando o pH em 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. A solução estoque de MGF e MGT 1 mmol.L^{-1} foram preparada em etanol e água (80:20), devido a baixa solubilidade da droga em pH baixo. A soluções estoque de BSA em $2,48 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $93 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi preparada em cada pH do tampão. O preparo das soluções amostras de cada ligante foi realizado por um volume conhecido da solução estoque, e o volume final completado para 3 mL em cada pH da solução tampão a uma concentração final de $80 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $40 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ em seguida foi realizada a varredura espectral das soluções de amostras de MGF e MGT, respectivamente, como o branco soluções de tampão. Em cada tubo contendo amostras de MGF foram adicionados 0,1 mL das soluções estoque de BSA e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Para a varredura espectral das amostras após a adição de BSA, o branco como as soluções de tampão em todos os pH com 0,1 mL de BSA estoque para cada ligante obtendo-se volume final de 3,1 mL.

4.3.1.6. Estudo da variação de força iônica dos complexos

A variação de NaCl foi realizada nas seguintes concentrações: 0; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5 mol.L^{-1} com as soluções preparadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4. As soluções estoque de MGF e MGT 1 mmol.L^{-1} e albumina bovina $2,48 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $93 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ foram preparadas em cada concentração de cloreto de sódio. Com o volume conhecido das soluções estoque de ligantes foram preparados as soluções amostras com concentração final de $80 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (MGF) e $40 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (MGT) em cada concentração de NaCl com volume final de 3 mL da solução. Após a varredura espectral das amostras foram adicionados 0,1 mL de BSA estoque a cada concentração de NaCl e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente, seguindo de varredura espectral.

4.3.1.7. Determinação de parâmetros de interação dos complexos

A partir dos coeficientes de absorvidade do ligante livre e do ligante ligado foi possível encontrar os valores de concentrações do ligante ligado (eq. 6)¹¹⁹ para a construção do gráfico *v versus* Lt, onde é possível obter dados físico-químicos sobre a formação do complexo. O valor de *v* (razão molar de ligante ligado por mols de BSA) pode ser obtido a partir da eq. 7.¹²⁰

$$C_b = \frac{\Delta A}{\Delta \epsilon} \quad (6)$$

$$v = \frac{C_b}{P_t} \quad (7)$$

onde C_b é a concentração de ligante ligado, ΔA variação de absorbância antes e após a adição de albumina, $\Delta \epsilon$ é a variação de absorvidade molar do ligante livre e do ligante ligado, P_t concentração total de BSA e Lt concentração total de ligante.

A partir da eq. 8 um modelo elaborado neste trabalho a partir do sistema de interação adaptado de Paál e colaboradores.¹²¹ O ajuste não linear no gráfico *v versus* Lt foi realizado, os parâmetros de constante de dissociação específica, K_d , constante de associação não específica, K_a , cooperatividade específica, α , cooperatividade não específica, β , número de sítios de ligação, n , foram extraídos do ajuste.

$$v = n \left(\frac{Lt^\alpha}{K_d^\alpha + Lt^\alpha} \right) + (K_a \cdot Lt)^\beta \quad (8)$$

4.3.2. Espectrofluorimetria

4.3.2.1. Ensaio de complexação dos fármacos com proteína

Para a complexação de mangiferina com a proteína foi utilizado uma soluções estoque de MGF $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e albumina $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Para complexação de mangiferitina utilizou-se soluções estoque de MGT $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e albumina $60 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. A partir de volumes conhecidos das soluções de estoque de cada ligante foi montado o ensaio variando a concentração de MGF na faixa de $1\text{-}60 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ e MGT na faixa $3\text{-}10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, fixando a concentração de BSA em $2 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ com volume final de 3,1 mL. O tempo de incubação das

soluções amostra foi de 15 minutos a temperatura ambiente. A intensidade de fluorescência foi medida com excitação de 280 nm¹²² para as soluções amostras sendo utilizado como controle solução de 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de BSA.

4.3.2.2. Determinação de parâmetros de interação dos complexos

A determinação da constante de associação para os complexos de MGF-BSA e MGT-BSA, devido ao comportamento das curvas foram utilizados diferentes equações. Para os ligantes mangiferina e mangiferitina o ajuste dos dados foi obtido com a eq. (9) abaixo:^{123, 124}

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{max} K_a [Lt]}{1 + K_a [Lt]} \quad (9)$$

onde $\Delta F = F_0 - F$, F_0 e F representam as intensidades de BSA antes e após a adição de ligante, respectivamente. ΔF_{max} mudança máxima na intensidade de fluorescência, K_a constante de associação, n número de sítios de ligação e Lt concentração total de ligante.

4.3.2.3. Investigação conformacional

Para o espectro de fluorescência sincronizada o ensaio de interação MGF e MGT com BSA foi realizado da mesma maneira do item 4.3.2.1. A faixa de espectro sincronizada foi de $\Delta\lambda = 15$ nm e $\Delta\lambda = 60$ nm, característicos dos resíduos de tirosina e triptofano de BSA, respectivamente.¹²⁵

4.3.2.4. Determinação da energia de transferência de ressonância

Para a determinação de energia de transferência foi utilizada a distância entre o resíduo de BSA e os ligantes, através sobreposição do espectro de fluorescência de 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de BSA e o espectro de absorvância de MGF 2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e MGT 3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.¹²⁶

4.3.3. Voltametria Cíclica

4.3.3.1. Elaboração e otimização de eletrodo de trabalho

O eletrodo de pasta de carbono foi elaborado utilizando uma seringa de 1 mL, fio de cobre, grafite e Nujol[®]. Uma ponta da seringa foi cortada, polida com lixa e alumina para que ficasse bem lisa e circularmente uniforme. Um pedaço de fio de cobre foi acoplado à borracha do êmbolo da seringa com cola Super Bonder[®] sendo o fio colocado no interior da seringa de modo que uma ponta ficasse vazia com alguns milímetros. A cavidade vazia foi preenchida com a pasta de carbono. Sobre uma folha de papel esfregou-se a ponta do eletrodo com movimentos em oito, inicialmente com força e gradualmente de modo mais suave, a fim de obter uma superfície bem lisa, o excesso da pasta foi retirado antes de utilizar o eletrodo. A renovação da superfície eletrodo foi feita esfregando a superfície do eletrodo sobre uma folha de papel até a obtenção de uma nova superfície bem lisa.

A otimização do eletrodo foi realizada utilizando com 5 mmol.L⁻¹ de ferrocianeto, eletrólito suporte cloreto de potássio 1 mol.L⁻¹, eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência prata/cloreto de prata. A composição da pasta de carbono foi variada na seguinte proporção de grafite e nujol, respectivamente: 70:30, 75:25, 80:20, 85:15 e 90:10, sendo a varredura realizada com 10 ciclos entre a faixa de potencial -0,2 a 0,6 V e taxa de varredura de 50 mV/s. A solução livre de oxigênio foi obtida borbulhando-se argônio através da solução de ferrocianeto por 10 minutos antes do ensaio. A melhor composição da pasta de carbono a ser utilizada foi de 90:10.

4.3.3.2. Determinação voltamétrica de mangiferina

A voltametria cíclica foi realizada com taxa de varredura de 100 mV/s em 3 mL de solução 1 mol.L⁻¹ de MGF em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,4. O voltamograma foi registrado entre a faixa de potencial -0,4 a 0,8 V. A solução livre de oxigênio foi obtida borbulhando-se argônio através da solução, como anteriormente citado.

4.3.3.3. Ensaio de complexação de mangiferina com proteína

Foram preparadas soluções de MGF em triplicata com volume final de 3 mL a partir da solução estoque de 1 mmol.L⁻¹ nas seguintes concentrações: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300 e 400 µmol.L⁻¹. Os voltamogramas cíclicos foram registrados antes e após a adição de 40 µmol.L⁻¹ de BSA com taxa de varredura de 100 mV/s, faixa de

potencial -0,4 a 0,8 V e 10 ciclos. Após a adição de BSA as soluções amostra foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente.

4.3.3.4. Determinação dos parâmetros cinéticos de transferência de carga

Os parâmetros cinéticos foram determinados com soluções de $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MGF antes e após a adição de $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, variando a taxa de varredura de 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 mV.s^{-1} .

4.3.3.5. Estudo de variação de pH

A variação de pH foi realizada preparando soluções de tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ variando o pH entre 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. A solução estoque de MGF 1 mol.L^{-1} foi preparada em etanol e água (80:20) devido a baixa solubilidade da droga em pH baixo. As soluções estoque de BSA $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi preparada em cada pH do tampão fosfato. O preparo da solução amostra de mangiferina foi realizado por um volume conhecido da solução estoque e o volume final completado para 3 mL em cada pH da solução tampão obtendo uma concentração de $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Os voltamogramas cíclicos foram registrados antes e após a adição de $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de BSA com taxa de varredura de 100 mV/s , faixa de potencial -0,4 a 0,8 V e 10 ciclos. Após a adição de BSA as soluções amostra foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente.

4.3.4. Modelagem molecular

Uma vez que a estrutura da BSA não está disponível no Protein Data Bank - PDB, um modelo de homologia foi criado. Uma pesquisa de similiaridade no PDB utilizando o BLAST com a seqüência de soroalbumina bovina [seqüência Swissprot ALBU_BOVIN (P02769)] mostrou que a BSA compartilha uma identidade de 75% com HSA (PDB Code: 1n5u), o que implica que a abordagem de modelagem por homologia pode fornecer uma ótima perspectiva para estudos teóricos envolvendo o modelo homólogo de BSA. A construção do modelo da BSA foi realizada usando o programa MODELLER¹²⁷ e a qualidade estereoquímica do modelo global final para BSA foi avaliada pelo programa PROCHECK.¹²⁸

Os estudos de *docking* molecular foram realizados por meio da suíte Schrödinger, utilizando o programa Induced Fit Docking¹²⁹ para o *docking* molecular entre as proteínas plasmáticas HSA e BSA com as xantonas naturais, mangiferina e mangiferitina. Os ligantes foram construídos e preparados utilizando o software LigPrep 2.2¹³⁰ enquanto as proteínas plasmáticas foram preparadas por meio do software Prime 1.7;¹³¹ posteriormente, os ligantes e a HSA e BSA foram otimizados utilizando o campo de força OPLS 2005 do software MacroModel 9.6¹³² Todos os programas pertencentes a suíte Schrödinger. Maestro 8.5¹³³ foram utilizados com interface gráfica para todos os programas computacionais da suíte Schrödinger. A estrutura cristalográfica da HSA foi obtida do banco de dados Protein Data Bank (PDB ID: 1n5u) com uma resolução de 1,90Å.

4.4. Análise de dados

Os ensaios foram conduzidos a um mínimo de triplicata e os dados apresentados com média e erro padrão da média. A análise estatística dos ajustes lineares, não lineares, testes F, foram conduzidas com o pacote Origin versão 8.0 (Originlab, Northampton, MA, EUA). Foi aceito como significativo $p = 0,5$.

5. Resultados e Discussão

5.1. Espectrofotometria

5.1.1. Absorção espectrofotométrica

A Fig. 15 apresenta os resultados da curva analítica de mangiferina e mangiferitina. Espectrofotometria na região UV-VIS do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas.¹³⁴ Essa técnica analítica é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Sendo assim, o comportamento espectroscópico da Fig. 15 apresentou linearidade frente à lei de Beer para ambos os fármacos ($R^2 = 0,99$).

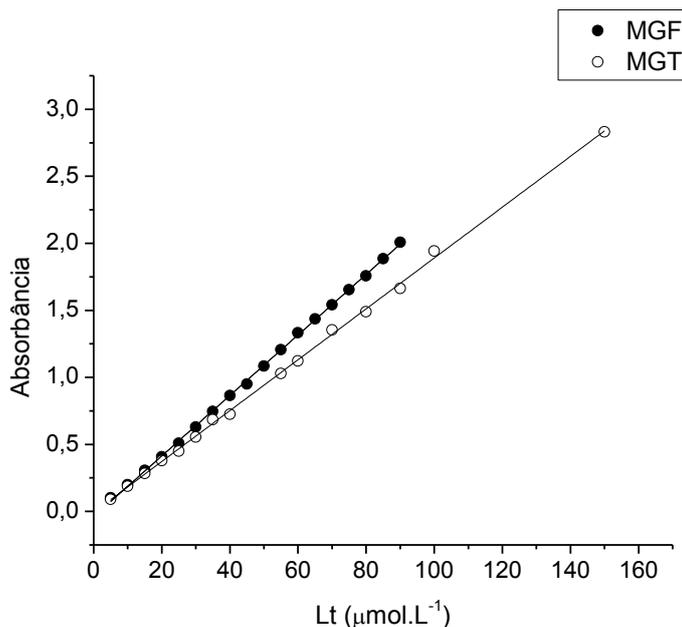


Figura 15. Curva analítica de mangiferina e mangiferitina em tampão fosfato pH = 7,4. Equação de regressão linear $[y = a + bx]$. Parâmetros de regressão $a_{MGF} = 2,260 \pm 0,012 \times 10^4$, $b_{MGF} = -0,040 \pm 0,006$, $a_{MGT} = 1,9 \pm 0,016 \times 10^4$ e $b_{MGT} = -0,007 \pm 0,010$.

5.1.2. Determinação do coeficiente de absorvidade molar

Os coeficientes de absorvidades molares para MGF, MGT livre e para os complexos de MGF-BSA e MGT-BSA foram obtidos através da inclinação da reta do ajuste linear da Fig. 16. O coeficiente de extinção dos ligantes ligados comparados com os ligantes livres é menor. Esse fato pode ser atribuído ao sistema de elétrons do anel aromático da forma básica da xantona que resulta em uma menor deslocalização dos elétrons, a energia necessária para a transição é maior, e a probabilidade de ocorrência dessas transições é menor, devido à formação do complexo.

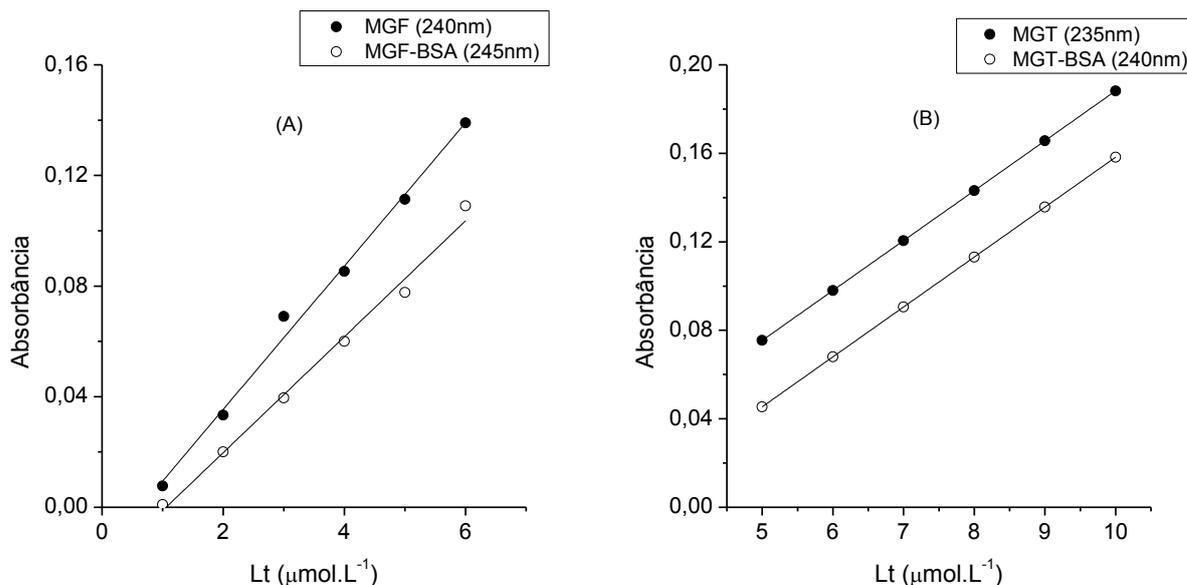


Figura 16. Curva analítica dos ligantes livre e ligados com BSA em tampão fosfato pH = 7,4. (A) Coeficiente de absorvidade de MGF livre e MGF ligado, respectivamente, $\epsilon_{\text{MGF}} = 2,62 \pm 0,03 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{MGF-BSA}} = 2,30 \pm 0,95 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. (B) Coeficiente de absorvidade de MGT livre e MGT ligado, respectivamente, $\epsilon_{\text{MGT}} = 2,26 \pm 0,06 \times 10^4 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{MGT-BSA}} = 1,89 \pm 0,05 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

5.1.3. Espectro-diferença dos complexos

Os espectrofotogramas de mangiferina e mangiferitina em concentrações variadas estão representados à Fig. 17. Os espectros de absorção das substâncias mostram três bandas de absorção, onde a primeira com o comprimento de onda mais intenso de $\lambda_{\text{max}} = 240 \text{ nm}$ pode ser atribuída a energia de transição de orbitais $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel aromático, a segunda em $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ devido a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ pela presença do ciclo β -dicetona e, a terceira em $\lambda_{\text{max}} = 380 \text{ nm}$ atribuída a transferência de carga da absorção intramolecular.⁵²

Na Fig. 17 comparando os espectros dos ligantes na ausência e na presença de BSA, observa-se que ocorre um efeito batocrômico e hipocrômico mais pronunciado na região do ultravioleta para MGF e na região UV-visível para MGT. Esses efeitos demonstram que ocorreu a formação do complexo entre os ligantes e BSA. O efeito batocrômico pode ser atribuído a mudança estrutural da molécula do ligante com interação do receptor. Essa razão do *red-shift* pode estar relacionada ao nível de energia do estado excitado, devido à diminuição do nível de energia do orbital antiligante que ocorre pela atração de interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio, devido aos aminoácidos presente na proteína.¹³⁵ O

efeito hipocrômico sugere que uma quantidade da substância se ligou completamente com a proteína não podendo ser identificado pelo espectro, pois as linhas vermelhas dos espectros da Fig. 17 são o somatório da quantidade de ligante livre e ligante ligado.

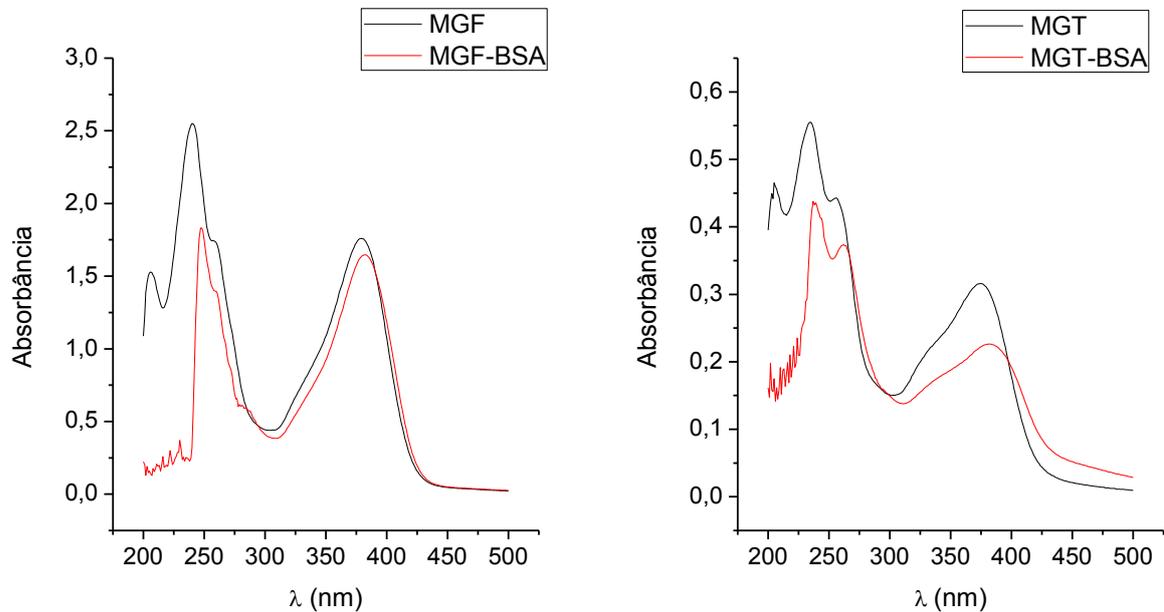


Figura 17. Espectro de absorção eletrônica de mangiferina e mangiferitina na ausência e na presença de BSA em tampão fosfato pH = 7,4.

5.1.4. Teste de estabilidade dos complexos

A Fig. 18 mostra a variação do tempo de incubação testada nos complexos de BSA com os ligantes de mangiferina e mangiferitina na proporção 1:1, respectivamente, pela variação do sinal de absorbância obtido por espectro-diferença. Baseado nesse gráfico observa-se que os valores de ΔA não apresentaram variações significativas com o aumento do tempo de incubação. Isso indica que a constante de associação é estável por longo período de tempo para ambos os complexos de MGF-BSA e MGT-BSA.

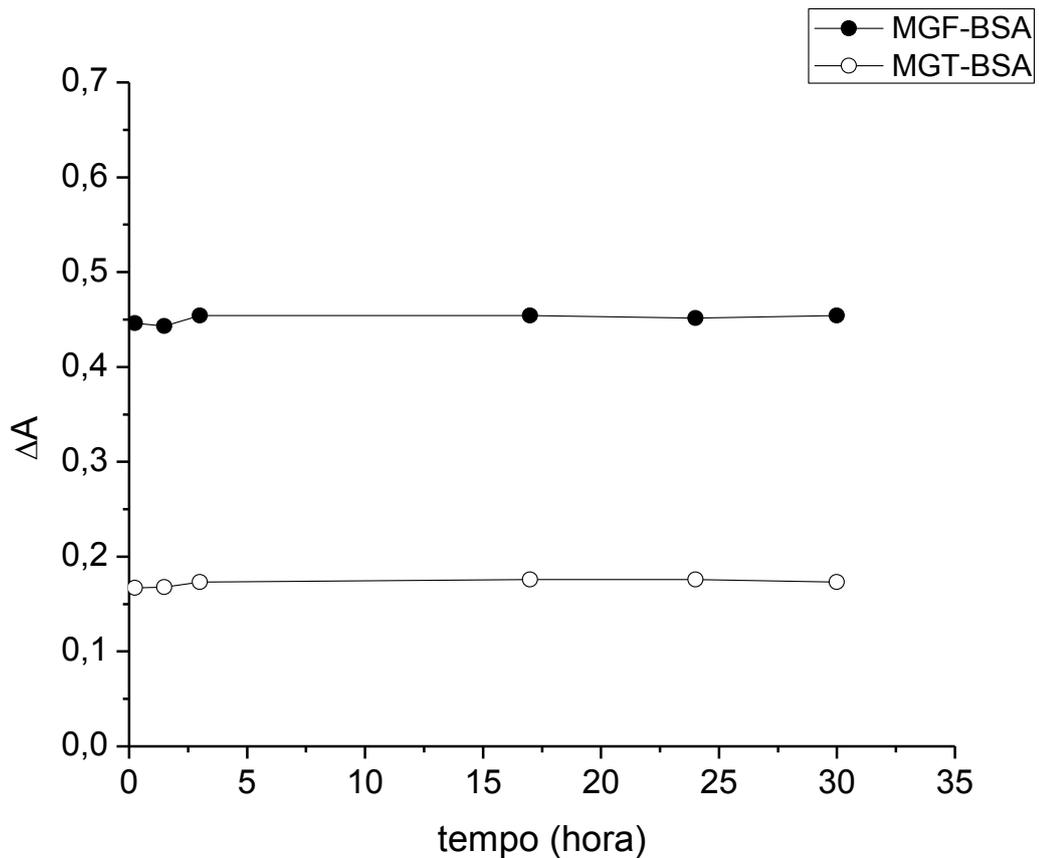


Figura 18. Espectro-diferença em diferentes tempos de incubação para a formação dos complexos em tampão fosfato pH = 7,4.

5.1.5. Efeito de pH e força iônica

A Fig. 19 sugere que ocorre a formação do complexo com as formas protonadas e desprotonadas de mangiferina e mangiferitina. A formação do complexo em meio ácido é pequena para ambos os ligantes, sendo a mangiferina menor do que mangiferitina, uma justificativa para essa diferença pode estar relacionada ao glicosídeo ligado na posição 2C da molécula de MGF (Fig. 2) podendo estar voltado para uma região onde há a presença de resíduos de aminoácidos que estão carregados positivamente ou impedimento estérico impedindo que ocorra uma interação entre eles. Com o aumento do pH a variação de ΔA aumenta na faixa de pH fisiológico para ambos os complexos, com valores entre 7 e 10 unidades, indicando que a constante de associação é maior e os complexos são mais estáveis nessa faixa de pH. Isso sugere um provável envolvimento de interações hidrofóbicas maiores

que as forças eletrostáticas entre a macromolécula e os fármacos em pH acima de 7 unidades, uma vez que a macromolécula e ambos os ligantes estão carregados negativamente.

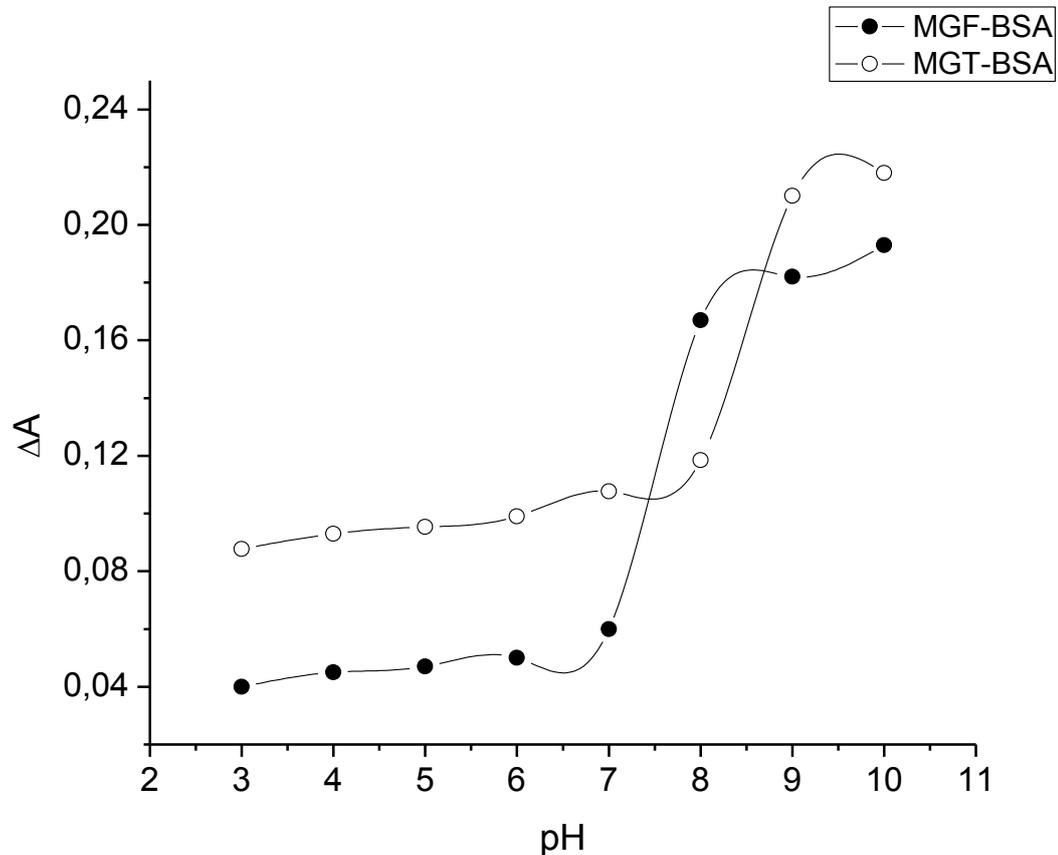


Figura 19. Espectro-diferença do efeito de pH na formação dos complexos.

A Fig. 20 apresenta os resultados da formação dos complexos de MGF-BSA e MGT-BSA com o efeito de força iônica em pH 7,4. Esses resultados revelam que o aumento da força iônica reduziu significativamente a formação de ambos os complexos, sugerindo uma grande presença de forças hidrofóbicas na formação do complexo, sendo assim esses resultados corroboram com os resultado de variação de pH acima. Além das forças hidrofóbicas não podemos descartar as forças eletrostáticas, já que também pode ocorrer uma competição entre os íons da solução de NaCl com os íons das soluções dos ligantes por sítios de interação da proteína, devido a presença de resíduos de aminoácidos carregados com carga positiva ou negativa em pH fisiológico. O aumento no valor de ΔA observado na faixa de grande força iônica para ambos os ligantes pode ter ocorrido por redução na repulsão eletrostática entre esses e a proteína, reforçando o efeito hidrofóbico apresentado na formação dos complexos.

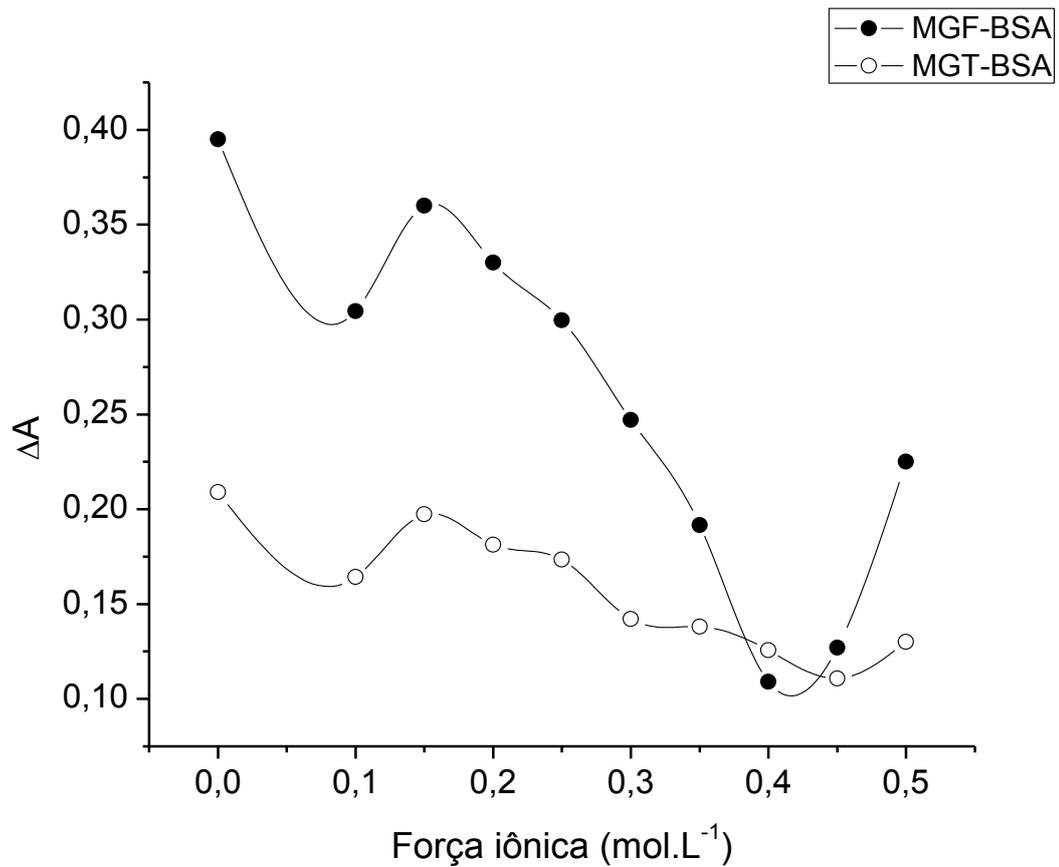


Figura 20. Efeito da força iônica na formação dos complexos em tampão fosfato pH = 7,4.

5.2. Espectrofluorimetria

5.2.1. Análise de fluorescência

As Figuras 21 e 22 mostram os espectros de emissão de fluorescência de BSA na ausência e na presença de MGF e MGT, respectivamente, onde é observado que a BSA apresenta uma forte banda de emissão de fluorescência em 348 nm, enquanto que os ligantes não apresentaram fluorescência intrínseca no comprimento de onda de excitação de 280 nm.

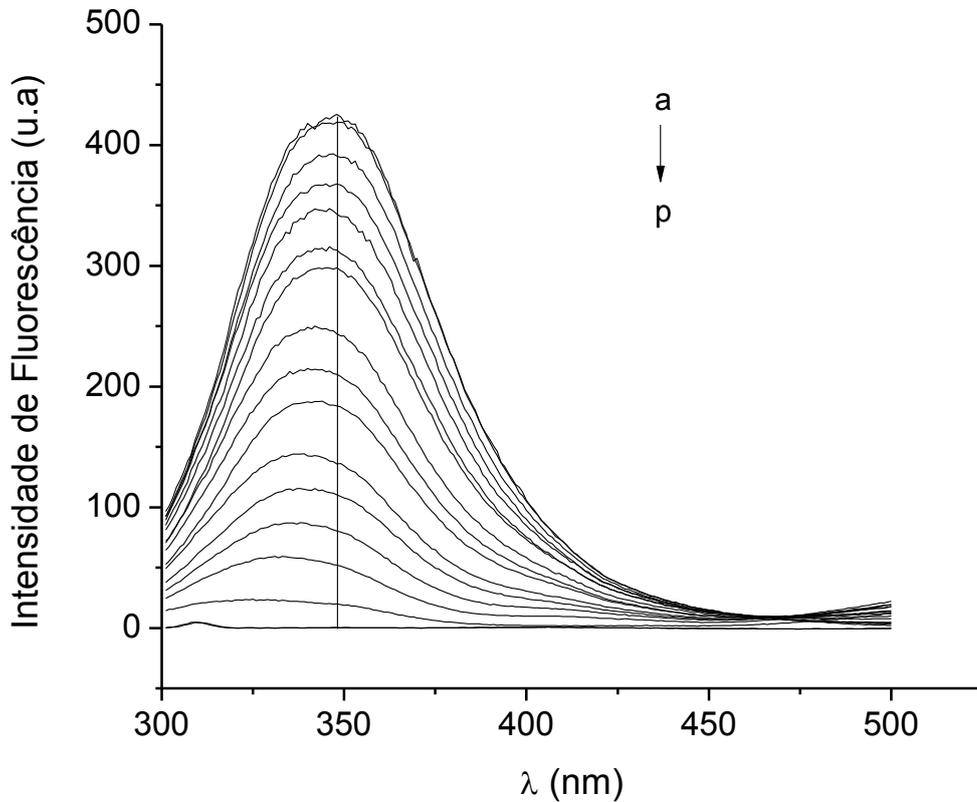


Figura 21. Espectrofluorograma da interação de BSA com MGF. (a) BSA $2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (b) – (o): $0,5\text{-}100,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ MGF em presença de BSA $2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, (p) MGF $2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na ausência de BSA. $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 348 \text{ nm}$

A intensidade de fluorescência de BSA sofreu uma gradual diminuição com o aumento da concentração de ligante. A forte diminuição da intensidade fluorescência indica que ocorre à formação dos complexos para ambos os ligantes com BSA. O *blue-shift* do comprimento de onda de emissão máxima de 348 para 325 nm e 349 para 341 nm da proteína na presença de MGF e MGT, respectivamente, consiste no fato de que ocorreu uma mudança no microambiente ao redor dos resíduos de triptofanos sugerindo um aumento da hidrofobicidade na vizinhança desse resíduo. Isso é bem elucidado pela literatura quando pequenas moléculas se ligam a proteína, podendo induzir a mudanças conformacionais devido às forças intermoleculares envolvidas para manter a estrutura secundária poderem ser alteradas.¹³⁶

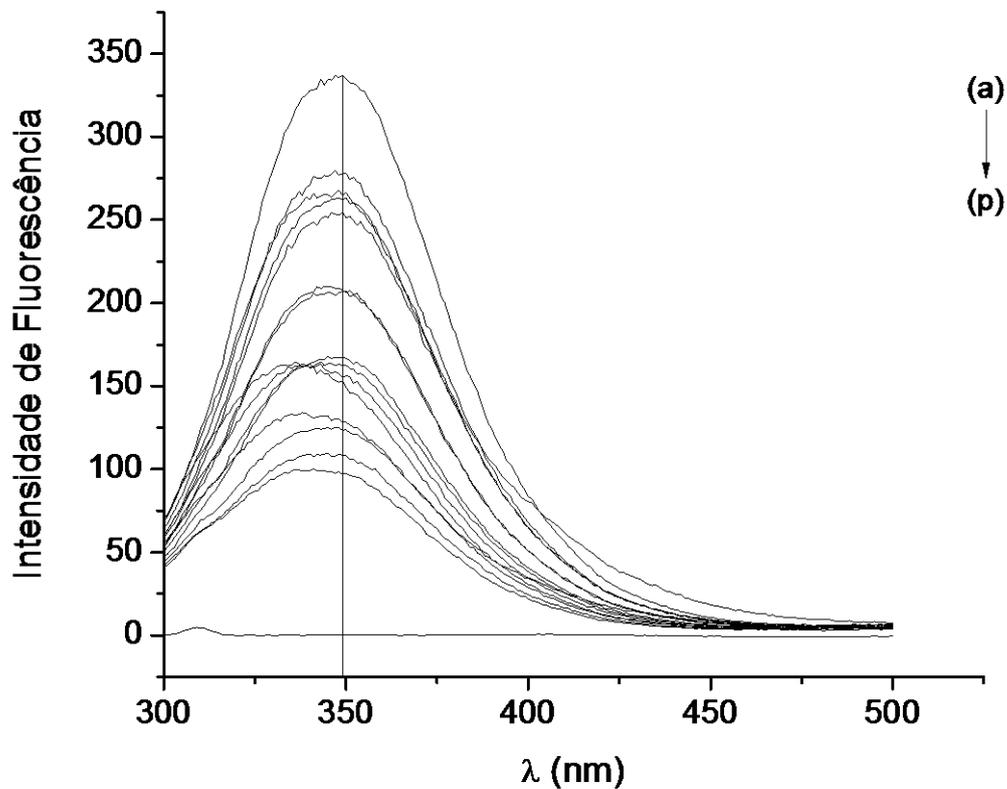


Figura 22. Espectrofluorograma da interação de BSA com MGT. (a) BSA $2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (b) – (o): $3,0 - 10,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ MGT em presença de BSA $2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, (p) MGT $2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na ausência de BSA. $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 349 \text{ nm}$

5.2.2. Mecanismo de supressão da fluorescência de BSA

Para elucidar o mecanismo de supressão de fluorescência analisaram-se os dados por eq. 10 de Stern-Volmer e eq. 11 Stern-Volmer modificado abaixo:¹³⁷

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_p \tau [Lt]) = (1 + K_{sv} [Lt]) \quad (10)$$

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{[Lt]} \cdot \frac{1}{fK} + \frac{1}{f} \quad (11)$$

onde F_0 e F são a intensidade de fluorescência na ausência e presença do supressor, Lt concentração total de ligante, K_{sv} constante de supressão de Stern-Volmer, τ tempo de meia vida da biomolécula na ausência de supressor avaliado em $1 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$,¹³⁷ f fração de

fluorescência inicial que é acessível pelo supressor, K constante de Stern-Volmer modificada, K_p constante da taxa de supressão da proteína.

Para o complexo de MGF-BSA a curva de Stern-Volmer (Fig. 23) segue uma relação linear em baixas concentrações de MGF, mas apresenta uma curva ascendente quando a concentração de MGF é maior que $20,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. O mesmo perfil ocorre para a formação do complexo MGT-BSA (Fig. 23) onde a linearidade ocorre até $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e após um desvio positivo dos dados. Isso sugere que o tipo de mecanismo de supressão em baixas concentrações de MGF é estático indicando que ocorreu a formação do complexo e em concentrações elevadas descreve um mecanismo de supressão combinado sendo estático e dinâmico sugerindo que ocorre a formação do complexo nessas concentrações e a interação da molécula supressora com o estado excitado do fluoróforo. Assim o desvio positivo da curva se deve a presença do ligante em uma mesma gaiola de solvente como os fluoróforos no momento de excitação. Alguns estados excitados são quase que desativados instantaneamente após a formação do complexo, devido às moléculas de ligante aparecer aleatoriamente ao redor das proximidades do fluoróforo de BSA no momento da excitação.

Em estudos prévios da interação de mangiferina com soroalbumina revelam que o mecanismo de supressão é apenas estático.^{138, 139} As condições experimentais apresentadas aqui sugerem que ocorre os mecanismos de supressão estático e combinado para ambas as xantonas estudadas nessas condições experimentais, já que as concentrações experimentais dos estudos anteriores são menores.

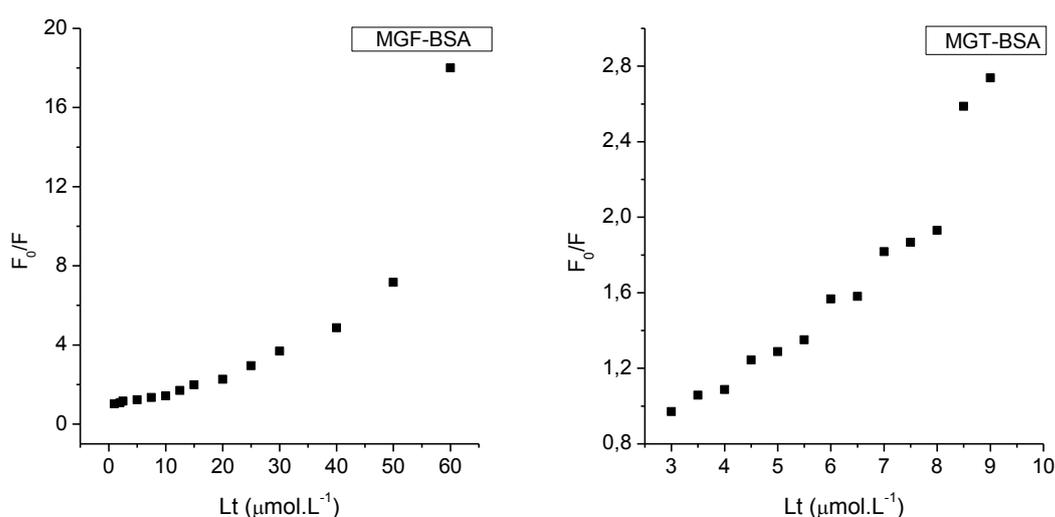


Figura 23. Representação de Stern-Volmer a partir da eq. 10 para a interação de BSA com mangiferina e mangiferitina, respectivamente.

A Fig. 24 consiste na regressão linear (eq. 11) aos dados obtidos de fluorescência de BSA na presença de MGF e MGT, respectivamente.

Tabela 4. Parâmetros da supressão de fluorescência a 298 K. Eq. 11.

| Ligante | K_{sv} (10^4 L.mol $^{-1}$) | K_p (10^{12} L.mol $^{-1}$ s $^{-1}$) | f (%) | R^2 |
|---------|-----------------------------------|---|---------|-------|
| MGF | 3,37 | 3,37 | 98,0 | 0,95 |
| MGT | 6,82 | 6,82 | 45,0 | 0,96 |

A fração do total de fluoróforos excitados de BSA que foi acessada por MGF é cerca de três vezes maior do que MGT, isso sugere que a mangiferitina poderia ser ligar a outros resíduos de aminoácidos além do triptofano fazendo com que esse acesso seja menor. A constante de Stern-Volmer calculada para o complexo de MGT-BSA é maior cerca de duas vezes do o complexo de MGF-BSA indicando que a interação de BSA com o ligante de mangiferitina é mais forte do que com mangiferina. As constantes de K_p encontradas para os complexos são bem maiores do que à constante de supressão de difusão colisonal de $2,0 \times 10^{10}$ Lmol. $^{-1}$ s $^{-1}$,¹⁴⁰ confirmando que ocorre supressão estática no processo de supressão.

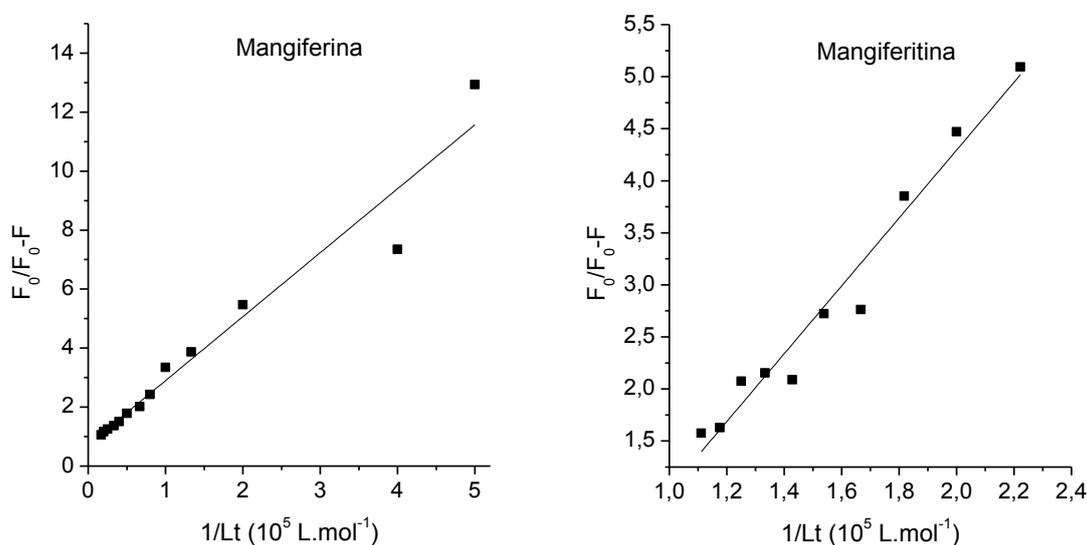


Figura 24. Curva de Stern-Volmer modificado para os complexos de MGF-BSA e MGT-BSA em tampão fosfato pH = 7,4. Parâmetros da regressão (eq.11) linear para mangiferina: inclinação $2,90 \pm 0,145 \times 10^{-5}$, intercepto $1,02 \pm 0,28$; mangiferitina: inclinação $3,26 \pm 0,22 \times 10^{-5}$, intercepto $2,22 \pm 0,35$.

5.2.3. Energia de transferência de ressonância

A fluorescência de energia de transferência de ressonância (FRET) é um método espectroscópico não destrutivo que pode monitorar a proximidade e a orientação angular relativa de fluoróforos. Os fluoróforos doador e receptor podem ser separados ou ligados a mesma macromolécula. Esse fato ocorre quando o espectro de emissão do doador é sobreposto ao espectro de absorvância do receptor. A dependência da taxa de energia de transferência na distância de interação tem sido amplamente utilizada para medir a distância entre o doador e o receptor. Geralmente a distância máxima é entre 7-10 nm.¹⁴¹ À distância a partir do resíduo de triptofano (doador) com a mangiferina ligada (receptor) em BSA pode ser calculada de acordo com a Teoria de Förster.¹⁴² A eficiência da energia de transferência (E) está relacionada com a distância (r) entre o doador e o receptor por:

$$E = \frac{1 - F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (12)$$

Onde r é a distância de interação entre o doador e o receptor, R_0 é a distância crítica onde a eficiência de transferência é 50%.

$$R_0^6 = 8,79 \cdot 10^{-25} \kappa^2 N^{-4} \Phi J \quad (13)$$

Na eq. 13, κ^2 é o fator de orientação entre o dipolo de emissão do doador e o dipolo de absorção do receptor, N é o índice de refração do meio, Φ é o rendimento quântico de fluorescência do doador, J é a integral da área de sobreposição do espectro de emissão do doador e o espectro de absorção do receptor, que pode ser calculado pela equação:

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \Delta\lambda} \quad (14)$$

onde F (λ) é a intensidade fluorescência corrigida do doador na faixa de comprimento de onda λ para $\lambda + \Delta\lambda$ e $\varepsilon(\lambda)$ é o coeficiente de extinção molar do receptor a λ . Com base nestas relações J, E e R_0 podem ser calculados, sendo assim o valor de r também pode ser

calculado.

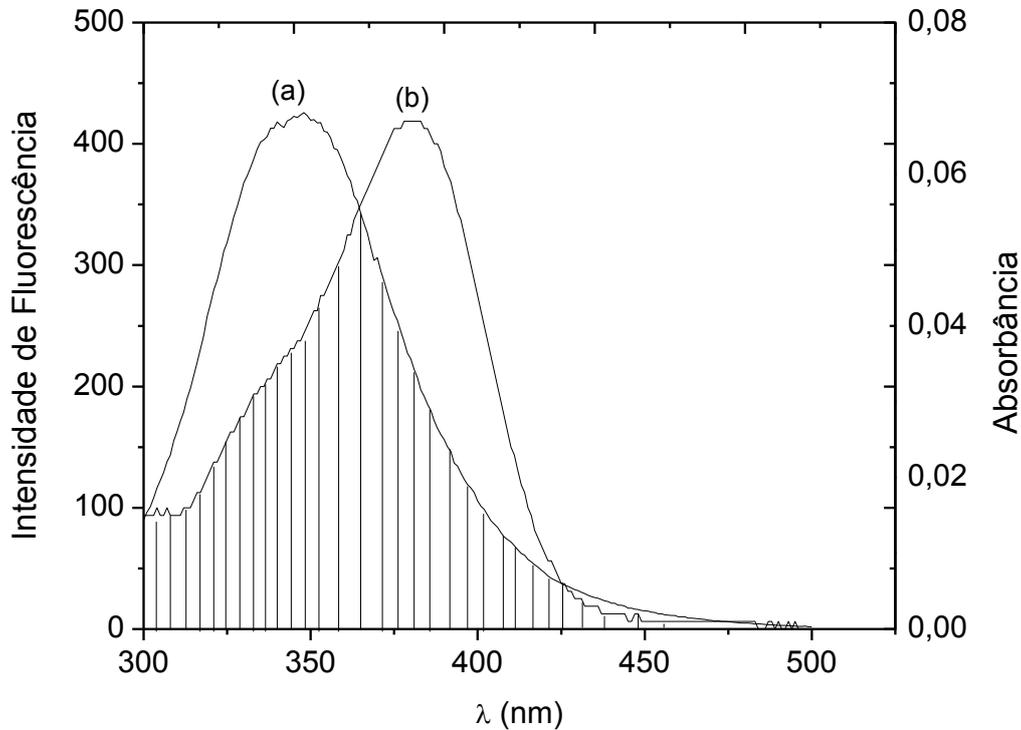


Figura 25. Sobreposição do espectro de emissão de fluorescência de BSA $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (a) ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$) com o espectro de absorção de MGF $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (b).

A sobreposição do espectro de absorbância de mangiferina e mangiferitina com o espectro de emissão de fluorescência de BSA está apresentada nas Fig. 25 e 26, respectivamente. Nesse caso, $\kappa^2 = 2/3$, $N = 1,336$, $\Phi = 0,118$ de acordo com equações acima foi calculado que $R_0 = 3,03 \text{ nm}$; $E = 0,13$ and $r = 2,03 \text{ nm}$ para a interação com mangiferina e $R_0 = 1,43 \text{ nm}$; $E = 0,83$ and $r = 1,76 \text{ nm}$ para a interação com mangiferitina. Para que ocorra o critério do fenômeno de transferência de energia (r) deve ser menor que 8 nm^{126} , isso sugere que o fenômeno ocorreu com alta probabilidade. A BSA apresenta dois resíduos de triptofano: Trp-214 que está localizado em um enovelamento hidrofóbico e o triptofano adicional (Trp-135) que está localizado na superfície da molécula.¹⁴³ Nesse estudo, ambos os ligantes de mangiferina e mangiferitina provavelmente estão ligados a resíduos de Trp-214, principalmente através da interação hidrofóbica de acordo com os resultados de variação de pH e força iônica.

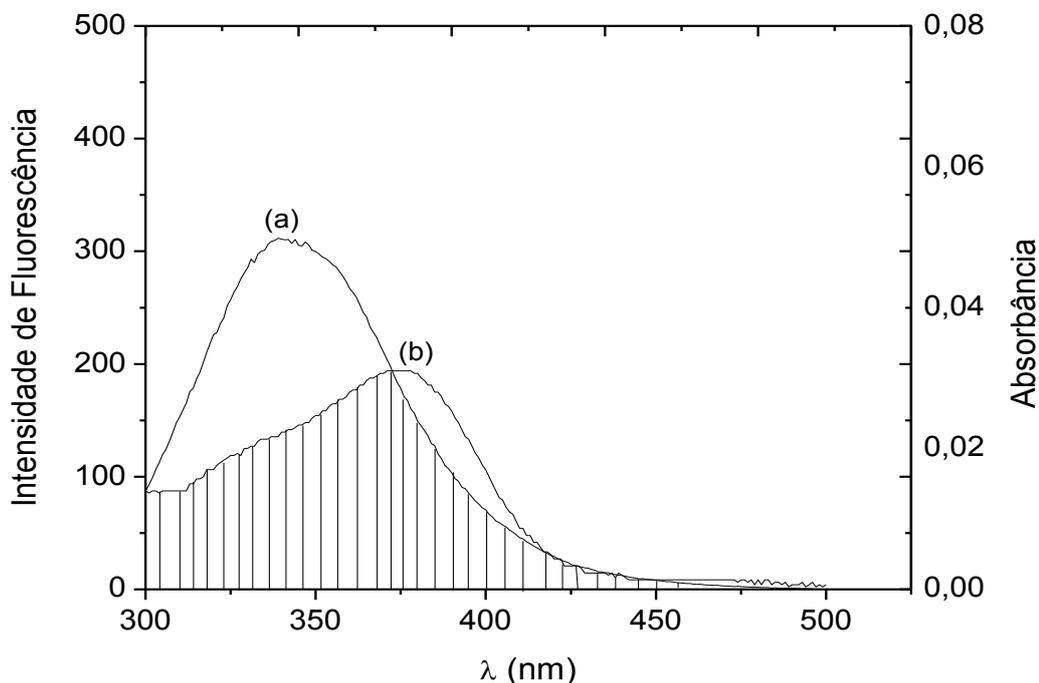


Figura 26. Sobreposição do espectro de emissão de fluorescência de BSA $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (a) ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$) com o espectro de absorção de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ MGT (b).

5.2.4. Investigação conformacional

A fim de investigar uma possível mudança conformacional foi utilizada a espectroscopia de fluorescência sincronizada para a proteína por adição de MGF e MGT apresentados nas Fig. 27 e 28, respectivamente.

Os espectros de fluorescência sincronizada fornecem informações sobre o microambiente molecular em uma vizinhança de moléculas cromóforas,¹⁴⁴ sugerindo um método útil para estudar o ambiente de resíduos de aminoácidos através de medidas de uma possível mudança no comprimento de onda de emissão máxima, λ_{max} , a mudança de posição de emissão máxima corresponde às mudanças de polaridade em torno da molécula cromóforo. Quando o valor da variação de comprimento de onda ($\Delta\lambda$) entre comprimento de onda de excitação e de emissão é estabilizado em 15 ou 60 nm, a fluorescência sincronizada fornece informações características de resíduos de tirosina (Tyr) e triptofano (Trp), respectivamente.¹⁴⁵

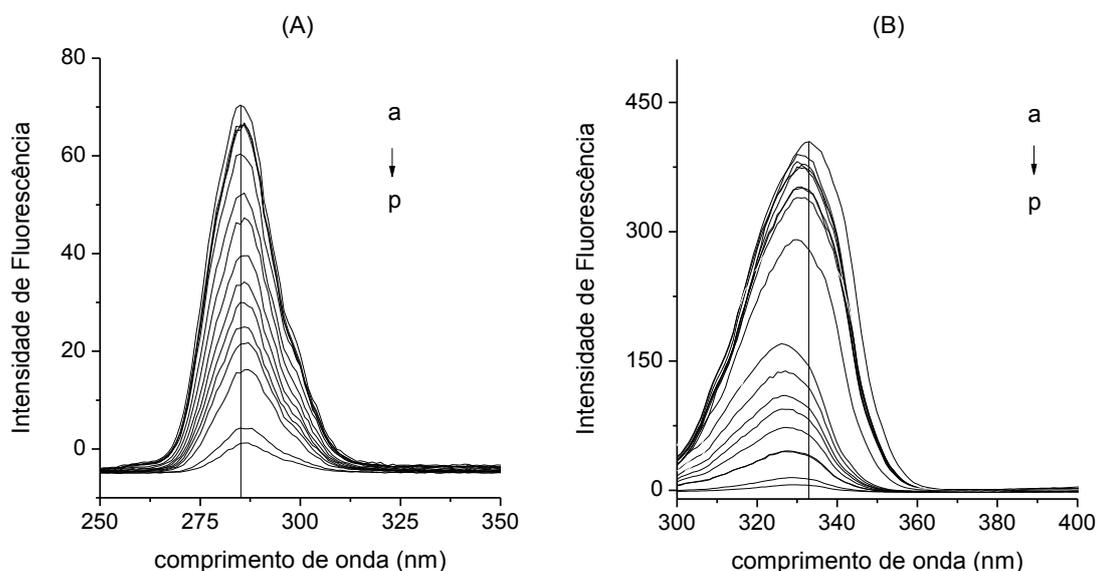


Figura 27. Efeito de MGF no espectro sincronizado de BSA. (a) $C_{BSA} = 2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, (b) - (p): $0,5 - 100,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (A) resíduo tirosina (Tyr) e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (B) resíduo triptofano (Trp).

A partir dos espectros de fluorescência sincronizados foi observado o efeito de cada ligante na intensidade de fluorescência dos resíduos de tirosina (Fig. 27(A) e Fig. 28(A)) e triptofano (Fig. 27(B) e Fig. 28(B)) de BSA, indicaram que ocorre a ligação de ambos os ligantes com BSA, respectivamente. A principal contribuição para a intensidade de fluorescência da proteína resultou dos resíduos de triptofano, uma vez que a intensidade da fluorescência dos resíduos triptofano foi muito mais forte do que para os resíduos de tirosina. Também foi observado na Fig. 27(A) que não houve alteração no comprimento de onda de emissão máxima para os resíduos de tirosina, sugerindo que o ligante de MGF tem pouco efeito sobre o microambiente desses resíduos. Em contrapartida, a Fig. 28(A) apresentou um *blue-shift* da emissão máxima dos resíduos de tirosina, indicando que a ligação da molécula de MGT com BSA está localizada na proximidade desses resíduos. Um *blue-shift* de emissão máxima para os resíduos de triptofano também é observado na Fig. 27(B) e Fig. 28(B), sugerindo que os complexos de MGF-BSA e MGT-BSA alteram o microambiente do resíduo para uma região mais hidrofóbica.¹⁴⁶ A conformação de BSA então é assim mudada com a interação de MGF e MGT, respectivamente, sendo maior para a interação de mangiferitina do que para mangiferina, pois foi observado alteração para os resíduos de Tyr e Trp.

Os resultados encontrados nesse estudo para a interação de MGF com BSA foram semelhantes aos resultados encontrados na literatura para o mesmo estudo.¹³⁸

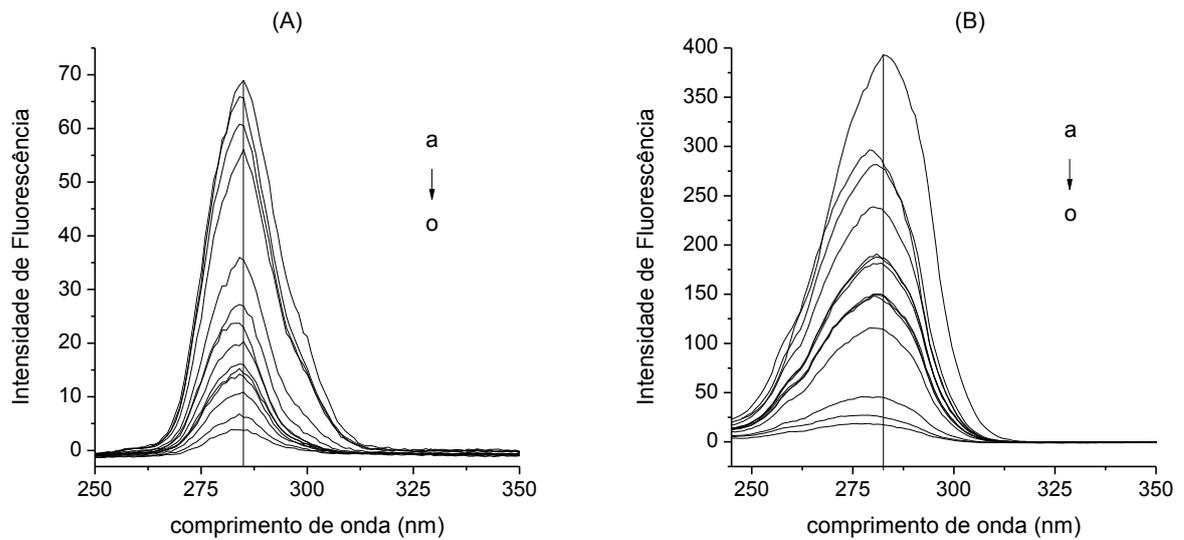


Figura 28. Efeito de MGT no espectro sincronizado de BSA. (a) $C_{BSA} = 2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, (b) - (o): $3,0 - 9,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (A) resíduo tirosina (Tyr) e $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (B) resíduo triptofano (Trp).

5.3. Voltametria Cíclica

5.3.1. Comportamento eletroquímico de mangiferina

A Fig. 29 apresenta o voltamograma cíclico de mangiferina em eletrodo de pasta de carbono não modificado. A mangiferina apresentou um único pico oxidação em pH 7,4. Nestas condições experimentais e com velocidade de varredura de 100 mV.s^{-1} esse pico registrou potencial (E_{p_a}) igual a 289 mV. Além disso, a ausência de registro de pico no sentido reverso da varredura é indicação de um mecanismo de transferência de elétrons por processo irreversível.^{147, 148, 149}

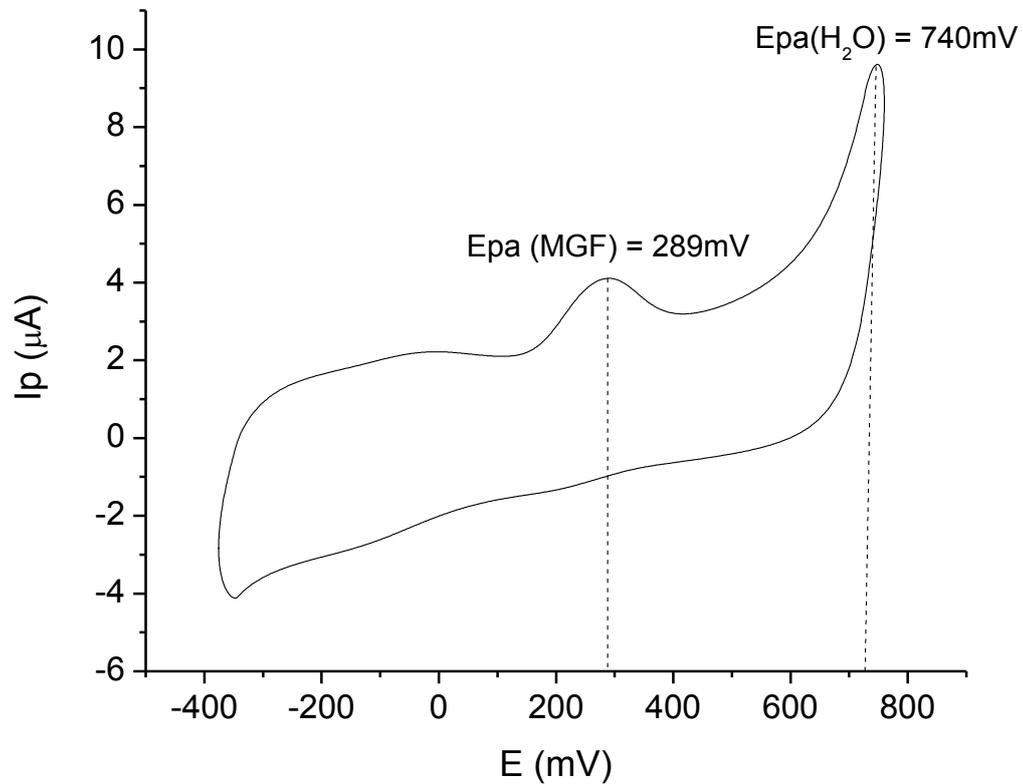


Figura 29. Voltamograma cíclico de $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ mangiferina em eletrodo EPC. Velocidade de varredura 100mV.s^{-1} , eletrólito tampão fosfato $\text{pH} = 7,4$.

5.3.2. Efeito da velocidade de varredura

O voltamograma cíclico de mangiferina da Fig. 30 com diversos valores de taxa de varredura revelam um deslocamento observado no potencial de pico anódico para valores mais positivos com o aumento da velocidade de varredura.

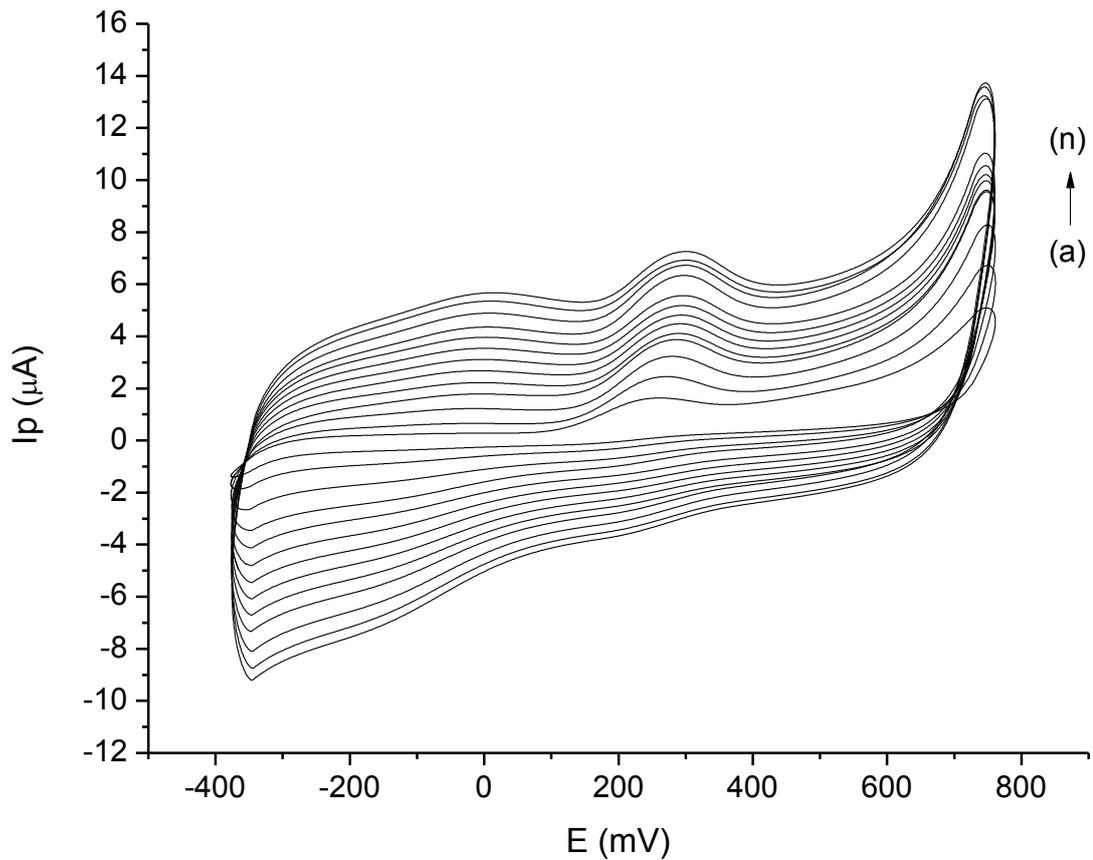


Figura 30. Voltamograma cíclico de mangiferina ($40 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em potencial de taxa de varredura. (a) - (n): $10 - 300 \text{ mV.s}^{-1}$.

O resultado na Fig. 31 mostra que o pico de oxidação aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade no intervalo de 10 a 300 mV.s^{-1} com um coeficiente de correlação de $0,98$, indicando que o processo é controlado por difusão, o que também é reforçado pela intersecção da reta extrapolada à origem.

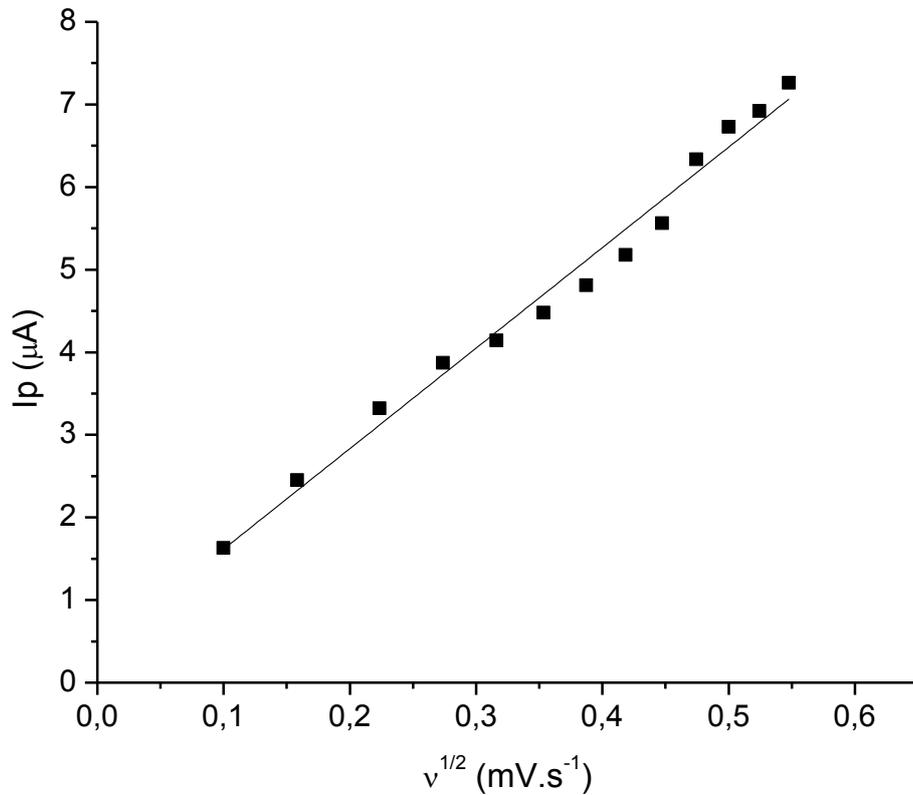


Figura 31. Efeito da intensidade de corrente de pico pela variação da taxa de velocidade de varredura de MGF $40\mu\text{mol.L}^{-1}$ em eletrodo de pasta de carbono e tampão fosfato $\text{pH} = 7,4$ como eletrólito.

Outro teste também foi realizado para verificar se o processo que ocorre na superfície do eletrodo é difusional ou adsorptivo está representado à Fig. 32. O resultado da inclinação de $0,43 \pm 0,01$ do ajuste também sugere que o processo foi difusional, pois é reportado na literatura um valor da inclinação próximo de 0,5 para processos difusionais e de uma unidade para processos de adsorção.¹⁵⁰

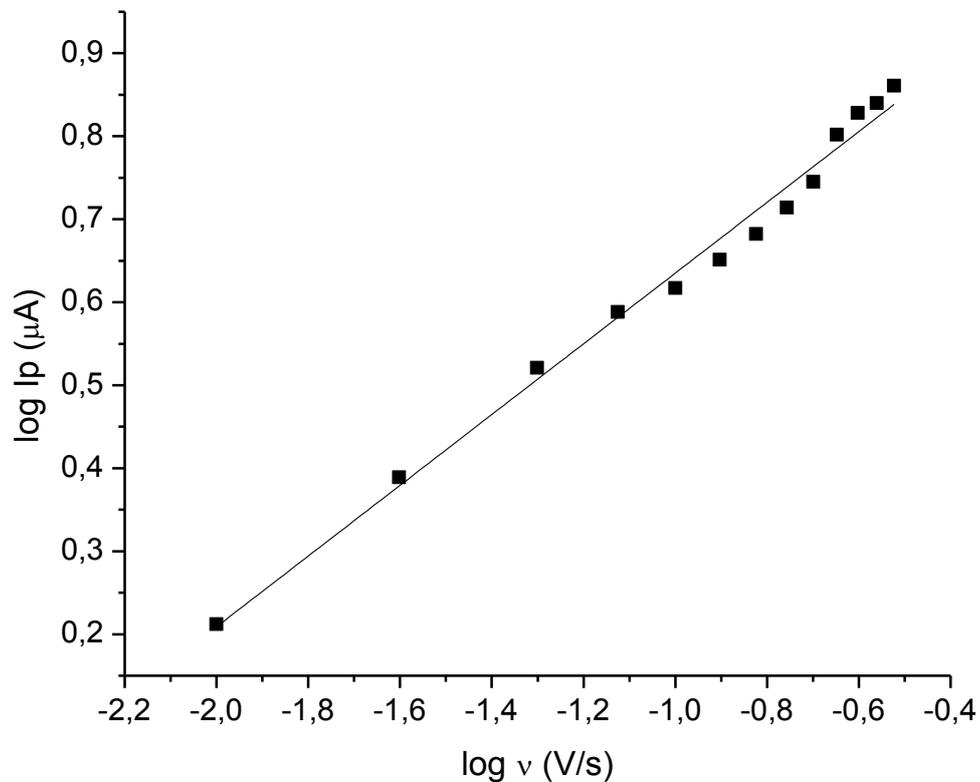


Figura 32. Teste para processo controlado por difusão ou adsorção para mangiferina $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

5.3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de transferência de carga

A Fig. 30 indica que a reação de MGF com o eletrodo é um processo irreversível na superfície do eletrodo. A fim de avaliar a influência da cinética da transferência de elétrons no comportamento voltamétrico do complexo MGF-BSA, os parâmetros cinéticos de eletrocatalise foram determinados a partir de Laviron (eq. 15) e Tafel (eq. 16).^{151, 152}

$$E_p = E^{0'} + \frac{2,303RT}{\alpha nF} \log \frac{RTK_s}{\alpha nF} + \frac{2,303RT}{\alpha nF} \log v \quad (15)$$

$$E_p = \frac{b}{2} \log v + \text{constant} \quad (16)$$

$$b = \frac{2,3RT}{\alpha nF} \quad (17)$$

onde n é o número de elétrons transferidos, v taxa de velocidade de varredura, $E^{0'}$ potencial formal de oxidação, α coeficiente de transferência de carga, K_s velocidade de transferência de carga. De acordo com a Fig. 33 (E_p versus v) o valor de $E^{0'}$ pode ser obtido pela eq. 15 a partir do intercepto da curva pela extrapolação de eixo vertical quando v for igual a zero.

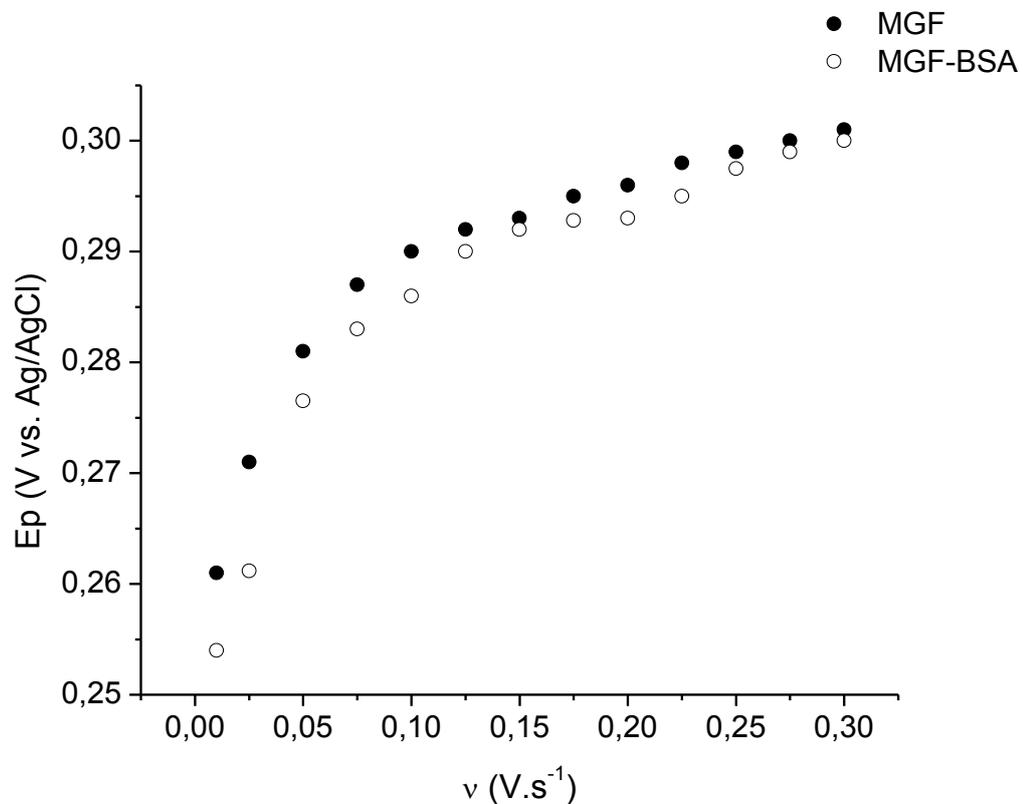


Figura 33. Dependência do potencial de pico E_p com a taxa de velocidade de varredura v : (●) MGF $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (○) MGF $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na presença de BSA $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,4.

A Fig. 34 apresenta a linearização dos dados obtidos por voltametria cíclica. Através da eq. 16 e 17, αn pode ser facilmente determinado pela inclinação da curva. O parâmetro de K_s foi determinado substituindo αn na eq. 15.

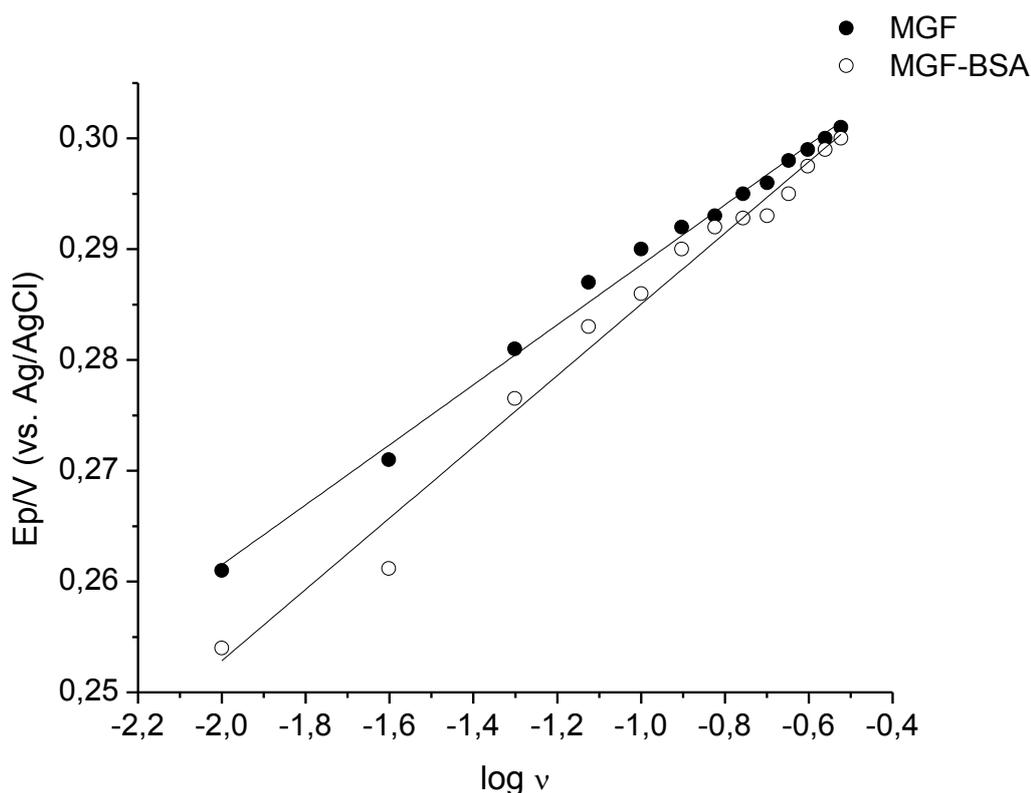


Figura 34. Dependência do potencial de pico E_p com logaritmo da taxa de velocidade de varredura $\log v$: (●) MGF $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (○) MGF $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na presença de BSA $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,4. Parâmetros da regressão linear (eq. 16) MGF: inclinação $2,70 \pm 0,06 \times 10^{-2}$, intercepto $3,160 \pm 0,006 \times 10^{-1}$, $R^2 = 0,99$; MGF-BSA: inclinação $3,22 \pm 0,121 \times 10^{-2}$, intercepto $3,170 \pm 0,013 \times 10^{-1}$, $R^2 = 0,98$.

A Tab. 5 sumariza os parâmetros encontrados. O potencial de oxidação formal ($E^{0'}$) para MGF diminuiu quando o complexo foi formado, indicando uma estabilização do complexo com a forma oxidada do ligante.¹⁵³ O valor αn um parâmetro que reflete irreversibilidade da reação. O coeficiente de transferência de carga mede a fração do potencial interfacial em uma interface eletrodo-eletrólito para a redução da barreira de energia livre na reação, assumindo α igual a 0,5 em um processo de eletrodo totalmente irreversível,¹⁵¹ o número de elétrons envolvidos na reação é igual a 2, de acordo com os valores da Tab. 5. A constante da velocidade de transferência de carga indica a facilidade cinética da reação de oxidação. Para os valores de K_s obtidos sugerem que a cinética é lenta e maior será o tempo para restabelecer o equilíbrio, já que o tipo e a complexidade das moléculas submetidas à

transferência de elétrons, e o rearranjo molecular que pode ocorrer após a transferência de elétrons estão dentre os fatores que determinam a magnitude de K_s .¹⁵² Comparando os parâmetros de cinética de transferência de elétrons entre MGF livre e MGF ligada com a proteína não houve diferença significativa que alterasse o processo da reação de oxidação de mangiferina, conforme reportado por Wu et al.¹⁵¹

Tabela 5. Comparação dos parâmetros cinéticos de mangiferina na ausência e na presença de BSA. Equação 15 e 16.

| Parâmetros | MGF | MGF-BSA |
|--------------------------|------------------------|------------------------|
| $E^{0'}$ (V) | 0,264 | 0,248 |
| αn | 1,09 | 0,92 |
| K_s (s ⁻¹) | 1,50 x 10 ³ | 1,91 x 10 ³ |

5.3.4. Efeito da variação de pH

A eletrooxidação de mangiferina também foi estudada pela variação de pH na faixa de 3-10 em tampão fosfato por voltametria cíclica com taxa de varredura de 100 mV.s⁻¹. Os resultados experimentais apresentados na Fig. 35 mostram um comportamento linear com coeficiente de correlação de 0,98 e 0,99, inclinação de -0,066 e -0,064 para mangiferina livre e ligada com BSA, respectivamente. A diminuição do potencial de pico de oxidação com o aumento do pH indica que o processo de oxidação é facilitado em pH mais elevado. Os valores da inclinação obtida se aproximam do teórico de -0,059V/pH, sugerindo que a reação ocorre com igual número de elétrons e prótons.¹⁵⁴

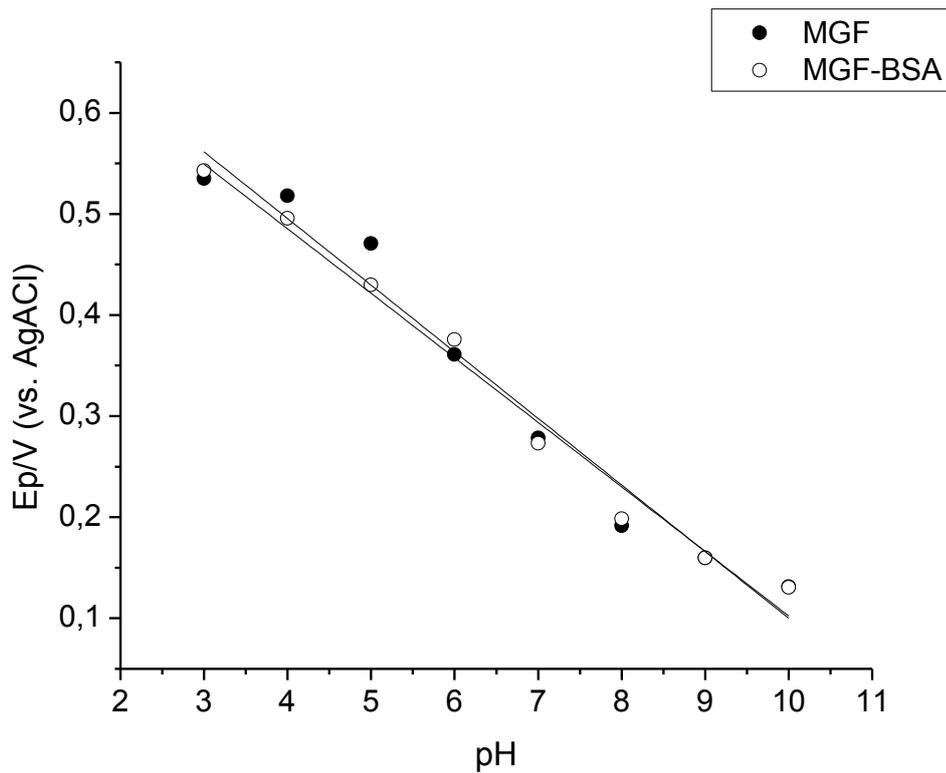


Figura 35. Efeito da variação de pH com MGF na ausência e na presença de BSA. (●) MGF $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (○) MGF $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na presença de BSA $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Potencial de taxa de velocidade de varredura 100 mV.s^{-1} , eletrólito suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$.

5.3.5. Comparação entre resultados metodológicos

A Fig. 36 apresenta os resultados da formação do complexo obtidos por voltametria cíclica (curva a), contrastados com os de espectrofotometria (curva b). É interessante observar a sobreposição qualitativa do perfil obtido pelos diferentes métodos, reforçando a complexidade do modelo elaborado a partir da eq. 8.

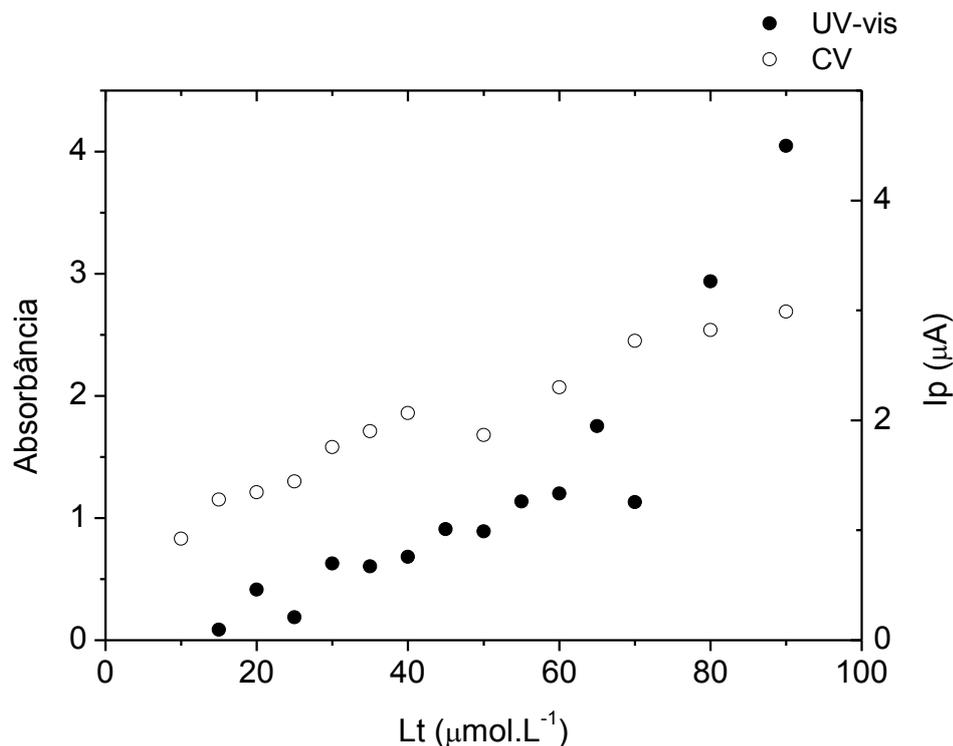


Figura 36. Isotherma de interação MGF com BSA. Curva (○) resultados obtidos por voltametria, curva (●) resultados obtidos por espectrofotometria.

5.4. Modelagem molecular

A ferramenta de *docking* molecular, Induced Fit Docking (Schrodinger Inc. E.U.A.) software foi utilizado para estudos de *docking* dos ligantes com as proteínas HSA e BSA. Induced Fit Docking é um dos programas de ancoramento mais preciso e disponíveis que leva em consideração não só a flexibilidade do ligante, mas também do receptor durante o processo de *docking* molecular. A afinidade de ligação de cada complexo foi criado através GlideScore.

5.4.1. Mangiferina

As Figuras 37 e 38 mostram os melhores resultados do *docking* molecular para os complexos de MGF-HSA e MGF-BSA com os diversos resíduos que compõem os sítios de interação das proteínas HSA e BSA, respectivamente. Detectou-se uma correlação considerável entre os dados experimentais e teóricos. O valor da energia livre de Gibbs

(GlideScore) para o complexo MGF-HSA foi $-30,66 \text{ kJ.mol}^{-1}$ que não está tão próximo do dado experimental de $-26,02 \text{ kJ.mol}^{-1}$.¹³⁸ Embora o complexo MGF-BSA com energia livre de Gibbs de $-27,44 \text{ kJ.mol}^{-1}$ esteja mais próximo dos valores experimentais obtidos por UV-vis - $26,14 \text{ kJ.mol}^{-1}$, fluorescência $-25,68 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e voltametria cíclica $-25,58 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

A proteína de soroalbumina humana possui três domínios, I (resíduos 1-195), II (resíduos 196-383) e III (resíduos 384-585), cada domínio tem dois subdomínios A e B. A interação de MGF com a proteína plasmática foi localizada dentro da cavidade hidrofóbica no subdomínio IIA. Isso é relevante em consideração com as interações entre o ligante e o receptor (HSA e BSA). No que diz respeito à interação do complexo MGF-HSA podemos destacar as interações de empilhamento- π com a forma básica da xantona (anel aromático) estabelecida com o resíduo aromático de tirosina 150. Também ocorrem interações de Van Der Waals (vdw) que são determinantes para estabilizar o complexo MGF-HSA com 195 interações wdv. Esses resultados sugerem que a interação entre mangiferina com HSA é constituída de caráter hidrofóbico. No entanto, a interação do complexo MGF-HSA é constituída também de ligações de hidrogênio tais como, Glu292 com 3O e 2'O, Ser192 com 6'O, Lys195 com 3'O, Gln196 com 7O, além disso, há resíduos polares e hidrofílicos que estabelecem interações dipolo importantes com o ligante, contribuindo para sua estabilização.

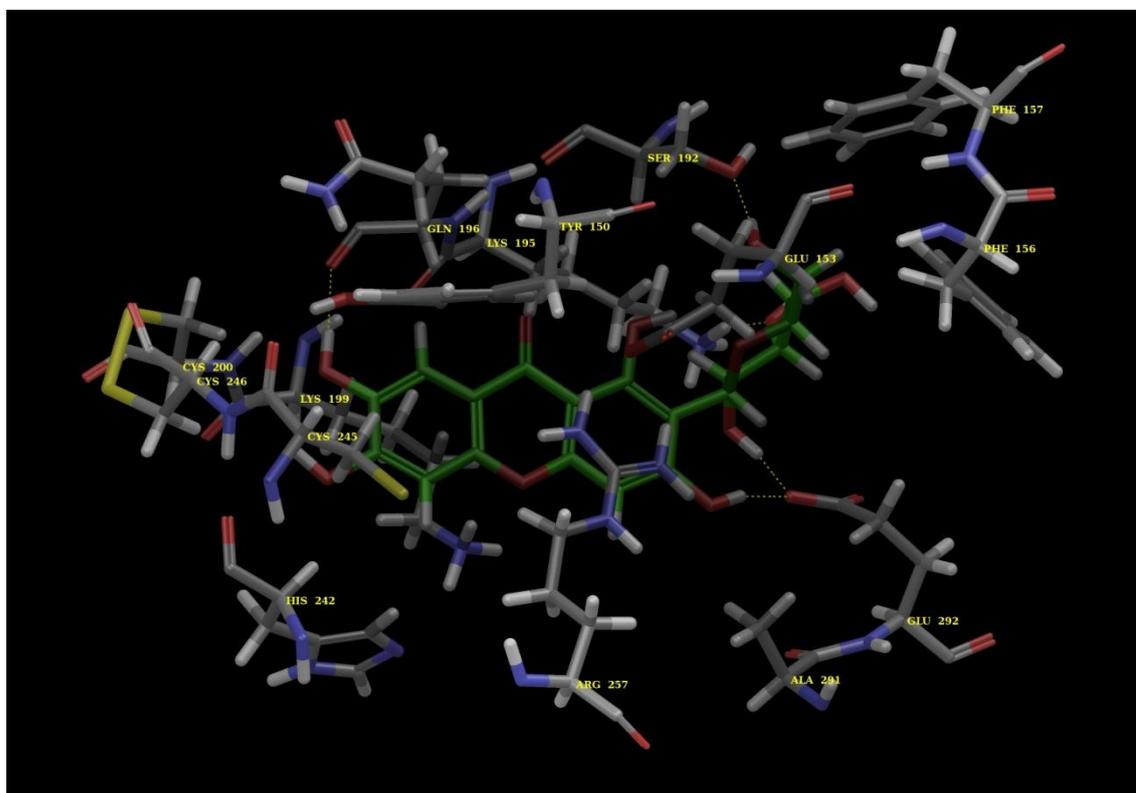


Figura 37. Interação entre MGF com HSA em menor energia de Gibbs. Somente os resíduos do sítio ativo que participam das interações de vdws e ligações de hidrogênio são exibidos. Os resíduos de HSA são representados por modelo em vara de cor cinza, e a estrutura mangiferina é representada em verde. Os resíduos formando H-ligação com o mangiferina no complexo HSA foi estabelecido por uma linha tracejada amarela.

Em relação ao complexo MGF-BSA não foi encontrado interações de empilhamento- π com resíduos aromáticos. Para as interações de vdw de MGF com BSA foram encontradas 237 interações, quais os contatos de vdw são maiores com BSA do que com HSA. As ligações de hidrogênio entre o complexo MGF-BSA (Ile313 com 7O e 6O, His265 com 1O, Arg218 com 2'O, Ser225 com 4'O, Trp237 com 3O, Lys245 com 7O) não coincidem com as encontradas para o complexo MGF-HSA. Uma possível explicação para essas diferenças pode ser fato de alguns resíduos importantes do sítio de interação de HSA estarem em posições diferentes no modelo homólogo de BSA, o que poderia ter influenciado na interação de MGF-BSA, implicando em pequenas diferenças entre as interações de MGF-BSA e MGF-HSA.

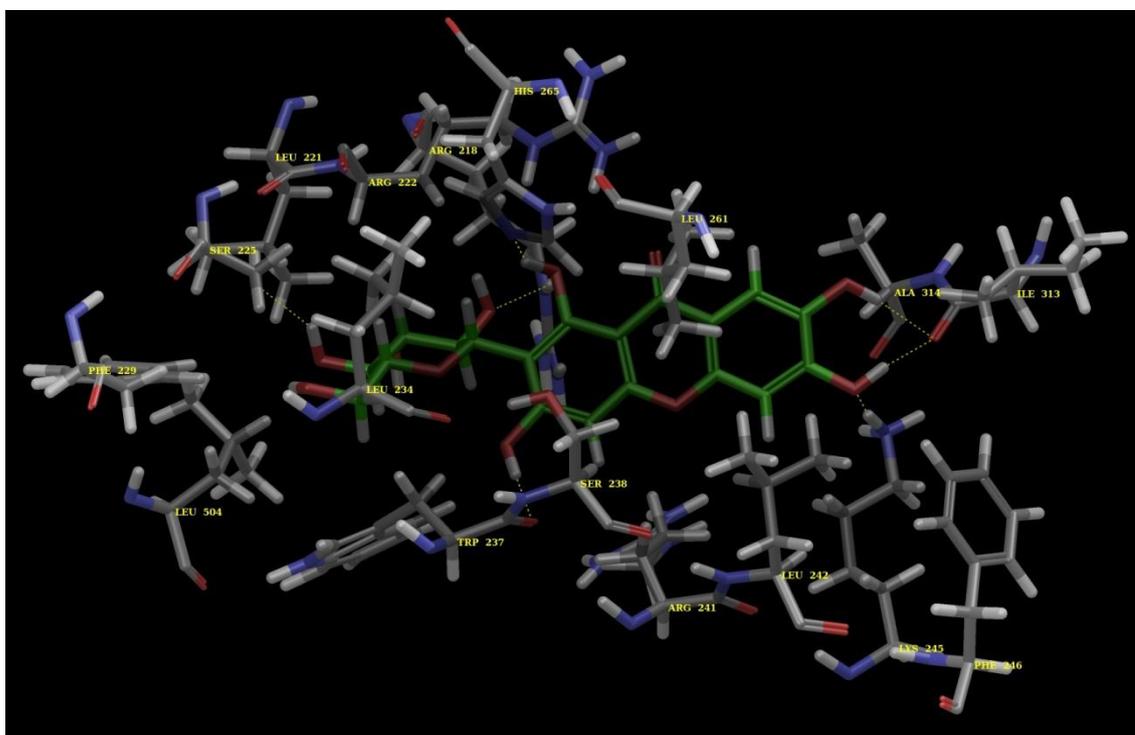


Figura 38. Interação entre MGF com BSA em menor energia de Gibbs. Somente os resíduos do sítio ativo que participam das interações de vdws e ligações de hidrogênio são exibidos. Os resíduos de BSA são representados por modelo em vara de cor cinza, e a estrutura

mangiferina é representada em verde. Os resíduos formando H-ligação com o mangiferina no complexo BSA foi estabelecido por uma linha tracejada amarela.

5.4.2. Mangiferitina

O melhor resultado do *docking* molecular para os complexos MGT-HSA e MGT-BSA estão apresentados nas Figuras 39 e 40 com os vários resíduos que compõe o sítio ativo das proteínas HSA e BSA, respectivamente. Detectou-se uma correlação considerável entre o dado experimental (*in vitro*) e os dados teóricos (*in silico*). A energia livre de Gibbs de ligação calculada (GlideScore) para o sistema MGT-BSA foi: $-29,49 \text{ kJ.mol}^{-1}$ (*in silico*), o qual foi muito próximo dos valores experimentais encontrados pelas técnicas de UV-vis de $-26,41 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e fluorescência de $-28,17 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Para o complexo MGT-HSA o valor da energia livre de Gibbs de ligação calculada *in silico* (GlideScore) foi de $-31,16 \text{ kJ.mol}^{-1}$ (*in silico*).

Assim como no *docking* molecular de mangiferina com HSA e BSA, o fármaco mangiferitina ancorou na cavidade hidrofóbica do subdomínio IIA. Em relação às principais interações estabelecidas entre a xantona em questão e a albumina plasmática BSA, que possuem um papel chave no processo de ancoragem molecular, podemos destacar que a molécula de mangiferitina estabelece 170 interações de Van der Waals (vdw) com BSA, sugerindo assim como ocorreu no caso do complexo MGF-BSA, que a interação entre o MGT e BSA é predominantemente constituída de caráter hidrofóbico. Não obstante, a interação entre mangiferitina e BSA não é apenas constituído por interações hidrofóbicas, mas também aparecem algumas ligações de hidrogênio, tais como: Arg280 com 9O e 1O e Arg222 com 6O. Além disso, existem outros resíduos polares e hidrofílicos, que estabelecem importantes interações do tipo dipolo com mangiferitina, contribuindo também para sua estabilização (conforme ocorreu com o sistema MGF-BSA).

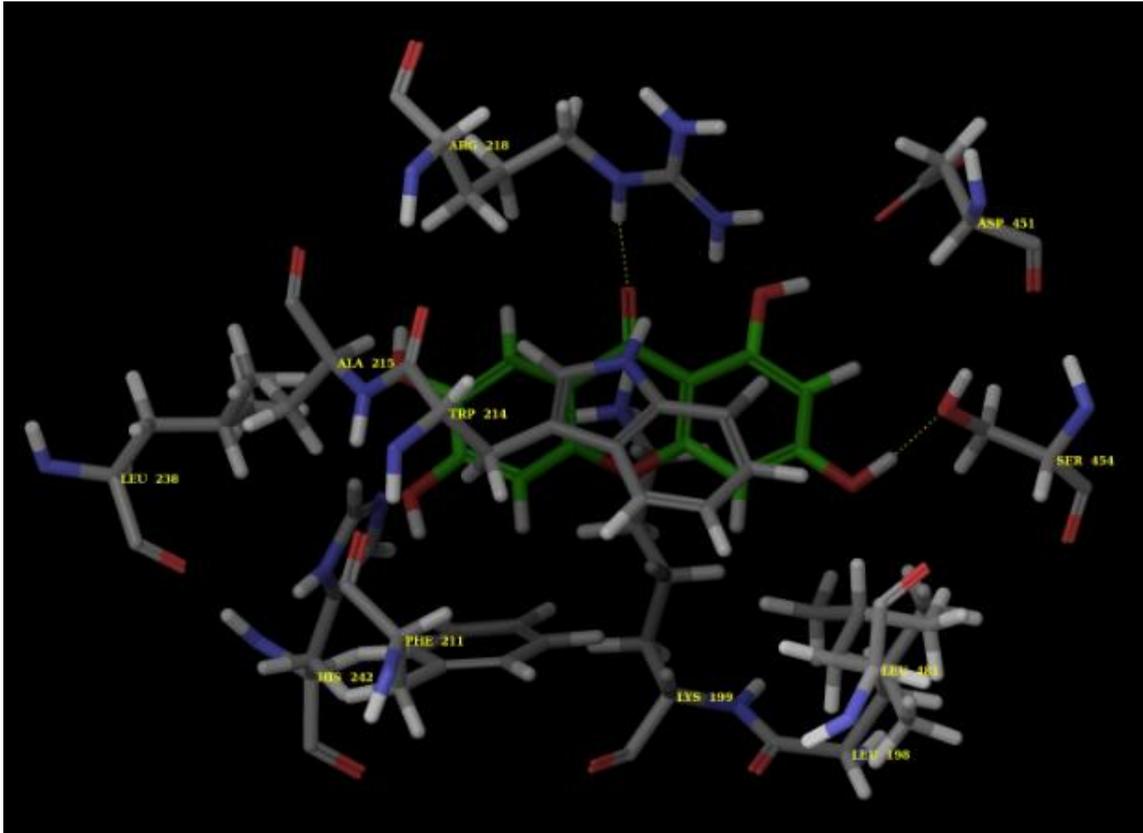


Figura 39. Interação entre MGT com HSA em menor energia de Gibbs. Somente os resíduos do sítio ativo que participam das interações de vdws e ligações de hidrogênio são exibidos. Os resíduos de HSA são representados por modelo em vara de cor cinza, e a estrutura mangiferitina é representada em verde. Os resíduos formando H-ligação com o mangiferina no complexo HSA foi estabelecido por uma linha tracejada amarela.

No que diz respeito às interações estabelecidas entre MGT e a proteína plasmática HSA podemos ressaltar primeiramente as 226 interações de vdw realizadas entre o ligante com a HSA, corroborando com a hipótese de que o caráter hidrofóbico domina as interações entre as xantonas naturais, mangiferina e mangiferitina com as proteínas plasmáticas HSA e BSA. Assim, como nos complexos já citados, a interação entre o mangiferitina com a HSA também é governado por interações de hidrogênio, como estabelecida entre os resíduos de aminoácido Ser454 e 3O e Arg 218 e 9O. As interações de hidrogênio do complexo MGT-HSA não correspondem com as estabelecidas para o complexo MGT-BSA, assim como ocorreu nos sistemas entre MGF-HSA e MGF-BSA. Isso endossa o fato de que embora a HSA apresente uma identidade de 75% com a BSA, há importantes resíduos do sítio ativo da HSA que se encontram localizado em diferentes regiões da BSA. Provavelmente esse fato contribuiu para as diferenças entre as interações de hidrogênio estabelecidas entre os

complexos, porém essas pequenas diferenças de posições de alguns aminoácidos na BSA não foram suficientemente significativas para alterar o valor da energia livre de Gibbs de ligação entre os complexos envolvendo HSA e BSA.

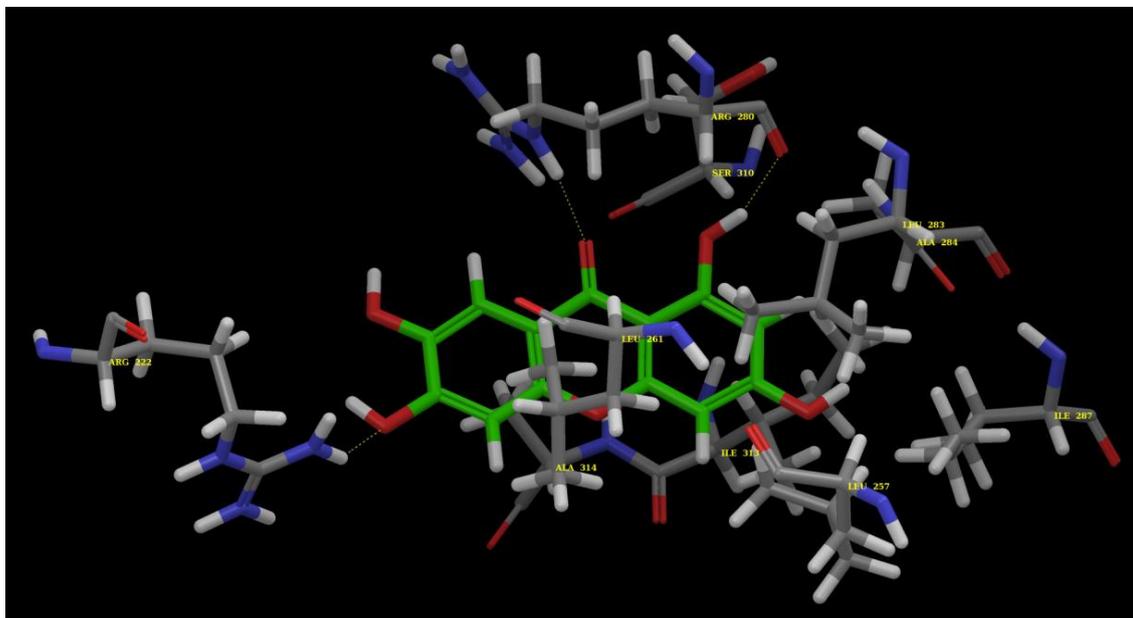


Figura 40. Interação entre MGT com BSA em menor energia de Gibbs. Somente os resíduos do sítio ativo que participam das interações de vdws e ligações de hidrogênio são exibidos. Os resíduos de BSA são representados por modelo em vara de cor cinza, e a estrutura mangiferina é representada em verde. Os resíduos formando H-ligação com o mangiferina no complexo BSA foi estabelecido por uma linha tracejada amarela.

5.5. Determinação dos parâmetros de complexação

5.5.1. Modelo de formação dos complexos por espectrofotometria

A Fig. 41 apresenta os resultados de espectro-diferença da interação de mangiferina e mangiferitina com BSA. Para a determinação dos parâmetros da interação de cada ligante com BSA foram testados diferentes modelos de interação citados na literatura, por ajuste não linear aos dados da Fig. 41. A Tab. 6 relata os resultados de regressão obtidos para os diferentes modelos utilizados, onde o modelo 1 (eq. 19) Scatchard^{120,155} implica uma adsorção a um conjunto simples de sítios na macromolécula, sem interação entre os mesmos, alterações conformacionais, ou cooperatividade, entre as ligações sucessivas do ligante. O modelo 2

testado segue a eq. 20, Hill¹⁵⁶, onde o tratamento de dados de sítios específicos envolvem cooperatividade na interação do ligante com a macromolécula. O modelo 3 (eq. 8) ainda não referendado na literatura de acordo com a curva da Fig. 41 envolve sítios específicos e não específicos de interação com cooperatividade de Hill.

$$v = \frac{n \cdot [Lt]}{Kd + [Lt]} \quad (19)$$

$$v = \frac{n \cdot [Lt]^{\alpha}}{Kd + [Lt]^{\alpha}} \quad (20)$$

Para determinar qual foi o melhor modelo para o ajuste da curva foi realizado o teste F com nível de significância de 95% ($p = 0,05$). O valor de F calculado entre os modelos para cada fármaco, sendo para mangiferina comparando modelo 3:1 e 3:2 foram 20,09 e 4,28, respectivamente. Para mangiferitina o valor de F calculado comparando o modelo 3:1 e 3:2 foram 67,81 e 19,01. Deste modo comparando os valores de F calculados são maiores que o valor de $F = 3,05$ referente à $p = 0,5$, indicando a superioridade do ajuste matemático do modelo 3 sobre os modelos 1 e 2, tanto para mangiferina quanto mangiferitina. A grande limitação dos modelos 1 e 2 é que para a escolha do modelo de interação certos pressupostos são necessários como o número de sítios de interação, cooperatividade e ligação não específica. Assim, podemos afirmar que apenas a eq. (8) se encaixa os dados determinados experimentalmente.

Tabela 6. Comparação de parâmetros de regressão com os diferentes modelos testados. Equação 8.

| Modelo | R^2 | | χ^2 | | K_a (mol.L ⁻¹) | |
|--------|-------|------|----------|------|---------------------------------|-----------------------------|
| | MGF | MGT | MGF | MGT | MGF | MGT |
| 1 | 0,67 | 0,86 | 0,41 | 0,45 | $7,69 \pm 8,48 \times 10^{-12}$ | $0,152 \pm 0,07$ |
| 2 | 0,90 | 0,96 | 0,12 | 0,11 | $2,52 \pm 0,06 \times 10^2$ | $15,03 \pm 0,03$ |
| 3 | 0,94 | 0,99 | 0,08 | 0,03 | $3,82 \pm 0,08 \times 10^4$ | $4,27 \pm 0,48 \times 10^4$ |

Para determinar qual foi o melhor modelo para o ajuste da curva foi realizado o teste F com nível de significância de 95% ($p = 0,05$). O valor de F calculado entre os modelos para cada fármaco, sendo para mangiferina comparando modelo 3:1 e 3:2 foram 20,09 ($p < 0,0001$) e 4,28 ($p < 0,04538$), respectivamente. Para mangiferitina o valor de F calculado comparando o modelo 3:1 e 3:2 foram 67,81 ($p < 0,0000006$) e 19,01 ($p < 0,0004$). Deste modo comparando os valores de F calculados são maiores que o valor de $F = 3,05$ referente à $p = 0,5$, indicando a superioridade do ajuste matemático do modelo 3 sobre os modelos 1 e 2, tanto para mangiferina quanto mangiferitina. A grande limitação dos modelos 1 e 2 é que para a escolha do modelo de interação certos pressupostos são necessários como o número de sítios de interação, cooperatividade e ligação não específica. Assim, podemos afirmar que apenas a eq. (8) se encaixa os dados determinados experimentalmente.

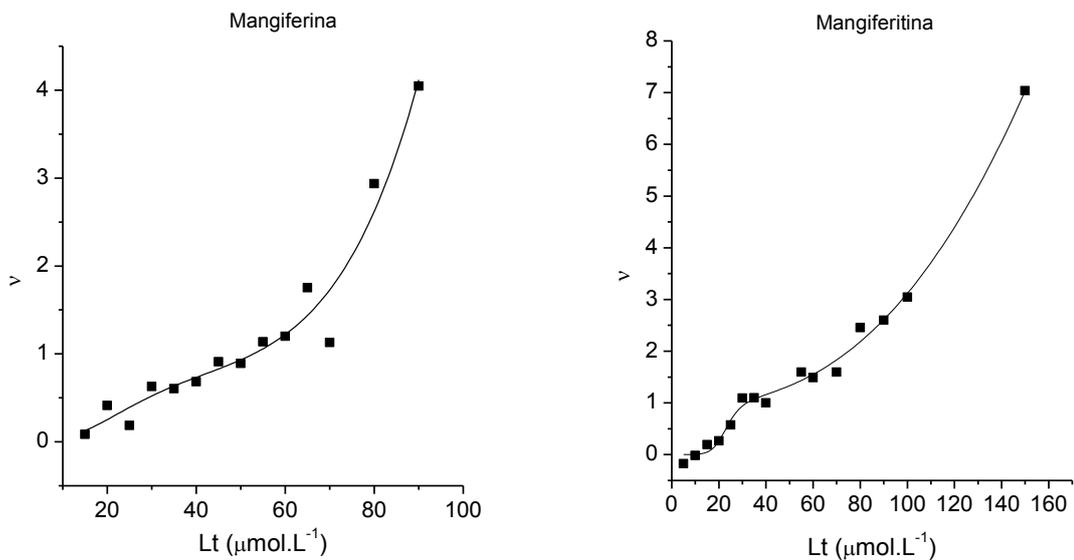


Figura 41. Isotherma da interação de soroalbumina com mangiferina e mangiferitina, respectivamente. Regressão não linear eq. 8.

A Tab. 7 apresenta os valores dos parâmetros determinados pela eq. (8) para os ligantes estudados.

Tabela 7. Parâmetros físico-químicos de interação. Equação 8.

| Parâmetros | Mangiferina | Mangiferitina |
|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| n | $0,93 \pm 0,21$ | $0,97 \pm 0,18$ |
| Kd específico (mol.L ⁻¹) | $2,79 \pm 0,24 \times 10^{-5}$ | $4,34 \pm 0,21 \times 10^{-5}$ |

| | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|
| Ka não-específico (mol.L ⁻¹) | 1,39 ± 0,20 x 10 ⁴ | 1,35 ± 0,01 x 10 ⁴ |
| α específico | 2,95 ± 1,60 | 7,55 ± 4,44 |
| β não-específico | 5,25 ± 2,01 | 2,56 ± 0,24 |

Com o perfil do gráfico da Fig. 41 não é possível demonstrar que BSA pode ser saturável com os ligantes nestas condições. A partir da Fig. 42 é possível verificar a insaturação indicada pela inclinação positiva da segunda parte da isoterma de interação para os dois ligantes estudados. A natureza de insaturação de BSA pode ser demonstrada pelo gráfico de $[v = f[\log(Lt)]$.¹²¹

Paül e colaboradores¹²¹ afirmam que se a proteína estivesse saturada, essa curva se aproximaria de certo valor de v , ou pelo menos deveria ter um ponto de inflexão, indicando a existência de um limite. Paül também afirma que a interpretação correta do equilíbrio de interação com albumina não conduz à conclusão de a proteína pode estar saturada, pelo ligante estudado. Essa grande capacidade de interação da albumina pode ser explicada devido ao seu tamanho e flexibilidade conformacional.

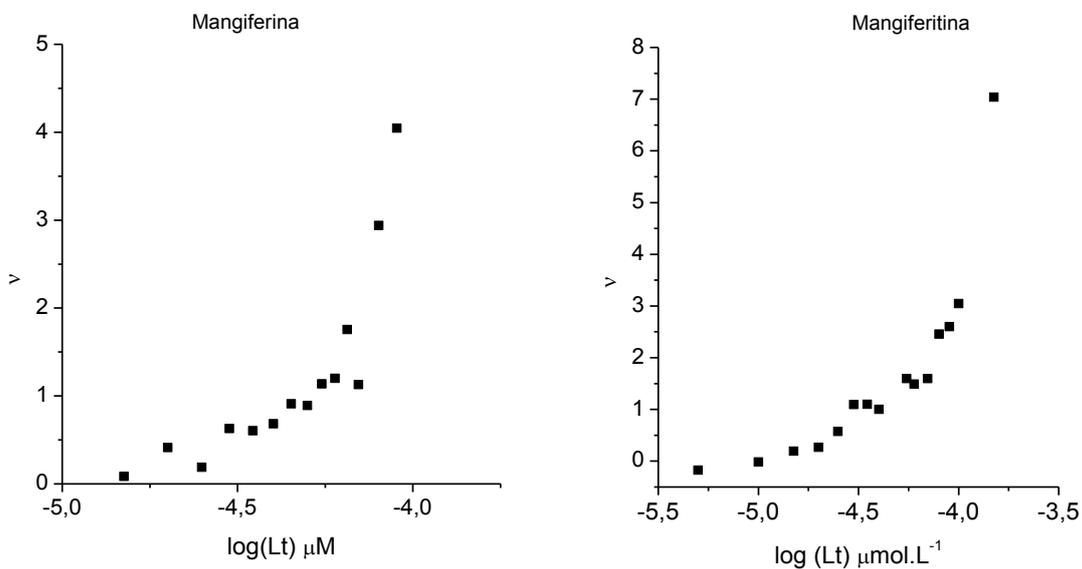


Figura 42. Insaturação de MGF e MGT por inflexão dos dados.

A interação de mangiferina e soroalbumina tem sido relatada como apenas específica.^{138, 139} Entretanto, os resultados descritos nesse estudo, revelam a existência de uma afinidade alta e intermediária na interação de mangiferina com a proteína. E isso é reforçado pela

interação de mangiferitina que também apresenta o mesmo perfil da isoterma de interação. Sendo que a diferença entre os dois ligantes está apenas na presença de um glicosídeo em MGF, pois a forma básica de xantona dos dois ligantes apresenta o mesmo número de hidroxilas ligadas à molécula de xantona.

5.5.2. Espectrofluorescência

A constante de associação foi determinada a partir dos dados fluorimétricos para os complexos de MGF-BSA e MGT-BSA (Fig. 43) por ajuste não linear e linear conforme as equações 9 e 10, respectivamente. Para a interação de BSA com mangiferina $K_a = 3,18 \pm 0,29 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$ e na interação com mangiferitina $K_a = 8,66 \pm 0,02 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$, $n = 0,90 \pm 0,06$. Esses resultados corroboram os resultados anteriormente obtidos por espectrofotometria onde a interação de mangiferitina é mais forte que mangiferina e a formação do complexo ocorrem na razão de 1:1.

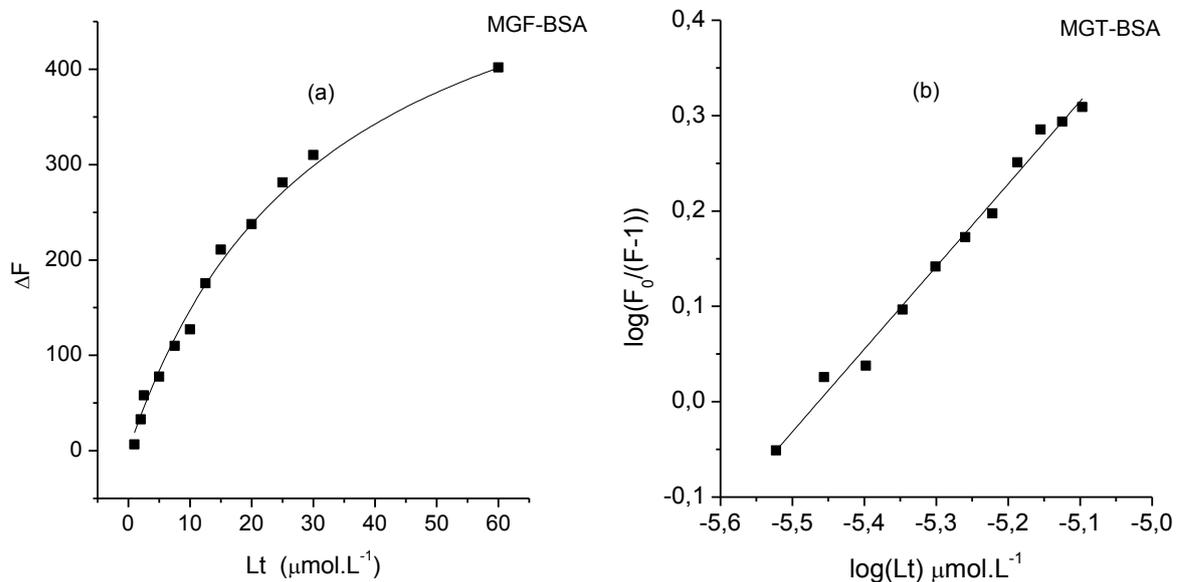


Figura 43. Tratamento gráfico dos dados fluorimétricos a $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$.

5.5.3. Eletroquímica

A Fig. 44 do voltamograma cíclico de MGF na ausência na presença de várias concentrações de BSA demonstra que a corrente de oxidação de MGF diminui em presença de BSA, mas o potencial de oxidação não se altera, confirmando que ocorre a formação do complexo MGF-BSA eletroquimicamente não ativa, entretanto, a formação do complexo resulta na diminuição da concentração de equilíbrio de MGF na solução com a redução da corrente de oxidação.

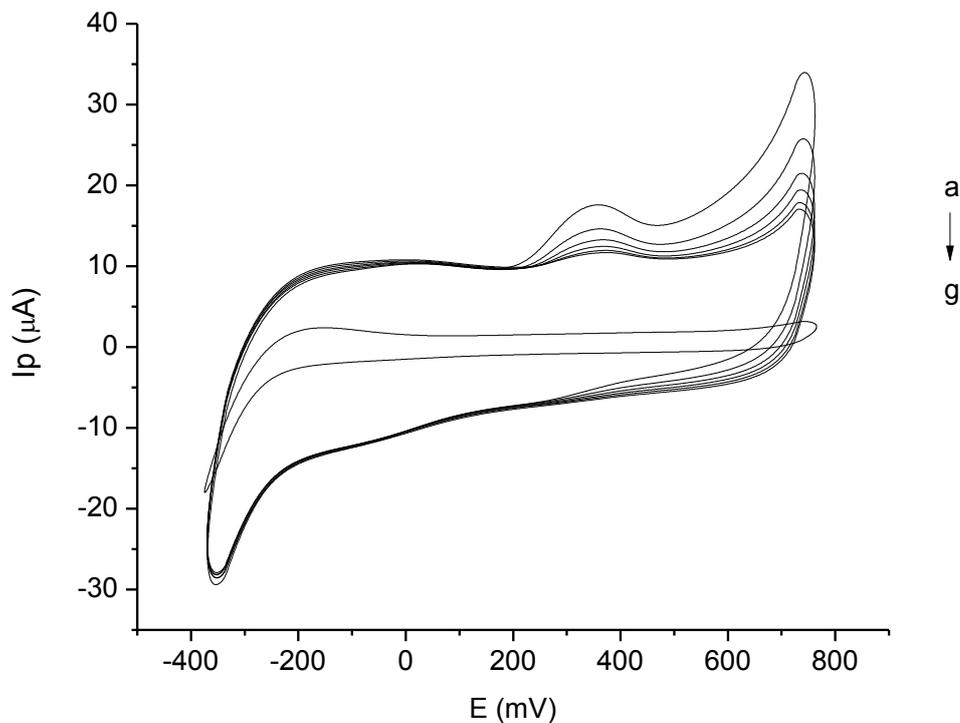


Figura 44. Voltamograma cíclico: $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ MGF (a); $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ MGF + $1,87 \times 10^{-4}$ (b); $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ MGF + $3,53 \times 10^{-4}$ (c); $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ MGF + 5×10^{-4} (d); $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ MGF + $6,31 \times 10^{-4}$ (e); $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ MGF $7,5 \times 10^{-4}$ (f); solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4 (g). Potencial de taxa de velocidade de varredura de 100 mV.s^{-1} .

Com referência ao método proposto por Li e Min¹⁵⁷ a combinação da estequiometria e a constante de estabilidade de MGF e MGF-BSA pode ser calculada baseada nas mudanças do pico de corrente de oxidação de acordo com a equação:

$$\log [(\Delta I_{max} - \Delta I)] = \log \beta_s + m \log [MGF] \quad (21)$$

onde ΔI é a diferença entre a corrente de pico na ausência e na presença de BSA e ΔI_{max} corresponde ao valor obtido quando a concentração de MGF for maior que BSA, β_s é constante de estabilidade e m é a estequiometria. A partir da eq. 21 a relação $\log [\Delta I/(\Delta I_{max} - \Delta I)]$ com $\log [MGF]$ é representada na Fig. 45, a partir do ajuste linear foram obtidos coeficiente de correlação de 0,95, com intercepto $\beta_s = 3,05 \times 10^4$ e inclinação $m = 1,16$, indicando que o complexo é estável com estequiometria de 1:1 MGF-BSA.

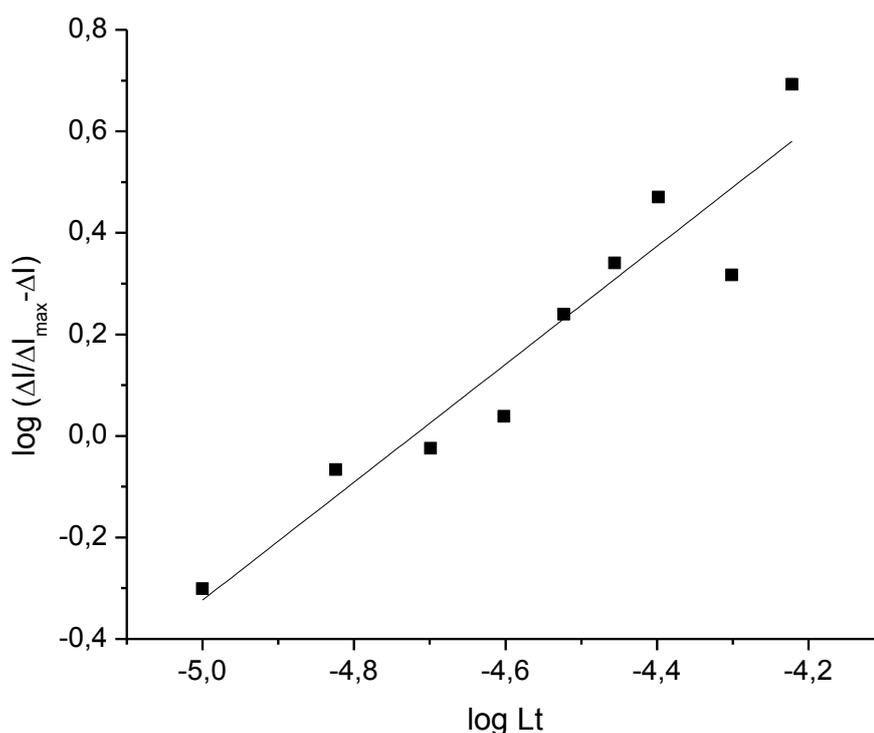


Figura 45. Representação semilogarítmica da interação de MGF com BSA obtido por voltametria cíclica.

As constantes de interação de MGF-BSA e MGT-BSA encontradas pelas diferentes técnicas utilizadas foram de ordem de 10^4 mol.L⁻¹, esse dado encontra-se próximo com a literatura, onde constante de associação de drogas com albumina para os sítios I, II e III são $10^4 - 10^6$, $10^3 - 10^5$, e $10^2 - 10^3$ mol.L⁻¹,¹⁵⁸ isso sugere que mangiferina e mangiferitina pode

se ligar ao primeiro ou ao segundo sítio de interação da albumina. A partir do *docking* molecular confirmou-se que ambos os ligantes interagem no subdomínio IIA uma cavidade hidrofóbica, o que reforça os resultados de interação hidrofóbica do estudo de efeito de pH e força iônica.

6. Conclusões

1. A isoterma de interação de MGF-BSA e MGT-BSA apresentam características de cooperatividade e inespecificidade de sítios de ligação e uma classe de sítios de interação específica;
2. A constante de associação obtida para o complexo MGF-BSA foi de $3,82 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$ (espectrofotometria); $3,18 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$ (fluorimetria) e $3,05 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$ (voltametria);
3. A constante de associação para o complexo MGT-BSA foi de $4,27 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$ (espectrofotometria) e $8,66 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$ (fluorimetria).
4. A estequiometria para a formação dos complexos foi de 1:1;
5. Houve mudança conformacional na estrutura de BSA sob interação com MGF e MGT, respectivamente;
6. O mecanismo de interação de MGF-BSA, MGF-HSA, MGT-BSA e MGT-HSA envolveram forças eletrostáticas, ligação de hidrogênio, com predominância de interações hidrofóbicas;
7. A distância de interação entre BSA e MGF foi de 2,03 nm;
8. A transferência de carga entre BSA e MGF apresentou caráter irreversível;
9. As constantes eletrocatalíticas obtidas para o complexo de MGF-BSA foram $E^{0'} = 0,248$, $K_s = 1,91 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ $\alpha n = 0,92$, $n_e = 2$. O número de elétrons de transferência coincidiu com o número de prótons na formação do complexo sob variação de pH.
10. A interação de MGF e MGT com HSA apresentou pequena diferença na ΔG comparado com a interação com BSA relacionado aos dados teóricos, isso também ocorre com os dados de ΔG quando comparado aos dados experimentais.
11. A interação de BSA com MGT é pouco mais forte do que com MGF, indicando que o glicosídeo presente em MGF não altera significativamente a interação com proteína.

7. Referências Bibliográficas

¹ LI, Y. OHIZUMI, Y. Search for constituents with neurotrophic factor potentiating activity from the medicinal plants of Paraguay and Thailand. **Yakugaku Zasshi**, v. 124 (7), p. 417-424, 2004.

² KIRKPATRICK, P. Stitching together naturally. **Nature**, v. 1, p. 748, 2002.

³ NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Product**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

⁴ BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

⁵ GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

⁶ FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Revista Eletrônica MultiCiência**, v. 7, p 32, 2006.

⁷ YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**, v. 24, p.1, 2001.

⁸ CUNHA, G. A. P. PINTO, A. C. Q.; FERREIRA, F. R. Origem, Dispersão, Taxonomia e Botânica. p. 31-36. In: GENÚ, P. J. de C; PINTO, A. C. de Q. **A cultura da mangueira**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, p. 380-405, 2002.

⁹ RIBEIRO, S.M.R. CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE MANGAS (*Mangifera indica* L.) CULTIVADAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS. Universidade Federal de Viçosa - Tese de doutorado, 2006.

¹⁰ LONDON FRUIT, Inc.1998-2002. All about mangos. Disponível em: <<http://freshmangos.com/aboutmangos/>>. Acesso em 11 de setembro de 2008.

¹¹ NÚÑEZ-SELLÉS, A.J.; DELGADO-HERNÁNDEZ, R.; GARRIDO-GARRIDO, G.; GARCÍA-RIVERA, D.; GUEVARA-GARCÍA, M.; PARDO-ANDREU, G.L The paradox of natural products as pharmaceuticals. Experimental evidences of a mango stem bark extract. **Pharmacol Res.**, v. 55(5), p. 351-358, 2007.

¹² CORREIA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Metabólitos Secundários de Espécies de Anacardiaceae. **Quim. Nova**, v. 29(6), p. 1287-1300, 2006.

¹³ MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 133-137, 2001.

¹⁴ GARRIDO, G.; DELGADO, R.; LEMUS, Y.; RODRIGUEZ, J.; GARCIA, D.; NUNEZ-SELLES, A.J. Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG). Role of mangiferin isolated from the extract. **Pharmacol Res.**, v. 50, p. 165-72, 2004.

¹⁵ BELTRÁN, A. E.; ALVAREZ, Y.; XAVIER, F. E.; HERRANZ, R.; RODRÍGUEZ, J.; NÚÑEZ, A. J.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. **European Journal of Pharmacology**, v. 499, p. 297, 2004.

¹⁶ SÁNCHEZ, G. M.; RE, L.; GIULIANI, A.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; DAVISON G. P.; LÉON-FERNÁNDEZ, O. S. Protective affects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomoleculesoxidation and peritoneal macrophage activation in mice. **Pharmacological Research**, v. 42, p. 565-573, 2000.

¹⁷ GARCÍA D, DELGADO R, UBEIRA FM, LEIRO J. Modulation of rat macrophage function by the *Mangifera indica* L. extracts Vimang and mangiferin. **Int Immunopharmacol**, v. 2, p. 797–806, 2002.

¹⁸ LIMA, Z.P.; SEVERI, J.A.; PELLIZZON, C.H.; BRITO, A.R.; SOLIS, P.N.; CÁCERES, A.; GIRÓN, L.M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Can the aqueous decoction of mango flowers be used as an antiulcer agent? **J Ethnopharmacol**, v. 106, p. 29-37, 2006.

¹⁹ WAUTHOZ N. et al.. Ethnopharmacology of *Mangifera indica* L. Bark and Pharmacological Studies of its Main C-Glucosylxanthone, Mangiferin. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences** 1(2), 112-119 2007.

²⁰ DOS SANTOS, M.H.; NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, T.T.; BRAZ-FILHO, R. 7-epiclusianona: a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Quim. Nova**. 22, 654–660, 1999.

²¹ GUIMARÃES, C. L.; OTUKI, M. F.; BEIRITH, A.; CABRINI, D. A. Uma revisão

sobre o potencial terapêutico da *Garcinia gardneriana* – NA. **Dynamis Revista Tecnológica**, v. 12 (48), p. 6 – 12, 2004.

²² CASTARDO, J. C.; Castardo, PRUDENTE, A. S.; FERREIRA, J.; GUIMARÃES, C. L.; MONACHE, F. D.; FILHO, V. C.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A.; Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 405–411, 2008.

²³ BITTAR, M; DE SOUZA, M. M.; YUNES, R. A.; LENTO, R.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Antinociceptive activity of I3,II8-binarigenin, a biflavonoid present in plants of the guttiferæ. **Planta Médica**, v. 66, p. 84 – 86, 2000.

²⁴ LUZZI, R.; GUIMARÃES, C. L.; VERDI, L. G.; SIMIONATTO, E. L.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; FLORIANI, A. E. O.; CECHINEL FILHO, V. Isolation of biflavonoids with analgesic activity from *Rheedia gardneriana* leaves. **Phytomedicine**, v. 4, p. 139 – 142, 1997.

²⁵ VIEIRA, L.M.; KIJJOA, A. Naturally-occurring xanthenes: recent developments. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2413-2446, 2005.

²⁶ KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Florianópolis: Editora da UFSC; Porto Alegre: Editora da Universidade, p.537-556, 2003.

²⁷JIANG, D.J.; DAI, Z.; LI, Y.J. Pharmacological effects of xanthenes as cardiovascular protective agents. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 22, p. 91- 102, 2004.

²⁸ SOUZA, S. L.; MOREIRA, A. P. B.; PINHEIRO SANT'ANA, H. M.; ALENCAR, E. R.. Conteúdo de carotenos e provitamina A em frutas comercializadas em Viçosa, Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 26, p. 453-459, 2004.

²⁹MARONA, H. Evaluation of some 2-substituted derivatives of xanthone for anticonvulsant properties. **Pharmazie**, v. 54, p. 405-409, 1998.

³⁰ WANG, L.W.; KANG, J.J.; CHEN, I.J.; TENG, C.M.; LIN, C.N. Antihypertensive and vasorelaxing activities of synthetic xanthone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10(3), p. 567-72, 2002.

³¹ PACHUTA, R. R.; COOKS, R. G.; CASSADY, J. M.; CONG, P.; MCCLOUD, T. G.; CHANG, C. J. Antineoplastic agents from higher plants : application of tandem mass spectroscopy to xanthenes from *Psorospermum febrifugum*. **Journal of Natural Products**, v. 49(3), p. 412-423, 1986.

³² LIOU, S.S.; SHIEH, W.L.; CHENG, T.H.; WON, S.J.; LIN, C.N. Gamma pyrone compounds as potential anti-cancer drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45(9), p. 191-194, 1993.

³³ PERMANA, P.A.; HO, D.K.; CASSADY, J.M.; SNAPKA, R.M. Mechanism of action of the antileukemic xanthone psorospermim: DNA strand breaks, abasic sites, and protein-DNA cross-links. **Cancer Res.**, v.54(12), p.3191-3195, 1994.

³⁴ LIN, C.N.; LIOU, S.J.; LEE, T.H.; CHUANG, T.C.; WON, S.J. Xanthone derivatives as potential anti-cancer drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48(5), p. 539-544, 1996.

-
- ³⁵ ASANO, J.; CHIBA, K.; TADA, M.; YOSHII, T. Cytotoxic xanthenes from *Garcinia lamburyi*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 815-820, 1996.
- ³⁶ MATSUMOTO, K.; AKAO, Y.; YI, H.; OHGUCHI, K.; ITO, T.; TANAKA, T.; KOBAYASHI, E.; IINUMA, M.; NOZAWA, Y. Preferential target is mitochondria in a-mangostinin-induced apoptosis in human leukemia HL60 cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 5799-5806, 2004.
- ³⁷ PATTANAPRATEEB, P.; RUANGRUNGSI, N.; CORDELL, G.A. Cytotoxic constituents from *Cratoxylum arborescens*. **Planta Med.**, v. 71(2), p. 181-183, 2005.
- ³⁸ GHOSAL, S.; BISWAS, K.; CHAUDHURI, R. K. Anti Mycobacterium tuberculosis activity of naturally occurring xanthenes and synthetic analogs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.67, p.1978, 1978.
- ³⁹ WANG, Y.H.; HOU, A.J.; ZHU, G.F.; CHEN, D.F.; SUN, H.D. Cytotoxic and antifungal isoprenylated xanthenes and flavonoids from *Cudrania fruticosa*. **Planta Med.** v. 71(3), p. 273-274, 2005.
- ⁴⁰ CASTANHEIRO, R.A.; PINTO, M.M.; SILVA, A.M.; CRAVO, S.M.; GALES, L.; DAMAS, A.M.; NAZARETH, N.; NASCIMENTO, M.S.; EATON, G. Dihydroxyxanthenes prenylated derivatives: Synthesis, structure elucidation, and growth inhibitory activity on human tumor cell lines with improvement of selectivity for MCF-7. **Bioorg Med Chem.**, v. 15(18), p. 6080-6088, 2007.
- ⁴¹ MONTILLA, M.P.; AGIL, A.; NAVARRO, M.C.; JIMÉNEZ, M.I.; GARCÍA-GRANADOS, A.; PARRA, A.; CABO, M.M. Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. **Planta Med.**, v. 69(5), p. 472-474, 2003.

-
- ⁴² CHOPRA, R.N., NAYAR, S.R., CHOPRA, I.C., 1956. **Glossary of Indian Medicinal Plants**. CSIR, New Delhi, p. 161, 1956.
- ⁴³ DESAI, P.D. et al. Chemical investigation of some Indian plants: Part II. **Indian Journal of Chemistry**, v. 4, p. 457-549, 1966.
- ⁴⁴ EL ANSARI, M. A; RAJADURAI, S.; NAYUDAMMA, Y. Studies on the polyphenolsof *Mangifera indica* bark. **Leather Science**, v.14, p. 247-251, 1967.
- ⁴⁵ BHATIA, V. K.; RAMANATHAN, J. D.; SESHADRI, T. R. Constitution of mangiferin. **Tetrahedron**, v. 23, p. 1363-1368, 1967.
- ⁴⁶ RAMANATHAN, J. D.; SESHADRI, T. R. Constitution of mangiferin. **Current Science**, v. 29, p. 131-132, 1960.
- ⁴⁷ NIGAM, S. K.; MITRA, C. R. Constituents of mango (*Mangifera indica*) roots. **Indian Journal of Chemistry**, v. 2, p. 378-379, 1964.
- ⁴⁸ ISEDA, S. The structure of mangiferin. **Nippon Kagaku Zasshi**, Tokyo, v. 77, p. 1629-1630, 1956.
- ⁴⁹ HAYNES, L. J.; TAYLOR, D. R. C-glycosyl compounds. Part. V. Mangiferin; the nuclear magnetic resonance spectra of xanthones. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, London, v. 19, p. 1685-1687, 1966.
- ⁵⁰ PROX, A. Mass spectrometric study of some natural C-glycosyl compounds. **Tetrahedron**, Oxford, v. 24, p. 3697-3715, 1968.

⁵¹ ARITOMI, M.; KAWASAKI, T. Xanthone C-glucoside, position isomer of mangiferin, from *Anemarrhena asphodeloides*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 12, p. 941-944, 1969.

⁵²GÓMEZ-ZALETA, B.; RAMÍREZ-SILVA, M.T.; GUTIÉRREZ, A.; GONZÁLEZVERGARA, E.; GÜIZADO-RODRÍGUEZ, M.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A. UV/vis, ¹H, and ¹³C NMR spectroscopic studies to determine mangiferin pKa values. **Spectrochimica Acta Part A**, Amsterdam, v. 64, p. 1002.1009, 2006.

⁵³ SANUGUL, K.; AKAO, T.; LI, Y.; KARIUCHI, N.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M. Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme that cleaves a C-glucosyl bond. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, p. 1672-1678, 2005.

⁵⁴ CRUZ, J. W.; MORAES, L. R.; SANTOS, M. H.; SILVA, G. A. da; BRIGAGAO, M. R. P. L.; ELLENA, J.; DORIGUETTO, A. C. Crystalline structure of mangiferin, a C-glycosyl-substituted 9H-xanthen-9-one isolated from the stem bark of *Mangifera indica*. **Helvetica Chimica Acta**, Zürich, v. 91, p. 1444-1454, 2008.

⁵⁵ RICHARDSON, P. M. The taxonomic significance of C-glycosylxanthenes in flowering plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 11, p. 371-375, 1983.

⁵⁶ BENNETT, G. J.; LEE, H.H. Xanthenes from Guttiferae. **Phytochemistry**, Oxford, v. 28, p. 967-98, 1989.

⁵⁷ JENSEN, S.R.; SCHRIPSEMA, J. **Gentianaceae: Systematics and Natural History**, Chap. 6, ed. by Struwe L., Albert V.A., Cambridge University Press, Cambridge, p. 573—631, 2002.

-
- ⁵⁸ NOTT, P. E.; ROBERTS, J. C. Synthesis of mangiferin. **Phytochemistry**, Oxford, v. 6, p. 597-599, 1967.
- ⁵⁹ BHATIA, V. K.; SESHADRI, T. R. Synthesis of mangiferin. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 14, p.1741-1742, 1968.
- ⁶⁰ MURUGANANDAN et al. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. **Toxicology**, v. 176, p. 165-173, 2002.
- ⁶¹ HOSTETTMANN, K., WAGNER H. Xanthone glycosides. **Phytochemistry** v. 16, p. 821-829, 1977.
- ⁶² RICHARDSON, P. M. The taxonomic significance of C-glycosylxanthenes in flowering plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 11, p. 371-375, 1983.
- ⁶³ YOSHIMI, N.; MATSUNAGA, K.; KATAYAMA, M.; YAMADA, Y.; KUNO, T.; QIAO, Z.; Hara, A.; YAMAHARA, J.; MORI, H. The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats. **Cancer Letters**, v. 163, p. 163-170, 2001.
- ⁶⁴ SANUGUL, K.; AKAO, T.; LI, Y.; KAKIUCHI, N.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M. Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme that cleaves a C-glucosyl bond. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, p. 1672–1678, 2005.
- ⁶⁵ WANG, J. P.; HO, T. F.; LIN, C. N.; TENG, C. M.; **Naunyn-Schmiedeberg's. A Arch. Pharmacol.**, v. 350, p. 90—95, 1994. v. 353, p. 303—313,1998.

⁶⁶ KO, F.N.; LIN, C.N.; LIOU, S.S.; HUANG, T.F.; TENG, C.M. Dicine, a natural vascular alpha 1-adrenoceptor antagonist, isolated from *Lindera megaphylla*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 192, p. 133–139, 1991.

⁶⁷ WANG, H.; YE, G.; MA, C.; TANG, Y.; FAN, M.; LI, Z.; HUANG, C. Identification and determination of four metabolites of mangiferin in rat urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 793–798, 2007.

⁶⁸ HSU, M.; RAUNG, S.; TSAO, L.; LIN, C.; WANG, J. Examination of the inhibitory effect of norathyriol in formymethionyl-leucyl-phenylalanine induced respiratory burst in rat neutrophils. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, N^o. 7, p. 1035–1045, 1997.

⁶⁹ CHIELI, E.; ROMITI, N.; RODEIRO, I.; GARRIDO, G.; In vitro effects of *Mangifera indica* and polyphenols derived on ABCB1/P-glycoprotein activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2703–2710, 2009.

⁷⁰ BARRÉ, J.; CHAMOULARD, J. M.; HOULN, G.; TILLEMENT, J. P. Equilibrium dialysis, ultrafiltration and ultracentrifugation compared for determining the plasma-protein-binding characteristics of valproic acid. **Clinical Chemical**. v. 31, n. 1, p. 60-64, 1985.

⁷¹ LABAUNE, J. P. **Farmacocinética**. São Paulo: Editora Org. Andrei, 1993.

⁷² STEVENSON, D.; MILLER, S.; WILSON, I. D. Biological/pharmaceutical applications. In HANDLEY, A. J. **Extraction Methods in Organic Analysis**. England: Editora Sheffield Acad. Press, 2000.

⁷³ SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2002.

⁷⁴ SHARGEL, L.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutic & Pharmacokinetics**. New York: Editora McGraw Hill, 1999.

⁷⁵ STEVENSON, D. & WILSON, I. D. (eds) **Sample preparation for Biomedical and Environmental Analysis**. New York: Editora Plenum, 1994.

⁷⁶ BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Editora Artmed, 2001.

⁷⁷ GOODMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **The pharmacological basis of therapeutics**. New York: Editora McGraw Hill, 2001.

⁷⁸ SVENSSON, C. K.; WOODRUFF, M. N.; BAXTER, J. G.; LALKA, D. Free drug concentration monitoring in clinical practice. Rationale and current status. **Clin. Pharmacokinet.** v. 11, n. 6, p. 450-460, 1986.

⁷⁹ THEODORIDIS, G. Application of solid-phase microextraction in the investigation of protein binding of pharmaceuticals. **J. Chrom. B.**, v. 830, p. 238-244, 2006.

⁸⁰ SCHUHMACHER, J.; BUHNER, K.; WITT-LAIDO, A. Determination of the free fraction and relative free fraction of drugs strongly bound to plasma proteins. **J. Pharm. Sci.** v. 89, n. 8, p. 1008-1021, 2000.

⁸¹ D'ARCY, P.F. & MCELNAY, J.C. Drug interactions involving the displacement of drugs from plasma protein and tissue binding sites. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 17, n. 2, p. 211-220, 1982.

⁸² SHARGEL, L. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division, 2005.

⁸³ AJTAI, K. & BURGHARDT, T.P. Conformation of xanthene dyes in the sulfhydryl binding site of myosin. **Biochemistry**, v. 34, n. 49, p. 15943-15952, 1995.

-
- ⁸⁴ COOPER, T.M., STONE, M.O., NATARAJAN, L.V.; CRANE, R.L. Investigation of light-induced conformation changes in spiropyran-modified succinylated poly (L-Lysine). **Photochem. Photobiol.**, v. 62, n. 2, p. 258-262, 1995.
- ⁸⁵ OLIVEIRA, M. G. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLDS, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, J. L.; MARES-GUIA, M. L. Tyrosine-151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with *p*-diazonium-benzamidine and kinetic characterization of Tyr-151-(*p*-benzamidine)-azo-beta-trypsin. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n. 36, p. 26893-26901, 1993.
- ⁸⁶ FRAENKEL-CONRAT, H.; COOPER, M. The use of dyes for the determination of acid and basic groups in proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 154, p. 239-246, 1944.
- ⁸⁷ KLOTZ, I. M. Spectrophotometric investigations of the interactions of proteins with organic anions. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 68, p. 1486-1490, 1946.
- ⁸⁸ KLOTZ, I. M.; BURKHARD, R. K. & URQUHART, J.M. Structural specificities in the interactions of some organic ions with serum albumin. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 74, p. 202-208, 1952.
- ⁸⁹ LOVRIEN, R. E., CONROY, M. J. & RICHARDSON, T. I. **Molecular basis for protein separation**. In: GREGORY, R.B. Protein-solvent interactions. Marcel Dekker, Inc. New York, cap. 13, p. 521-553, 1995.
- ⁹⁰ JOHNSON, M. L., FORMISANO, S. & EDELHOCH, H. Self-association of glucagon as measured by the optical properties of rhodamine 8G. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 5, p. 1353-1356, 1978.

-
- ⁹¹ SUBRAMANIAN, M., SHESHADRI, B.S. & VENKATAPPA, M.P. Interaction of lysozyme with dyes. II. Binding of bromophenol blue. **J. Biochem.** (Tokyo), v. 96, n. 1, p. 245-252, 1984.
- ⁹² CHAPMAN, L.; GREENBERG, D.M.; SCHMIDT, C.L.A. Studies on the nature of the combination between certain acid dyes and proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 72, p. 707-729, 1927.
- ⁹³ KOCH-WESER, J. & SELLERS, E.M. Drug therapy. Binding of drugs to serum albumin (second of two parts). **New England Journal of Medicine**, v. 294, n. 10, p. 526-531, Mar. 1976.
- ⁹⁴ DEL CASTILLO, J. R. E.; ELSENER J.; MARTINEAU G. P. Pharmacokinetic modeling of in-feed tetracyclines in pigs using a meta-analytic compartmental approach. **Swine Health and Production.**, v. 6, n. 5, p. 189–202, 1998.
- ⁹⁵ KRATZ, F. Interactions of antitumor metal complexes with serum proteins. Perspectives for anticancer drug development. In *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Keppler B.K., ed., VCH, p. 391-429, 1993.
- ⁹⁶ Protein Data Bank (Brookhaven National Laboratory; <http://www.pdb.bnl.gov>), sob o código 1AO6. Acessado em : 23 set. De 2008.
- ⁹⁷ CURRY, S.; Mandelkow, H.; Brick, P. e Franks, N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. **Nature Struct. Biol.**, v. 5, n. 9, p. 827-835, 1998.
- ⁹⁸ HE, X.M. & Carter, D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, v. 358, p. 209-215, 1992.

-
- ⁹⁹ NGUYEN A. et al. The pharmacokinetics of an albumin-binding Fab (AB.Fab) can be modulated as a function of affinity for albumin. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 19, n. 7, p. 291-297, 2006.
- ¹⁰⁰ CARTER, D.C. & Ho, J.X. Structure of serum albumin. **Adv. Prot. Chem.**, v. 45, p. 153-203, 1994.
- ¹⁰¹ KOUOH, F. et al. Antioxidant properties of albumin: Effect on oxidative metabolism of human neutrophyl granulocytes, **Il Farmaco**, v. 54, p. 659, 1999.
- ¹⁰² KRAGH-HANSEN. U.; CHUANG, V. T. A.; OTAGIRI, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. **Biol Pharm Bull**, v. 25, p. 695–704, 2002.
- ¹⁰³ KRAGH-HANSEN, U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. **Dan. Med. Bull.**, v. 37, n. 1, p. 57-84, 1990.
- ¹⁰⁴ CURRY, S.; BRICK, P. & FRANKS, N. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1441, p. 131-140, 1999.
- ¹⁰⁵ SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIZUKI, S.; NODA, M. e KOBAYASHI, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Eng.**, v. 12, n. 6, p. 439-446, 1999.
- ¹⁰⁶ Protein Crystallographic on the Web, [http:// px.cryst.bbk.ac.uk/99/sample/helix.htm](http://px.cryst.bbk.ac.uk/99/sample/helix.htm). Acessado em: 23 set. 2008.
- ¹⁰⁷ VORUM, H. Reversible ligand binding to human serum albumin. Theoretical and clinical aspects. **Dan. Med. Bull.**, v. 46, n. 5, p. 379-399, 1999.

-
- ¹⁰⁸ GRECO, A.V. et al. Subclinical hepatic encephalopathy: role of tryptophan binding to albumin and the competition with indole-3-acetic acid. **J. Investig. Med.**, v. 48, p. 274-280, 2000.
- ¹⁰⁹ GHUMAN, J; ZUNSZAIN, PA; PETITPAS, I; BHATTACHARYA, AA; OTAGIRI, M; CURRY, S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **J. Mol. Biol.**, v. 353, p. 38–52, 2005.
- ¹¹⁰ FREIFELDER, D. **Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology**, Freeman, 1976.
- ¹¹¹ LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**, Plenum Press, 1983.
- ¹¹² KISSINGER, P. T.; HEINEMAM, W. R. **J. Chem. Educ.** 60, 702, 1983.
- ¹¹³ WANG, J. **Anal. Electrochem.** VCH publishers: New York, 1994.
- ¹¹⁴ BASTOS, M.B.R., Contribuição ao estudo eletroanalítico das bases de Schiff SALEN e piridoxal-5'-fosfato e alguns de seus complexos com Cu²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ e UO₂²⁺. 1997. 146 f. **Tese de Doutorado**. Puc-Rio, Rio de Janeiro, 1997.
- ¹¹⁵ ROCK, M. Voltametria Cíclica, propriedades termodinâmicas e espectrais de complexos diimínicos de ferro em acetonitrila, **Tese de mestrado**, USP, São Paulo, 1977.
- ¹¹⁶ FAIZUL, F. M.; KADIR, H. A.; TAYYAB S. Spectroscopic studies on the binding of bromocresol purple to different serum albumins and its bilirubin displacing action. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 90, p. 1-7, 2008.
- ¹¹⁷ PAL, B.; BAJPAI, P. K.; BASU, T. S. Binding of 5-(2'- azoquinolin-8-ol) to bovine serum albumin: a spectroscopic study. **Spectrochimica Acta A**, v. 56, p. 2453-2458, 2000.

-
- ¹¹⁸ SCHNEEDORF, J. M.; SANTORO, M. M.; MARES-GUIA, M. Structural Displayed in the soluble phase of corystalization of flavianic acid with trypsin in acid media. **Biochimic**, v. 83, p. 497-504, 2001.
- ¹¹⁹ ASPURU, E. O.; ZATÓN A. M. L. Binding of disodium cromoglycate to human serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 54, n. 983-988, 1998.
- ¹²⁰ BORDBAR, A. K.; SABOURY, A. A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. The Shapes of Scatchard Plots for Systems with Two Sets of binding Sites. **Biochemical Education**, v. 24, n. 3, 1996.
- ¹²¹ PAÁL, K.; MULLER, J.; HEGEDÛS, L. High affinity binding of paclitaxel to human serum albumin. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 2187-2191, 2001.
- ¹²² LAKOWICZ, J. R. **Topics in Fluorescence Spectroscopy: Protein Fluorescence**, v. 6, ed. Kluwer, 2002.
- ¹²³ BANERJEE, A.; BASU K.; SENGUPTA, P. K.; Interaction of 7-hydroxyflavone with human serum albumin: A spectroscopic study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 90, p.33–40, 2008.
- ¹²⁴ STAN, D.; MATEI, I.; MIHAILESCU, C.; SAVIN, M.; MATAACHE, M.; HILLEBRAND, M.; BACIU I. Spectroscopic Investigations of the Binding Interaction of a New Indanedione Derivative with Human and Bovine Serum Albumins. **Molecules**, v. 14, p. 1614-1626, 2009.
- ¹²⁵ LIU, H.; XU, Z.; LIU, X.; XI, P.; ZENG, Z., Analysis of Binding Interaction between Bovine Serum Albumin and the Cobalt(II) Complex with Salicylaldehyde-2-phenylquinoline-4-Carboylhydrazone. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 57, n. 11, p. 1237—1242, 2009.
- ¹²⁶ HU, Y.; ZHAO, R.; DONG, J.; QU, S. S. Spectroscopic studies on the interation between methylene blue and serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 179, p. 324-329, 2006.

-
- ¹²⁷ SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, 779 – 815, 1993.
- ¹²⁸ LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORTON, J. M. PROCHEK a program to check the stereochemical quality of protein structure. **J. Appl. Cryst.**, v. 26, p. 283 – 291, 1993.
- ¹²⁹ Schrödinger Suite 2008 Induced Fit Docking protocol; Glide version 5.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2005; Prime version 1.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2005.
- ¹³⁰ LigPrep, version 2.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2005.
- ¹³¹ Prime version 1.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2005.
- ¹³² MacroModel, version 9.6, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2008.
- ¹³³ Maestro, version 8.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2008.
- ¹³⁴ LOBINSKI, R.; MARCZENKO, Z. Recent Advances in Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v. 23, p. 55, 1992.
- ¹³⁶ SULKOWSKA, A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. **J. Mol. Struct.**, v.614, p. 227-232, 2002.
- ¹³⁷ LIU, H.; XU, Z.; LIU, X.; XI, P.; ZENG, Z. Analysis of Binding Interaction between Bovine Serum Albumin and the Cobalt(II) Complex with Salicylaldehyde-2-phenylquinoline-4- Carboylhydrazone. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 57, n. 11, p. 1237—1242, 2009.
- ¹³⁸ YUE, Y.; CHEN, X.; QIN, J.; YAO, X. Characterization of the mangiferin–human serum albumin complex by spectroscopic and molecular modeling approaches. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p. 753-759, 2009.

-
- ¹³⁹ LIN, H.; LAN, J.; GUAN, M.; SHENG, F.; ZHANG, H. Spectroscopic investigation of interaction between mangiferin and bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 73, n. 5, p. 936-941, 2009.
- ¹⁴⁰ JIANG, C. Q.; GAO, M. X.; HE, J. X. Study of the interaction between terazosin and serum albumin synchronous fluorescence determination of terazosin. **Anal. Chim. Acta**, v. 452, p. 185—189, 2002.
- ¹⁴¹ SHARMA, A.; SCHULMAN, S.G. **Introduction to Fluorescence Spectroscopy**, John Wiley & Sons, New York, 1999.
- ¹⁴² STRYER, L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 47, p. 819–846, 1978.
- ¹⁴³ LIU, J.; TIAN, J.; ZHANG, J.; HU, Z.; CHEN, X. Interaction of magnolol with bovine serum albumin: a fluorescence-quenching study. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 376, p. 864–867, 2003.
- ¹⁴⁴ YUAN, T.; WELJIE, A. M.; VOGEL, H. Tryptophan fluorescence quenching by methionine and selenomethionine residues of calmodulin: orientation of peptide and protein binding. **Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 3187–3195, 1998.
- ¹⁴⁵ ALBERT, W.C; GREGORY, W. M.; ALLAN, G. S. The binding interaction of coomassie blue with protein. **Anal. Biochem.**, v. 213, p. 407-413, 1993.
- ¹⁴⁶ ZHU, J.; TONG, S. Y. A study on the reaction between fluorescein and protein. **Chem. J. Chin. Univ.**, v. 17, p. 539, 1996.
- ¹⁴⁷ NIRANJANA, E. et al. **Research and Review in Electrochemistry**, v. 1, p. 42, 2008.
- ¹⁴⁸ NIRANJANA, E. et al. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 3, p. 980, 2008.

-
- ¹⁴⁹ CHOWDAPPA, N. et al. Cyclic Voltammetric Studies of Serotonin at Sodium Dodecyl Sulfate Modified Carbon Paste Electrode. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 4, p. 425 – 434, 2009.
- ¹⁵⁰ GOSSER, D. K. Jr., **Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms**, VCH, New York, 1993.
- ¹⁵¹ WU, Y.; JI, X.; HU, S. Studies on electrochemical oxidation of azithromycin and its interaction with bovine serum albumin. **Bioelectroch.**, v. 64, p. 91-97, 2004.
- ¹⁵² BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.; **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 2001.
- ¹⁵³ BATTISTUZZI, G.; BORSARI, M.; LOSCHI, L.; SOLA, M.; Redox thermodynamics, acid-base equilibria and salt-induced effects for the cucumber basic protein. General implications for blue-copper proteins. **J. Bic.**, v. 2, p. 350-359, 1997.
- ¹⁵⁴ ANTONIJEVIC, M. M.; ALAGIC, S. C.; PETROVIC, M. B.; RADOVANOVIC, M. B.; STAMENKOVIC, A. T. The Influence of pH on Electrochemical Behavior of Copper in Presence of Chloride Ions. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 4, p. 516 – 524, 2009.
- ¹⁵⁵ WEI, Y.; LI, K.; TONG, S.; Spectral Study of Interaction of Thymol Blue with Protein in Acidic Solution, **Analytica Chimica Acta** 341 (1997) 97-104.
- ¹⁵⁶ SEBER, G. A. F.; WILD, C. J. **Nonlinear Regression**. John Wiley & Sons, Inc. p. 120, 1989.
- ¹⁵⁷ LI, N. Q.; MIN J. Polarographic study on the non-electroactive complex of scandium-carminic acid. **Chin. J. Anal. Chem.**, v. 17, p. 346-349, 1989.
- ¹⁵⁸ KERNS, E. H.; DI, L. **Drugs-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization**. Elsevier, p. 187-190, 2008.