

HAUSTER MAXIMILER CAMPOS DE PAULA

**DETERMINAÇÃO DAS VELOCIDADES E ENERGIAS DA INTERAÇÃO
PROTEÍNA-CORANTES (FENOTIAZÍNICOS E FENILMETANOS) PELA TÉCNICA
DE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva

Coorientadoras: Ana Clarissa dos Santos Pires
Maria do Carmo Hespanhol
Yara Luiza Coelho

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P324d
2021
Paula, Hauster Maximiler Campos de, 1989-
Determinação das velocidades e energias da interação
proteína-corantes (fenotiazínicos e fenilmetanos) pela técnica de
ressonância plasmônica de superfície / Hauster Maximiler
Campos de Paula. – Viçosa, MG, 2021.
1 tese eletrônica (79 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 62-70.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.107>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Forças intermoleculares. 2. Proteínas. 3. Corantes.
4. Ressonância de plasmônio de superfície. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 541.226

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

HAUSTER MAXIMILER CAMPOS DE PAULA

**DETERMINAÇÃO DAS VELOCIDADES E ENERGIAS DA INTERAÇÃO
PROTEÍNA-CORANTES (FENOTIAZÍNICOS E FENILMETANOS) PELA TÉCNICA
DE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 18 de outubro de 2021.

Assentimento:



Hauster Maximiler Campos de Paula
Autor



Luis Henrique Mendes da Silva
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus por cada bênção e proteção concedida a mim e a Ave Maria que me ilumina a cada decisão.

À minha mãe Darly Campos e minha avó Jacinta Campos por tudo!! Sou orgulhoso e grato a Deus por ter me concedido mães tão maravilhosas.

Ao meu tio/irmão Erriston (e aos meus familiares) pela confiança, incentivo e companheirismo. Muito obrigado!!

Ao meu orientador e amigo professor Luis Henrique Mendes da Silva pela orientação, apoio, companheirismo, pelo exemplo de profissionalismo e trabalho, pelos ensinamentos e pela parceria. Muito Obrigado!!

Às minhas coorientadoras Ana Clarissa dos Santos e Maria do Carmo pela orientação apoio, incentivo, profissionalismo e pelos ensinamentos compartilhados. Muito Obrigado!!

Aos membros da banca de avaliação, professores: Alexandre Gurgel, Ana Clarissa dos Santos Pires, Leonardo de Paiva Barbosa e Márcio Santos Rocha pelo aceite do convite e pelas contribuições na correção e desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos Alan e Francielle pela amizade, companheirismo, alegrias, encontros... muito obrigado!

À Maria Geralda pelo companheirismo, parceria, carinho e por cada momento dividido.

Aos amigos Davi Rodrigues e Ricardo Nunes por todo apoio e pela torcida de sempre.

Aos amigos de república e ao grupo de pesquisa Quivecom, pelos ensinamentos compartilhados.

Ao professor e amigo Leonardo Barbosa pelo apoio e incentivo de sempre. Muito obrigado.

Aos professores Leonardo Ramos Paes de Lima, Djolse Dantas e Edelize Gomes pelo incentivo e apoio na carreira acadêmica e pelos ensinamentos compartilhados.

Àqueles que acreditaram e torceram por mim e, por descuido da minha parte, não citados aqui, agradeço pelo carinho!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento Química, técnicos administrativos e toda equipe da UFV – MG pela oportunidade de realização do curso.

Ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG),

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES, Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

PAULA, Hauster Maximiler Campos de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2021. **Determinação das velocidades e energias da interação proteína-corantes (fenotiazínicos e fenilmetanos) pela técnica de ressonância plasmônica de superfície.** Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva. Coorientadoras: Ana Clarissa dos Santos Pires, Maria do Carmo Hespanhol e Yara Luiza Coelho.

Nos últimos anos, aumentou o uso de várias moléculas de corante orgânico para fins clínicos e médicos, como Auramina O, os corantes fenotiazínicos Azure A (AZA) e azul B (AZB) e os corantes fenilmetanos violeta de metila (B, 2B, 6B e 10B). Sabe-se que suas funções e toxicidade podem ser alteradas por interações com proteínas. No entanto, não há informações cinéticas ou termodinâmicas sobre as interações da albumina sérica bovina (BSA) com corantes fenotiazínicos e da lactoferrina bovina (BLF) com fenilmetanos. Neste trabalho, a ressonância plasmônica de superfície foi utilizada para determinar as constantes cinéticas e termodinâmicas da formação de BSA-fenotiazina e BLF-fenilmetanos a pH 7,4. A BSA interagiu com os corantes fenotiazínicos (AZA e AZB) para formar complexos termodinamicamente estáveis com constantes de binding (K_b) de $2,1 \times 10^4$ e $2,39 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente, a 298,15 K), em pH 7,4. No entanto, a força motriz para a formação dos complexos de corantes BSA-fenotiazina era dependente da temperatura. Para temperaturas $\leq 16 \text{ }^\circ\text{C}$, a formação do complexo ativado ($\Delta H^\ddagger_{a,12^\circ\text{C},\text{AZA}} = -310,57 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $\Delta H^\ddagger_{a,12^\circ\text{C},\text{AZB}} = -256,37 \text{ kJ mol}^{-1}$) e termodinamicamente estável ($\Delta H^\circ_{12^\circ\text{C},\text{AZA}} = -314,56 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta H^\circ_{12^\circ\text{C},\text{AZB}} = -265,73 \text{ kJ mol}^{-1}$) e os complexos de corantes BSA foram conduzidos pela entalpia, enquanto para temperaturas $\geq 20^\circ\text{C}$, pela entropia, ($T\Delta S^\ddagger_{a,28^\circ\text{C},\text{AZA}} = 207,49 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $T\Delta S^\ddagger_{a,28^\circ\text{C},\text{AZB}} = 190,69 \text{ kJ mol}^{-1}$; $T\Delta S^\circ_{d,28^\circ\text{C},\text{AZA}} = 277,50 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $T\Delta S^\circ_{d,28^\circ\text{C},\text{AZB}} = 257,26 \text{ kJ mol}^{-1}$), o que indicou processos de compensação iso-cinética e de iso-equilíbrio. O sinal negativo de ΔG° revela que, no equilíbrio termodinâmico, a formação do complexo BLF-PhM é mais estável do que as moléculas livres de BLF e PhM em solução. O aumento do número de grupos metil na estrutura PhM causa um aumento nas taxas de associação e dissociação e K_b . O mesmo foi observado quando se comparam os corantes MVB e MV6B: a presença de carga no MV6B promoveu o aumento da taxa de associação e constante de ligação. Por outro lado, o aumento do grupo fenil (dois a três anéis) causa uma diminuição nos

valores de K_b . Valores positivos de ΔH° e ΔS° indicaram que as interações hidrofóbicas são fundamentais para estabilizar o complexo BLF-PhM. Nossos resultados ajudam a elucidar a dinâmica molecular da interação entre proteínas e corantes e as aplicações médicas e farmacêuticas dos corantes de fenotiazina e fenilmetanos.

Palavras-chave: Interação intermolecular. Proteína. Corante. Ressonância plasmônica de superfície.

ABSTRACT

PAULA, Hauster Maximiler Campos de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2021. **Determination of energies and energies of dye-interactions (phenothiazines and phenylmethanes) by surface plasmonic resonance technique.** Adviser: Luis Henrique Mendes da Silva. Co-advisers: Ana Clarissa dos Santos Pires, Maria do Carmo Hespanhol and Yara Luiza Coelho.

In recent years, the use of various organic dye molecules has increased for clinical and medical purposes, such as Auramine O, the phenothiazine Azure A (AZA) and blue B (AZB) dyes and the methyl violet phenylmethanes dyes (B, 2B, 6B and 10B). It is known that their functions and toxicity may be altered by protein interactions. However, there is no kinetic or thermodynamic information on the interactions of bovine serum albumin (BSA) with phenothiazine dyes and bovine lactoferrin (BLF) with phenylmethanes. In this work, surface plasmon resonance was used to determine the energy and molecular efficiency of the formation of BSA-phenothiazine and BLF-phenylmethanes at pH 7.4. BSA interacted with phenothiazine dyes (AZA and AZB) to form thermodynamically stable complexes (K_b of $2,1 \times 10^4$ and $2,39 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectively, at 298.15 K) at pH 7.4. At temperature 16 °C, activity formation ($\Delta H_{a,12^\circ\text{C},\text{AZA}}^\ddagger = -310.57 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $\Delta H_{a,12^\circ\text{C},\text{AZB}}^\ddagger = -256.37 \text{ kJ mol}^{-1}$) and thermodynamically stable ($\Delta H_{12^\circ\text{C},\text{AZA}}^\circ = -314.56 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $\Delta H_{12^\circ\text{C},\text{AZB}}^\circ = -265.73 \text{ kJ mol}^{-1}$) of BSA dye complexes were examined by enthalpy, while at temperatures ≥ 20 °C, by entropy, was the main parameter that guided the investigation ($T\Delta S_{a,28^\circ\text{C},\text{AZA}}^\ddagger = 207.49 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $T\Delta S_{a,28^\circ\text{C},\text{AZB}}^\ddagger = 190.69 \text{ kJ mol}^{-1}$; $T\Delta S_{d,28^\circ\text{C},\text{AZA}}^\circ = 277.50 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $T\Delta S_{d,28^\circ\text{C},\text{AZB}}^\circ = 257.26 \text{ kJ mol}^{-1}$), indicating iso-kinetic and iso-equilibrium compensation processes. The negative ΔG° sign revealed that in thermodynamic equilibrium, the formation of the BLF-PhM complex is more stable than the free molecules of BLF and PhM in solution. Increasing the number of methyl groups in the PhM structure causes an increase in association and dissociation rates and binding constant (K_b). The same was observed when comparing the methyl violet B (MVB) and methyl violet 6B (MV6B) dyes, in that the presence of specific loads in the MV6B structure promoted the increase of association rate and binding constant. On the other hand, the increase in the number of phenyl groups (two to three rings) causes a decrease in K_b values. The positive values of ΔH° and ΔS° indicated that hydrophobic

interactions are fundamental to stabilize the BLF-PhM complex. Our results help elucidating the molecular dynamics of protein-dye interactions and the medical and pharmaceutical applications of phenothiazine and phenylmethane dyes.

Keywords: Intermolecular interaction. Protein. Dye. Surface plasmonic resonance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Corantes	14
2.1.1 Classe quinonimina.....	14
2.1.2 Classe fenilmetanos.....	15
2.2 Proteínas.....	17
2.2.1 Albumina do Soro Bovino.....	20
2.2.2 Lactoferrina Bovina	21
2.3 Interação da BSA e BLF com corantes.....	23
2.4 Técnicas para o estudo de interações proteína-corante	26
2.4.1 Espectroscopia de Ressonância Plasmônica de Superfície	27
3 OBJETIVOS	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Produtos químicos e aparelhos.....	32
4.2 Soluções e métodos de preparação.....	32
4.3 Estudo cinético da interação da proteína – corante	33
4.4 Estudo termodinâmico da interação da proteína – corante.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Abordagem do complexo ativado para descrever interações intermoleculares da albumina do soro bovino – Azure A e da albumina do soro bovino – Azure B..	36
5.1.1 Análise da cinética de ligação da BSA-AZA e BSA-AZB usando RPS	36
5.1.2 Análise de parâmetros termodinâmicos de ligação BSA-AZA e BSA-AZB	43
5.1.3 Conclusão.....	46
5.2 Dinâmica e energética da interação da lactoferrina bovina com os corantes fenilmetanos seguida pela técnica de ressonância plasmônica de superfície	47
5.2.1 Caracterização da interação BLF-PhM pelo RPS	47

5.2.2 Efeito do número do grupo -CH ₃ nos parâmetros energéticos na formação do complexo [BLF-PhM] [‡]	51
5.2.3 Efeito de grupos fenil nos parâmetros energéticos na formação de complexos de transição [BLF-PhM] [‡]	53
5.2.4 Efeito da carga de fenilmetano nos parâmetros energéticos da formação do [BLF-PhM] [‡]	54
5.2.5 Termodinâmica do processo de formação do complexo BLF-PhM.....	56
5.2.6 Efeito do número do grupo -CH ₃ nos parâmetros termodinâmicos.....	57
5.2.7 Efeito dos grupos fenil nos parâmetros termodinâmicos	58
5.2.8 Efeito da carga nos parâmetros termodinâmicos.....	58
5.2.9 Conclusão.....	60
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
MATERIAIS SUPLEMENTARES	71

1 INTRODUÇÃO

Os corantes possuem inúmeras aplicações e vêm se destacando pelo seu uso nas áreas médica e farmacológica. Estudos mostraram que os corantes fenotiazínicos azure A (AZA) e azure B (AZB) atuam como agentes fototerápicos contra carcinomas, preveem a extensão de doenças cardíacas, inibem a formação de fibrilas β -amiloides, além de auxiliarem na identificação de doenças neurodegenerativas (KHAN *et al.*, 2015; VENNERSTROM *et al.*, 1995; WAINWRIGHT *et al.*, 2006). Assim como AZA e AZB, os corantes fenilmetanos (trifenilmetanos e difenilmetanos) (PhM) também são substâncias farmacológicas e podem atuar como agentes dermatológicos (XU *et al.*, 2009), antifúngicos (DOERGE *et al.*, 1998) e antivirais (MALEY *et al.*, 2013), além de serem utilizados na indústria têxtil e em aplicações tecnológicas (MITTAL *et al.*, 2008). Apesar disso, eles também são conhecidos como agentes tóxicos e mutagênicos (DENMAN *et al.*, 1996; LUECK *et al.*, 1992; POULIOS *et al.*, 2000).

Os corantes, ao formar um complexo termodinamicamente estável com a proteína (proteína-corante), pode diminuir sua toxicidade. Além disso, estes complexos podem ser utilizados como agente transportador do corante em organismos vivos. Porém, para otimizar o complexo proteína-corante como um composto medicamentoso é necessário determinar a energia e a velocidade de formação e dissociação desse complexo (EFTINK *et al.*, 1976).

Os corantes AZA e AZB possuem estrutura química semelhante, mas diferem no número de grupos $-CH_3$ ligados a estrutura do corante (AZA e AZB compreendem 2 e 3 grupos $-CH_3$, respectivamente), figura 1. Os corantes PhM, auramina O e violeta de metila (B, 2B, 6B e 10B) também possuem estruturas químicas semelhantes, diferindo apenas no número de grupos fenil e $-CH_3$ ligados em sua estrutura e/ou na presença ou ausência de carga, figura 2. A diferença estrutural dos corantes fenotiazínicos e PhM permite investigar e avaliar o efeito do grupo funcional sobre os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação desses corantes com proteínas.

As proteínas albumina do soro bovino (BSA) e a lactoferrina bovina (BLF) apresentam funções estratégicas nos processos biológicos das células. A BSA é responsável pela manutenção do pH sanguíneo, no transporte de substâncias endógenas e exógenas, auxilia no controle da pressão osmótica, dentre outras funções (MATHEW *et al.*, 2013). Já a BLF apresenta atividades biológicas importantes

como as antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, além de ser a principal proteína do leite que liga o ferro. Além de ser a principal responsável pela regulação do nível de ferro nos vertebrados (WALLY *et al.*, 2007).

As interações de BSA com AZA ou AZB foram estudadas usando técnicas espectroscópicas (ultravioleta-visível, infravermelho com transformada de Fourier, dicroísmo circular e fluorescência resolvida no tempo) e calorimetria (DAS *et al.*, 2016; SHARMA *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2016). Os resultados indicaram que os corantes AZA ou AZB foram fortemente ligados ao sítio hidrofóbico de Sudlow I da BSA e este processo foi entalpicamente conduzido ($\Delta H^{\circ}_{AZA} = -4.12 \pm 0.081 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta H^{\circ}_{AZB} = -2.38 \pm 0.041 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente) (DAS *et al.*, 2016).

Dados obtidos por ressonância plasmônica de superfície (RPS) mostraram que a interação BLF-CM (curcumina), em pH 7,4, ocorreu em várias etapas e envolve alterações conformacionais na BLF. Para $T < 293,15 \text{ K}$, o processo de ligação do BLF-CM é endotérmico, mas para $T > 293,15 \text{ K}$ esse processo é exotérmico. Os autores mostraram que a interação BLF-CM é caracterizada por compensações entalpia-entropia e isocinéticas (LELIS *et al.*, 2020). Coelho e colaboradores, 2019 investigaram a interação de BLF com os corantes fenotiazínicos azul de metileno (AM) e AZA. Os resultados mostraram que o AM (4 -CH₃) apresenta valores menores das constantes cinéticas de associação (k_a) e dissociação (k_d) em relação ao AZA (2 -CH₃), e o processo de formação do complexo termodinamicamente estável do BLF-MB ou BLF-AZA foi entropicamente dirigido (LUIZA *et al.*, 2019).

Esses estudos mostram que o número de grupos funcionais ligados à estrutura do corante afeta diretamente a cinética e a termodinâmica da interação com as proteínas. Até onde sabemos, nenhum estudo cinético sobre as interações entre BSA e AZA ou AZB e BLF-PhM foi realizado até o momento. Portanto, é fundamental descrever a dinâmica molecular das interações da proteína-corantes, medindo os parâmetros termodinâmicos e cinéticos associados a essas interações por RPS (HUDSON *et al.*, 2019; NUNES *et al.*, 2019; PAULA *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a técnica de ressonância plasmônica de superfície (RPS) é estratégica para investigar as interações entre proteínas-ligante. RPS é uma técnica livre de marcadores e de análise em tempo real, que permite obter os parâmetros cinéticos (energia de ativação (E_{act}), variação da energia livre de Gibbs de ativação (ΔG^{\ddagger}), variação da entalpia de ativação (ΔH^{\ddagger}) e a variação da entropia de ativação

($T\Delta S^\ddagger$) dos processos de associação e dissociação, constante de associação (k_a) e constante de dissociação (k_d) e termodinâmicos constante de ligação (K_b), variação da entalpia padrão (ΔH°), variação da energia livre de Gibbs (ΔG°) e variação da entropia ($T\Delta S^\circ$) da formação dos complexos proteína-ligante (PATCHING, 2014). Nos últimos anos, pesquisadores relataram o uso da tecnologia RPS para investigar a interação de proteínas-drogas (JUHÁSZ *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2017; MOWLA *et al.*, 2018; PATCHING, 2014), proteína-corante (COELHO *et al.*, 2019; DE PAULA *et al.*, 2017), proteína-aditivo alimentar (FATHI *et al.*, 2018), proteína-nanopartícula (ATALE *et al.*, 2019), proteína-substância de baixo peso molecular (PATIL *et al.*, 2016), proteína-polifenol (REZENDE *et al.*, 2019, 2020).

Nesse trabalho, investigaram-se as interações entre BSA-AZA, BSA-AZB e BLF-PhM usando a técnica RPS para a determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos para uma melhor compreensão da dinâmica molecular e das mudanças energéticas associadas a essas interações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Corantes

Os corantes são compostos químicos que, aplicados em solução, se fixam em vários substratos como tecido, cabelo, couro e possuem uma ampla gama de aplicações como nas indústrias têxteis, papel, borracha, cosméticos, alimentícios, clínica, medicinal etc. (ZANONI *et al.*, 2016).

Os corantes são capazes de absorver e emitir luz na faixa espectral de 400 a 700 nm. De acordo com Isenmann, são conhecidos mais de 50 grupos cromóforos (grupos funcionais que contribuem para absorvidade molar do composto). Há uma classificação dos corantes quando aos grupos cromóforos que a compõem, como os grupos antraquinona, acridina, fenilmetanos, azo, quinonimina, dentre outros (ISENMANN, 2013; KRAY, 2016).

Alguns corantes da classe quinonimina, como o azure A (AZA) e azure B (AZB), ganharam destaque por suas aplicações no campo da medicina e em testes clínicos na identificação de precursores de doenças e outras aplicabilidades, bem como os corantes do grupo fenilmetanos por seu amplo uso em indústrias e, também, na medicina (MALEY *et al.*, 2013; PAUL *et al.*, 2013; PETZER *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2014).

2.1.1 Classe quinonimina

Os corantes AZA e AZB pertencem à classe de corantes quinonimina. São subprodutos da degradação do azul de metileno que pertence ao subgrupo tiazina. Os corantes fenotiazínicos AZA e AZB possuem estruturas semelhantes (figura 1), e são solúveis em meio aquoso, ácido acético, éter e benzeno (KRAY, 2016).

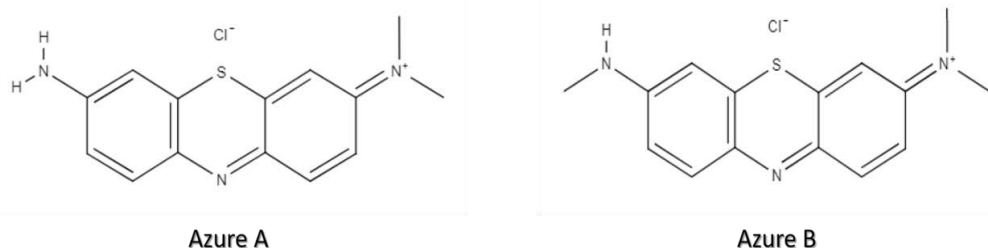


Figura 1. Estrutura dos corantes Azure A e Azure B.

O AZB com fórmula molecular, nome IUPAC N',N'-dimetilphenothia-5-zina-3,7-diamina cloreto ($C_{15}H_{16}ClN_3S$), massa molar de $305,83 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, é um corante básico com várias aplicações. Apresenta características antitumorais e anti-inflamatórias. É utilizado na coloração do DNA, produtos sanguíneos, além de possuir aplicação biológica no tratamento da malária e no diagnóstico de doenças neurodegenerativas (ČULO *et al.*, 1991; PETZER *et al.*, 2012; VANNERSTROM *et al.*, 1995; WISCHIK *et al.*, 1996).

O AZA, nome IUPAC Cloreto de N',N'-dimetilfenotia-5-zina-3,7-diamina ($C_{14}H_{14}ClN_3S$), é um agente terapêutico com amplas propriedades biológicas. Tem seu uso no tratamento de doenças angiogênicas. Além de auxiliar na redução da extensão das arritmias cardíacas e possuir propriedades antimaláricas. AZA também apresenta aplicações tecnológicas como seu uso em sensores eletroquímicos com nanotubos de carbono, dispositivos eletrocromáticos, células de energia solar, sensores óticos e células fotovoltaicas (HUANG *et al.*, 2010; KHAN *et al.*, 2015; VANNERSTROM *et al.*, 1995; WAINWRIGHT *et al.*, 2006).

AZA e AZB possuem coeficiente de absorvidade elevado e em soluções aquosas possuem uma banda de absorção de 637 e 652 nm, respectivamente. São moléculas fluorescentes, quando monômeros, exibindo um espectro de emissão no comprimento de onda 600 a 750 nm, e quando há auto-agregação provoca a extinção da fluorescência (LEWIS *et al.*, 1943; SEARCH *et al.*, 1979).

2.1.2 Classe fenilmetanos

Os corantes trifenilmetanos e difenilmetanos são da classe dos fenilmetanos e possuem várias aplicações em diversos segmentos como nas indústrias têxtil e, também, na medicina. São consideravelmente tóxicos e pouco solúveis em água ($1 \text{ a } 4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e apresentam alta intensidade de cor (DENMAN *et al.*, 1996; LUECK *et al.*, 1992; POULIOS *et al.*, 2000).

Os corantes auramina O (AO), violeta de metila B (MVB), violeta de metila 2B (MV2B), violeta de metila 6B (MV6B) e violeta de metila 10 B (MV10B), são exemplos da classe dos fenilmetanos e possuem suas estruturas química semelhantes. São compostos por anéis aromáticos com duplas ligações conjugadas, figura 2.

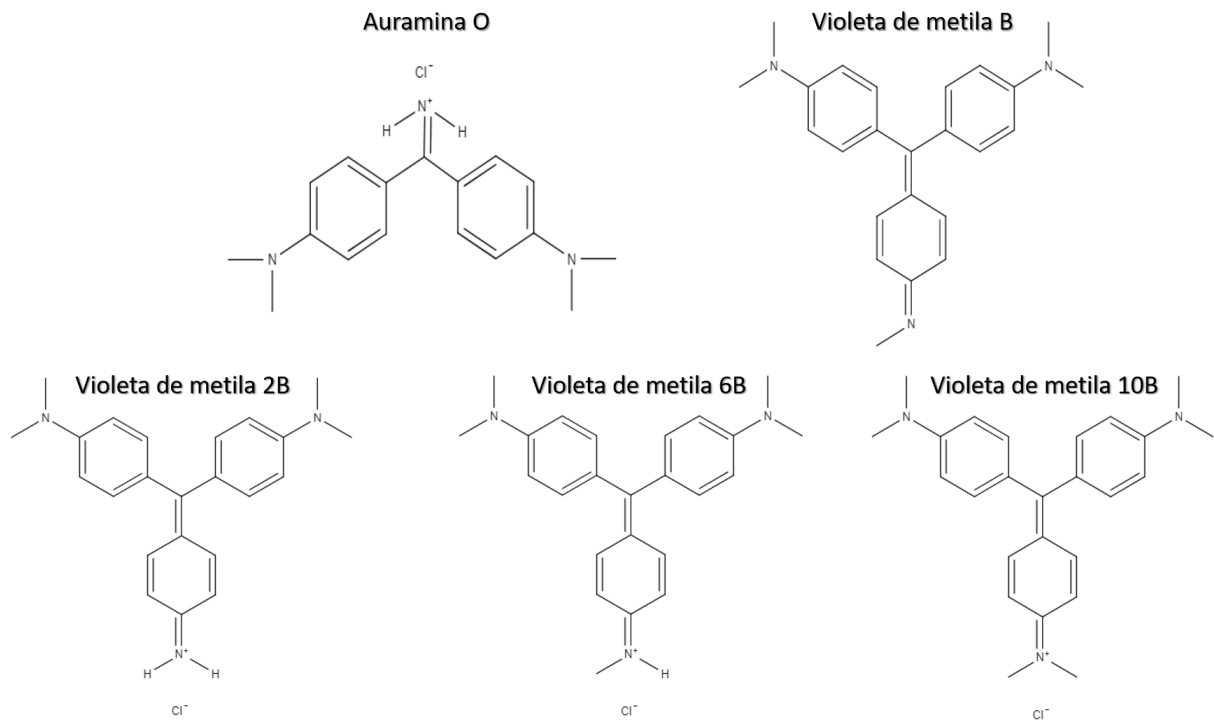


Figura 2. Estrutura química dos corantes fenilmetanos.

O AO [(4,4'- (imidocarbonil) bis (N,N-dimetilamina) monohidrocloro], com massa molar de 303,83 g.mol⁻¹, é um corante catiônico, difenilmetano. Exibe baixa intensidade de fluorescência em água, mas sua fluorescência aumenta em solventes viscosos e meios microheterogênicos, como surfactantes e proteínas (FERREIRA *et al.*, 2013; HASEGAWA *et al.*, 1994; MWALUPINDI *et al.*, 1994; PEREIRA *et al.*, 2006).

O MV6B possui massa molar de 393,95 g.mol⁻¹ e fórmula molecular C₂₄H₂₈ClN₃, com $\lambda_{\text{máx}} = 586$ nm. É um corante trifenilmetano básico com coloração intensa. A ingestão, inalação ou o contato com a pele pode causar danos à pele, aos olhos e ao organismo, sendo classificado como um corante tóxico e cancerígeno. A toxicidade do composto é relacionada aos produtos tóxicos provenientes da sua decomposição como monóxido e dióxido de carbono, óxido de nitrogênio e ácido clorídrico. Por causa dessas propriedades, quando em curso d'água pode dificultar o crescimento de bactérias e a fotossíntese de plantas aquáticas. Seu uso no campo da medicina é na classificação primária de bactérias, além de ser utilizado como antialérgico e bactericida. Em pH a baixo de 1,6 tem coloração amarela e em pH acima de 1,6 torna-se violeta azulada (HAMEED, 2008; MITTAL *et al.*, 2008; SLOKAR *et al.*, 1998).

Os corantes MVB e MV2B possuem vasta aplicação na área industrial, mas apresentam características singulares em aplicações clínicas, medicinais nos processos biológicos e histopatológicos e, também, aplicações tecnológicas como sensores de radiação gama e células fotovoltaicas (GÜLLÜ *et al.*, 2008; NAKAGAWA *et al.*, 2016; ZEYADA *et al.*, 2012).

O MV10B ($C_{25}H_{30}ClN_3$), com massa molar $407,95 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, é conhecido comercialmente como violeta genciana, apresenta inúmeras aplicações no campo da medicina como agente antifúngico, antiviral e um agente dermatológico. Também é utilizado na indústria têxtil e na impressão de papel. Entretanto, é classificado, também, como uma agente tóxico e mutagênico. Pode ser utilizado como indicador de pH no intervalo de 0 a 1,8, e seu ponto de viração é de amarelo a azul arroxeado (XU *et al.*, 2009).

2.2 Proteínas

As proteínas são macromoléculas, compostas por aminoácidos, que desempenham funções fundamentais nos processos químicos e biológicos de organismos vivos. As funções das proteínas estão diretamente ligadas às suas formas estruturais e tridimensionais, que podem ser classificadas em três grandes grupos: proteínas de membrana, estrutural e globular (ALMEIDA, 2016; ZHANG *et al.*, 2009).

As proteínas de membrana atuam como transportadores de substâncias para dentro ou fora das células. As proteínas estruturais são constituídas de cadeias lineares de aminoácidos, formando filamentos, e atuam na sustentação no meio biológico. Já as proteínas globulares podem agir como anticorpos, apresentar ação enzimática, ação transportadora e regulamentadora (SILVA, 2005).

A forma estrutural da proteína é caracterizada pela sequência de aminoácidos que a compõe e pelas interações entre esses aminoácidos (CAGNIN, 2010). A figura 3 mostra a estrutura química de um aminoácido.

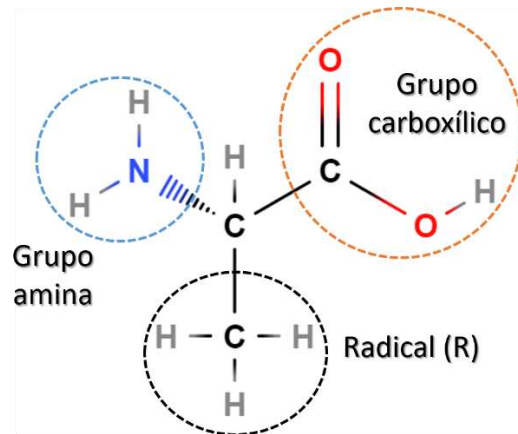


Figura 3. Estrutura do aminoácido alanina.

O aminoácido é composto por um carbono central ligado a um grupo amina (NH₂), um grupo carboxílico (COOH), um átomo de hidrogênio (H) e um radical R (cadeia lateral). O radical R é característico de cada aminoácido e pode variar por sua estrutura, tamanho e carga elétrica. Há mais de 300 tipos de aminoácidos diferentes, mas nem todos formam proteínas. Os aminoácidos podem ser classificados como hidrofóbicos, hidrofílicos ou anfipáticos (ALMEIDA, 2016).

Durante a formação das proteínas os aminoácidos se ligam através de ligações covalentes, denominadas ligações peptídicas, que é o resultado da condensação do grupo carboxila de um aminoácido com o grupo amina de um segundo aminoácido, liberando uma molécula de água nessa reação, figura 4.

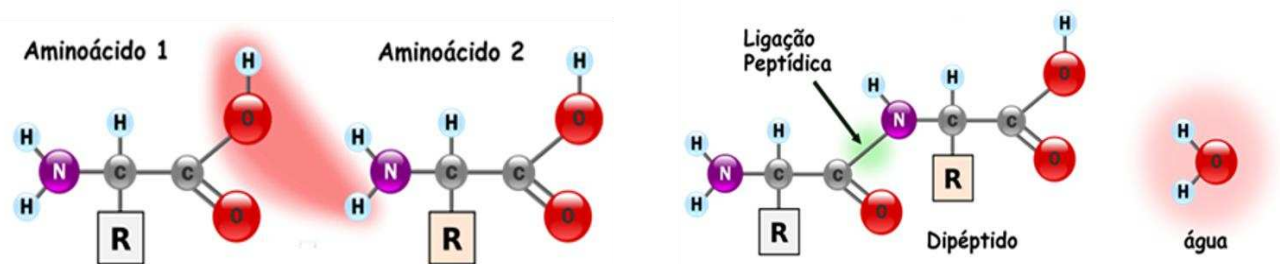


Figura 4. Reação da ligação peptídica (explicatorium.com/química/proteina.php, acesso: nov-2019).

A disposição desses aminoácidos é um dos fatores que caracterizará sua estrutura tridimensional e sua funcionalidade. As proteínas apresentam quatro níveis estruturais: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária.

- Estrutura primária: é o nível estrutural mais simples. Os aminoácidos são acoplados pela ligação peptídica, formando uma sequência de aminoácidos, característico de cada proteína, descrevendo sua estrutura linear. Nessa estrutura, podem ocorrer mudanças na composição, na sequência e no número de aminoácidos.
- Estrutura secundária: são arranjos estruturais regulares, causados pelos contatos locais entre os aminoácidos das cadeias polipeptídicas, onde estes se conformam em estruturas alfa-hélice e folhas-beta. As alfa-hélices possuem aminoácidos que interagem entre si formando uma estrutura espiral estabilizada basicamente por ligações de hidrogênio. Já as folhas-beta diferem estruturalmente das alfa-hélices, porque suas associações ocorrem nas laterais das cadeias polipeptídicas que se estendem em formas de fita, e são, também, estabilizadas por ligações de hidrogênio.
- Estrutura terciária: é a conformação tridimensional, resultante das interações físicas e químicas que se formam das cadeias laterais dos aminoácidos. Relaciona-se com as mudanças estruturais, torções e dobras da cadeia proteica e combinação de estruturas secundárias.
- Estrutura quaternária: são os arranjos estruturais formados pela combinação de duas ou mais cadeias proteicas terciárias, formando complexos de multi-unidades.

A formação de uma proteína, da sua estrutura primária à quaternária, é ilustrada como esquema e apresentada na figura 5.

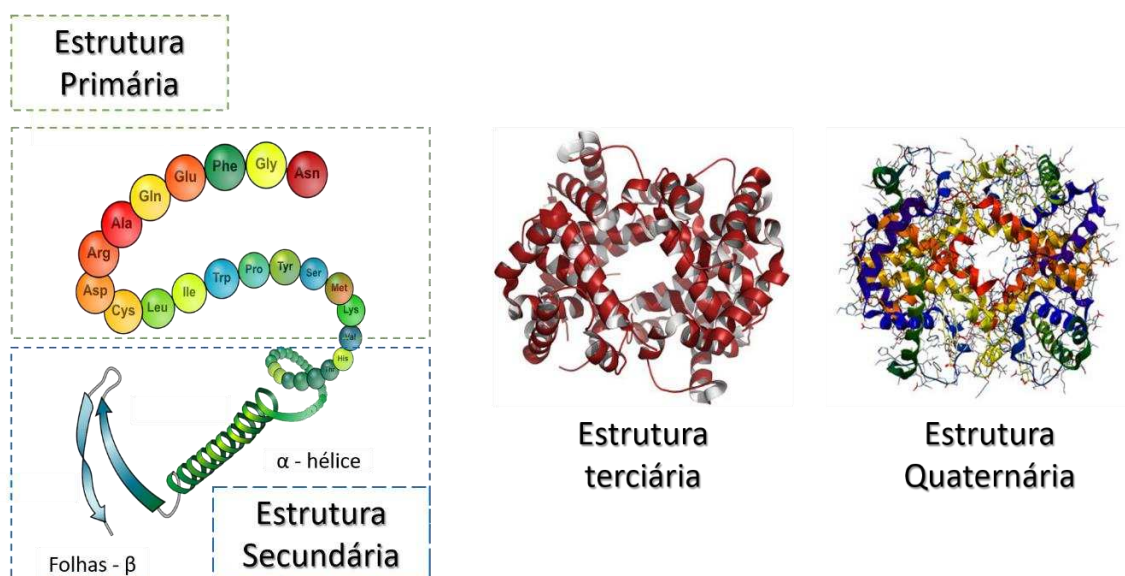


Figura 5. Esquema de formação de uma proteína da estrutura primária a quaternária (zerp0ii.opentronix.com e brasilecola.uol.com.br, acesso: set-2019).

As interações que ocorrem nos aminoácidos estabilizam termodinamicamente a estrutura da proteína até sua forma tridimensional nativa, permitindo assim a sua função biológica, que deve ser mantida sem modificação para preservar sua função biológica. Algumas proteínas como as albuminas sérica e a lactoferrina merecem destaque devido a suas características singulares.

2.2.1 Albumina do Soro Bovino

A albumina do soro bovino (BSA) é uma proteína globular responsável por diversas funções como: o transporte e distribuição de vários corantes e drogas no sangue e demais ligantes endógenos e exógenos; atua como carreador de ácidos graxos, os quais são insolúveis no plasma sanguíneo; auxilia no controle da pressão osmótica e na manutenção do pH sanguíneo; e é uma das proteínas mais abundantes do plasma sanguíneo, representando aproximadamente 60% da proteína total (FLARAKOS *et al.*, 2005).

A BSA possui massa molar de 66,4 kDa e aproximadamente 583 aminoácidos. O ponto isoelétrico é em pH próximo a 4,8. Formada por principalmente estruturas α -hélice a BSA possui três domínios homólogos específicos (I, II e III) e cada domínio consiste em dois subdomínios (A e B), apresentando em sua estrutura dois resíduos de triptofano, denominados Trp-134 e Trp-212, localizadas no subdomínio IB e IIA, induzindo a fluorescência a 295 nm (SHI *et al.*, 2016). A figura 6 mostra a estrutura da BSA.

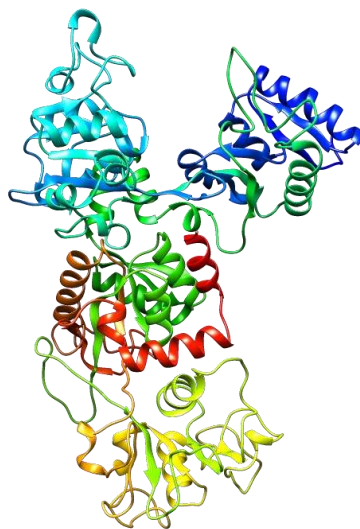


Figura 6. Estrutura da BSA.

A BSA em temperaturas elevadas, entre 40° a 45° C, pode sofrer um desdobramento parcial, expondo seu grupo hidrofóbico e pode ocorrer interação com demais compostos (MOREIRA *et al.*, 2015; MORR *et al.*, 1993). A BSA possui uma semelhança estrutural com a albumina do soro humano (HSA) de 76 %.

Quanto mais forte for a ligação da BSA com drogas ou corantes, menor será a concentração da droga livre no plasma sanguíneo e, em contrapartida, quanto mais fraca for a interação entre a droga e a BSA mais curta será a duração da ação da droga e, conseqüentemente, pode haver uma fraca distribuição da droga no sistema circulatório. No entanto, a força da interação da BSA com a molécula poderá afetar seu metabolismo, distribuição e a toxicidade do composto. Portanto, investigar os parâmetros energéticos, as propriedades termodinâmicas e as forças intermoleculares que regem a interação da BSA com corantes é estratégico para conhecermos a dinâmica molecular e os mecanismos de interação entre os parceiros de interação (MOLINA-BOLÍVAR *et al.*, 2014; NAIK *et al.*, 2013).

2.2.2 Lactoferrina Bovina

A lactoferrina bovina (BLF) é uma proteína que possui em sua estrutura 700 aminoácidos e com massa molar de aproximadamente 80 kDa. A BLF é uma proteína básica e seu ponto isoelétrico é entre 8,0 e 8,5. Possui dois lobos simétricos (lobos N e C), aminoácidos 1 – 332 para o lobo N e aminoácidos 344 – 700 para lobo C, ligados a uma α -hélice, além de ter alta homologia entre as espécies. A BLF desempenha uma função reguladora de ferro a nível celular. Entretanto, sua estrutura pode ser livre do íon Fe^{3+} (alo-BLF) ou ligado ao íon Fe^{3+} (holo-BLF), e essa ligação ao ferro pode causar mudanças em sua estrutura tridimensional. A figura 7 mostra a estrutura tridimensional da BLF (GARCÍA-MONTOYA *et al.*, 2012; WALLY *et al.*, 2007).

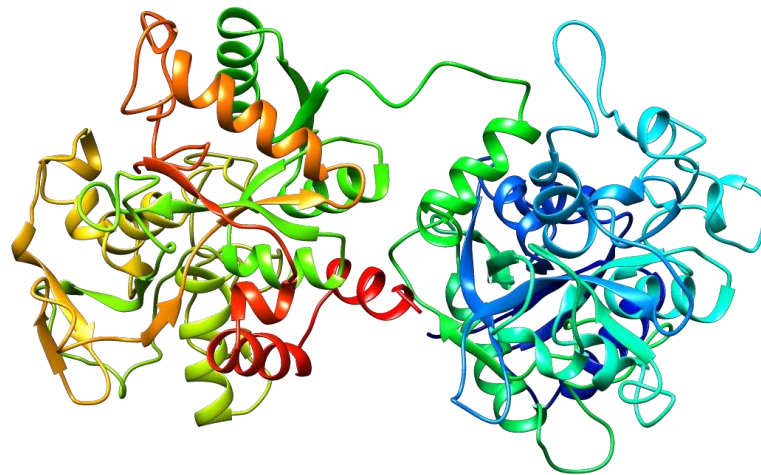


Figura 7. Estrutura tridimensional da lactoferrina bovina.

A BLF é imunomoduladora, antimicrobiana, antioxidante, anticâncer, nutracêutica, dentre outras. A BLF auxilia na formação do sistema imunológico do organismo e pode ser encontrada em fluidos corporais como lágrima e saliva, mas sua maior concentração é proveniente do leite (1 g.L^{-1}) e no colostro (7 g.L^{-1}). A maior concentração é encontrada no colostro e é essencial para a formação do sistema imunológico de recém-nascidos. Pode ser encontrada também no plasma sanguíneo com concentração de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$, mas no caso de infecções essa concentração pode aumentar até 5000 vezes. Essas características são de grande interesse tanto para pesquisas quanto para as indústrias (GONZÁLEZ-CHÁVEZ *et al.*, 2009; IGLESIAS-FIGUEROA *et al.*, 2019).

A ação antibacteriana da BLF é devido ao sequestro do ferro nos locais de infecção, o que diminui a quantidade de nutriente para o micro-organismo e, também, pela ligação da BLF com o micro-organismo infeccioso. Por ser carregada positivamente permite a proteína se ligar na superfície celular do sistema imunológico e essas ações evidenciam a BLF como modulador do sistema imunológico. A BLF pode ser isolada do leite da vaca, por exemplo, por métodos de purificação. Atualmente a proteína está sendo utilizada em suplementos alimentares para recém-nascidos, animais, bebidas, leite fermentado, creme dental etc., para auxiliar no sistema imunológico (IGLESIAS-FIGUEROA *et al.*, 2019).

Na literatura encontram-se diversos trabalhos relatando o efeito eficaz da BLF no tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias e fungos, em animais e humanos, e suas funcionalidades. Entretanto, é necessário o estudo das interações

intermoleculares da BLF com diferentes ligantes para uma melhor compreensão dos seus mecanismos de ação, bem como potencializar as suas funções e aplicabilidades (EMBLETON *et al.*, 2013; GARCÍA-MONTOYA *et al.*, 2012; WALLY *et al.*, 2007).

As proteínas são sensíveis a alterações que possam ocorrer no meio fisiológico. Essas alterações podem afetar a conformação estrutural da proteína, levando a desnaturação. Alguns desses fatores são a mudança no pH do meio, força iônica, temperatura, presença de cossolutos e cossolventes, outros ligantes, dentre outros fatores. Em contrapartida as proteínas estão envolvidas em diferentes interações que conferem a elas funções singulares nos processos biológicos. A diversidade funcional das proteínas combinada com a variedade de ligantes, que formam diferentes complexos, revela a possibilidade de produzir respostas multivariadas e multidirecionais como, por exemplo, a descoberta de novos fármacos e a potencialização de outras funções.

Para uma melhor compreensão das funções das proteínas é fundamental elucidar os mecanismos responsáveis pelas interações proteína-ligante. Para descrever esses mecanismos é necessário determinar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos que governam a formação do complexo.

2.3 Interação da BSA e BLF com corantes

Diante das inúmeras aplicações de corantes em ensaios clínicos e na medicina, estudos têm sido realizados para elucidar os mecanismos de ligação desses corantes às proteínas BSA e BLF.

A investigação da interação do AZB com as proteínas BSA e HSA foi estudada por técnicas de espectroscopia UV/Vis, fluorescência resolvida no tempo e dicroísmo circular. Este estudo revelou que o comportamento espectral de absorção do AZB na presença de diferentes concentrações da BSA e HSA leva à formação de agregados dos corantes dentro das cavidades proteicas e que o corante se liga às proteínas em mais de um local de ligação, com constantes de ligação de $5,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com HSA e $7,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com BSA, por interação cooperativa. Já os estudos computacionais mostram que o AZB se liga ao sítio de ligação I da BSA e HSA (SHARMA *et al.*, 2016).

Sharma e colaboradores estudaram a interação do AZA com BSA e HSA por espectroscopia UV/Vis, fluorescência e dicroísmo circular. Os parâmetros de ligação

indicaram que o processo é espontâneo e com constantes de ligação dos complexos BSA-AZA e HSA-AZA de $2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $4,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Os ensaios de competição sugeriram que o corante AZA liga-se ao sítio hidrofóbico I (subdomínio IIA) da BSA e da HSA. Os dados de dicroísmo circular mostraram que o AZA induz mudanças conformacionais nas proteínas BSA e HSA (SHARMA *et al.*, 2014).

Xu e colaboradores estudaram a interação da BSA com MV10B pelas técnicas espectroscópicas de UV/Vis e fluorescência nas temperaturas de $291 \text{ }^\circ\text{C}$, $298 \text{ }^\circ\text{C}$ e $303 \text{ }^\circ\text{C}$. O MV10B em baixas concentrações ($1 \text{ a } 9 \times 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$) provocou a extinção da fluorescência na BSA. A formação do complexo [BSA-MV10B] é espontânea com constante de ligação de $4,54 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Os valores positivos de ΔH° e $T\Delta S^\circ$ indicaram que forças hidrofóbicas são mais pronunciadas para estabilização do complexo [BSA-MV10B], no pH 7,4. O estudo do complexo pela espectroscopia de fluorescência síncrona revela que a interação da BSA com o MV10B não afeta a polaridade e a conformação na microrregião do triptofano. Os autores investigaram ainda a influência de íons metálicos (K^+ , Co^{2+} e Fe^{3+}), na formação do complexo, na temperatura de 291 K , e notaram que a constante de ligação do complexo [BSA-MV10B] diminuiu de $60,1 \%$ a $65,6 \%$. Atribuíram que essa diminuição da constante de ligação é devido a ligações não específicas entre a BSA com MV10B (XU *et al.*, 2009).

De acordo com Baptista e Indig (1998), a molécula de BSA apresenta valores de constantes de baixa e alta afinidade ao interagir com compostos. Ao investigar a interação entre a BSA e os corantes violeta de etila (EV) e MV10B mostrou que os locais de ligação, na BSA, através da montagem não linear dos dados experimentais para isotermas de ligação do tipo Langmuir, apresentaram os valores de constante de ligação para baixa e alta afinidade como $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $3,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente, para o complexo BSA-MV10B, e $3,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para a formação do complexo BSA-EV (BAPTISTA *et al.*, 1998).

Para otimizar as aplicações terapêuticas do corante vermelho congo (VC), de Paula e colaboradores (2017), estudaram a cinética e a termodinâmica de interação da BSA com VC pela técnica de RPS e fluorescência. A BSA interage com VC através de um complexo de transição que requer uma absorção de energia ($E_{\text{act, a}} = 35,88 \text{ kJ mol}^{-1}$) através das moléculas livres de BSA e VC e de ($E_{\text{act, d}} = 20,17 \text{ kJ mol}^{-1}$) através do complexo BSA-VC. A constante de ligação, em pH 7,4 e a 298 K , do complexo

[BSA-VC] é $5,91 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ pela técnica de RPS e de $3,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ pela técnica de fluorescência. Entretanto, as medições de RPS indicam que essa interação é endotérmica, e para fluorescência é exotérmica. A técnica de fluorescência detecta interações que ocorrem em locais próximos aos resíduos de triptofano, enquanto que o RPS pode detectar interações que ocorrem em todos os locais da BSA. Os diferentes resultados obtidos pelas técnicas sugerem que há mais de um local onde a BSA interage com o VC (DE PAULA *et al.*, 2017).

A termodinâmica de interação do corante vermelho 40 (V40) com a BSA em pH 7,4 foi investigada por Lelis e colaboradores (2017), utilizando as técnicas espectroscopia de fluorescência e de calorimetria de titulação isotérmica. O mecanismo de extinção da fluorescência foi induzido pela formação do complexo BSA-V40. A interação da BSA com V40 formando o complexo [BSA-V40] tem uma constante de ligação de $3,99 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, a 298,15 K. Os valores de ΔH° e $T\Delta S^\circ$, indicaram que as interações hidrofóbicas foram mais pronunciadas para estabilização do complexo [BSA-V40] e que a interação foi impulsionada pelo aumento da entropia (LELIS *et al.*, 2017).

A interação da BSA com o corante alimentar amarelo de quinolina (AQ) foi investigada pelas técnicas espectroscópicas de UV/Vis, fluorescência, fluorometria e dicroísmo circular. Os resultados mostraram que a interação do corante com a BSA causa extinção estática da proteína, devido à formação do complexo [BSA-AQ] com uma constante de ligação de $3,37 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, a 296,15 K. Os valores negativos de ΔH° e positivos de $T\Delta S^\circ$ indicam que as forças de van der Waals e as ligações de hidrogênio foram fundamentais para estabilização do complexo [BSA-AQ] e que a formação do complexo através das moléculas livres de AQ na BSA induzem uma mudança conformacional na molécula da BSA (SHAHABADI *et al.*, 2012)

Coelho e colaboradores (2019) investigaram a cinética e termodinâmica de interação dos corantes AZA e AM com a BLF pelas técnicas de RPS, espectroscopia de fluorescência e microcalorimetria de titulação isotérmica, em pH 7,4. Os corantes fenotiazínicos AZA e AM interagem com a BLF formando os complexos termodinamicamente estáveis [BLF-AZA] e [BLF-AM]. Entretanto, a interação do corante AZA com a BLF é mais forte quando comparada ao corante AM. De acordo com os dados de RPS e fluorescência a interação dos corantes com a BSA foram induzidos pelo aumento da entropia. A formação do complexo termodinamicamente

estável ocorre através de complexos intermediários [BLF-AZA][‡] e [BLF-AM][‡]. A formação dos complexos através das moléculas livres do corante AZA e AM com a BSA apresenta parâmetros de associação semelhantes, mas a dissociação dos complexos [BLF-AZA] e [BLF-AM] para a formação dos complexos intermediários são muito dependes das estruturas moleculares dos corantes (COELHO *et al.*, 2019).

Zhang e colaboradores (2009), estudaram a interação da BSA com o corante verde malaquita (MG) pelas técnicas de espectroscopia de fluorescência, absorção por UV/Vis e dicroísmo circular. Os dados de fluorescência mostraram que a formação do complexo termodinâmico [BSA-MG] ocorre causando a extinção da fluorescência da BSA. A constante de ligação para o complexo é de $3,26 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, a 298,15 K. A variação da entalpia ($\Delta H^\circ = -27,25 \text{ kJ mol}^{-1}$) e de entropia ($T\Delta S^\circ = -11,23 \text{ kJ mol}^{-1}$) indicaram que as forças de van der Waals e as ligações de hidrogênio desempenham papel fundamental na estabilização do complexo final [BSA-MG]. Através dos experimentos de competição de marcadores de local, indicou-se ainda que o MG interage principalmente no subdomínio IIA da BSA. Os resultados do estudo com o dicroísmo circular revelaram que a presença do MG causa modificação conformacional na molécula da BSA (ZHANG *et al.*, 2009).

2.4 Técnicas para o estudo de interações proteína-corante

As técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular, Raman e UV/Vis são utilizadas para estudar possíveis alterações ocorridas nas proteínas devido ao processo de ligação com outros compostos. Já as técnicas de nanocalorimetria de titulação isotérmica, nanocalorimetria exploratória diferencial, espectroscopia de fluorescência e ressonância plasmônica de superfície (RPS) são técnicas sensíveis que permitem, com o auxílio de modelos matemáticos, calcular parâmetros termodinâmicos (ΔG° , ΔH° e ΔS°), e cinéticos, como a constante de associação e dissociação e de ligação (k_a , k_d e K_b), da interação proteína-soluto e, também, os parâmetros cinéticos da formação dos possíveis complexos de transição (ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger) e as energia de ativação (E_{act}).

2.4.1 Espectroscopia de Ressonância Plasmônica de Superfície

A RPS é uma técnica sensível, livre de marcadores, e de análise em tempo real. É uma técnica estratégica para monitorar as interações intermoleculares em diferentes sistemas (proteína-aditivos alimentares, proteína-corante, proteína-drogas), porque permite a avaliação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos, obtidos pelas constantes cinéticas de associação (k_a) e dissociação (k_d) e constante de ligação (K_b). (DE PAULA *et al.*, 2017; FATHI *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2017).

A ressonância plasmônica de superfície é uma técnica ótica que detecta a mudança no índice de refração do meio que ocorre nas proximidades de uma superfície de um metal. Essa técnica foi desenvolvida utilizando a tecnologia Biacore. No instrumento Biacore a superfície do sensor (sensor-chip) é um filme metálico (geralmente, filme de ouro com espessura de 50 a 100 nm) sob um prisma de vidro, formando o piso de uma célula de fluxo no qual uma solução aquosa flui continuamente. O sistema conta com um fotodetector e uma fonte monocromática luminosa (PATIL *et al.*, 2016; RIBEIRO, 2014).

Para monitorar a interação que ocorre entre a molécula receptora com um ligante, a molécula receptora, geralmente uma proteína, é imobilizada na superfície do sensor-chip e o ligante (chamado de analito) é injetado na solução aquosa pela célula de fluxo. A luz polarizada incide sobre a superfície inferior do sensor-chip gerando um plasma de elétrons em um ângulo crítico de luz incidente. Os plasmas de elétrons absorvem parte da energia da radiação incidente, originando um campo eletromagnético evanescente (onda evanescente). Essa absorção causa uma diminuição na intensidade da luz incidente. O ângulo crítico depende diretamente do índice de refração do meio dentro de 300 nm da superfície do ouro. O ângulo crítico muda, por exemplo, quando as moléculas do ligante interagem com as moléculas receptoras imobilizadas no sensor-chip causando um aumento no índice de refração do meio que é expresso em unidade de ressonância (ou resposta), RU. A mudança no índice de refração é acompanhada em tempo real e os dados são apresentados em um gráfico de RU em função do tempo (RU vs. t), chamado sensorgrama. A figura 8 mostra uma ilustração básica do sistema da Biacore (DE CARVALHO *et al.*, 2003; PATCHING, 2014).

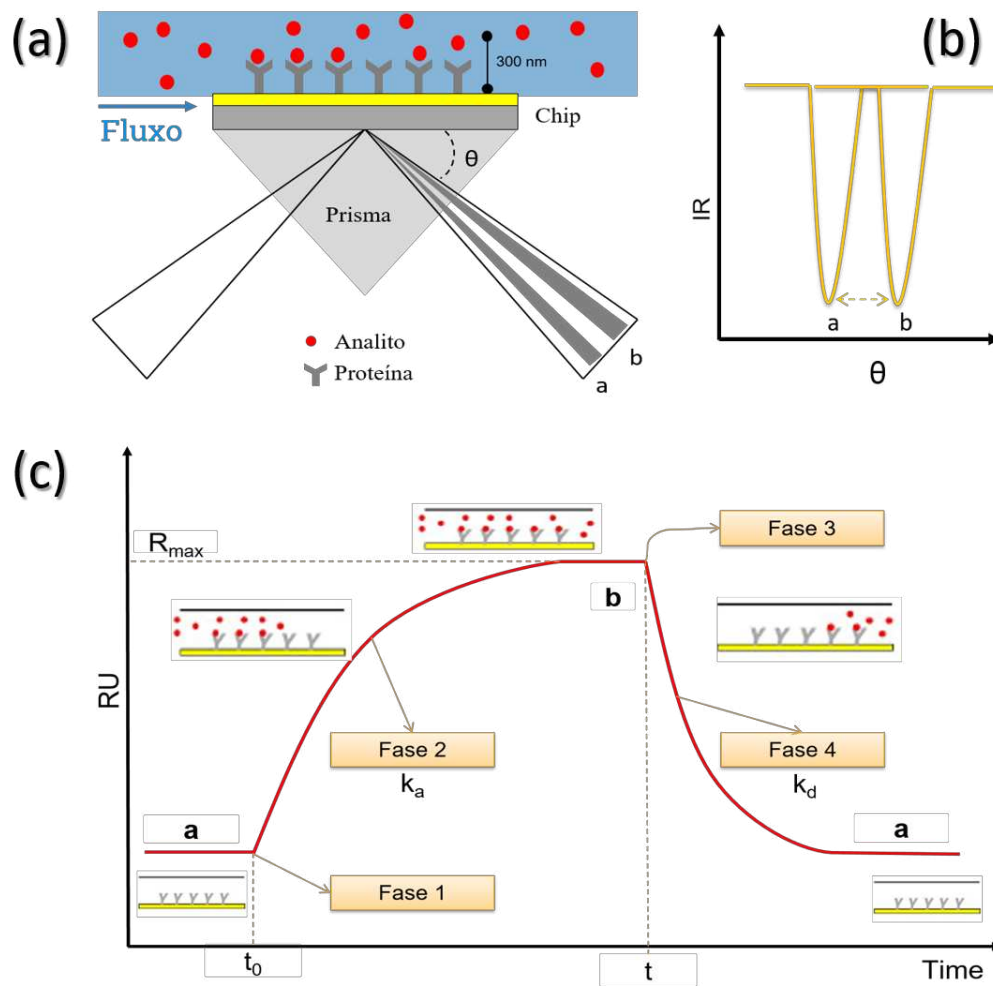


Figura 8. (a) Ilustração do funcionamento do SPR utilizado no sistema da Biacore; (b) mudança do ângulo crítico da luz incidente de **a** para **b** quando ocorre alteração no índice de refração; (c) representação de um sensorgrama (RU x t).

O sensorgrama mostra os fenômenos que ocorrem na célula de fluxo em cada fase do estudo de interação entre as moléculas. Na fase 1, há apenas um fluxo de solução (livre do analito) sobre a célula de fluxo, formando a linha base (a), ou seja, a molécula imobilizada não está em contato com o analito, $RU = 0$. Na fase 2, inicia-se a injeção do analito na célula de fluxo e, à medida que as moléculas do analito ligam-se às moléculas imobilizadas, é observado um aumento no sinal em RU. Quando o estado estacionário é atingido, fase 3, o valor em RU é referente ao ângulo crítico alterado (b). Na fase 4, uma solução livre do analito é injetada na célula de fluxo, onde ocorre a dissociação do complexo formado, ou seja, os sítios ficam desocupados regenerando a superfície, retornando a linha base (a).

Considerando uma interação bimolecular entre a molécula imobilizada (A) e o analito (B) formando o complexo (A-B), pode-se calcular, a partir dos dados dos sensorgramas, os valores das constantes cinéticas k_a ($M^{-1} s^{-1}$) e k_d (s^{-1}), ajustando as equações no modelo de pseudo-primeira ordem (equações a – c).



$$RU(t) = RU_{max}[1 - e^{-k_{obs}(t-t_0)}] \quad (b)$$

$$R_t = R_{t_0} e^{-k_d(t-t_0)} \quad (c)$$

Onde $RU(t)$ é a resposta no tempo t , RU_{max} é a resposta no estado de equilíbrio meta-estável e R_{t_0} é a resposta no tempo final da injeção do analito. A k_a é derivada dos valores da constante observada usando a relação $k_{obs} = k_a \cdot [C] + k_d$, onde C é a concentração do analito. A constante (K_{obs}) é dependente linear da concentração do analito. A constante de ligação (K_b) pode ser calculada pela relação $K_b = k_a/k_d$.

✓ Imobilização da proteína no sensor-chip

Há vários tipos de sensor-chips que podem ser utilizados nos instrumentos da RPS, que dependerão da molécula a ser imobilizada. A maioria dos sensor-chips são baseados em superfície recoberta com dextrana; por exemplo, o sensor-chip CM5 é recoberto com a carboximetildextrana. Para uma melhor imobilização de uma molécula é fundamental a escolha do método de imobilização. Um método utilizado citado na literatura para imobilização de proteínas é o acoplamento amina. A figura 9 ilustra o processo de imobilização da proteína BSA na superfície do sensor-chip CM5 pelo método de acoplamento amina.

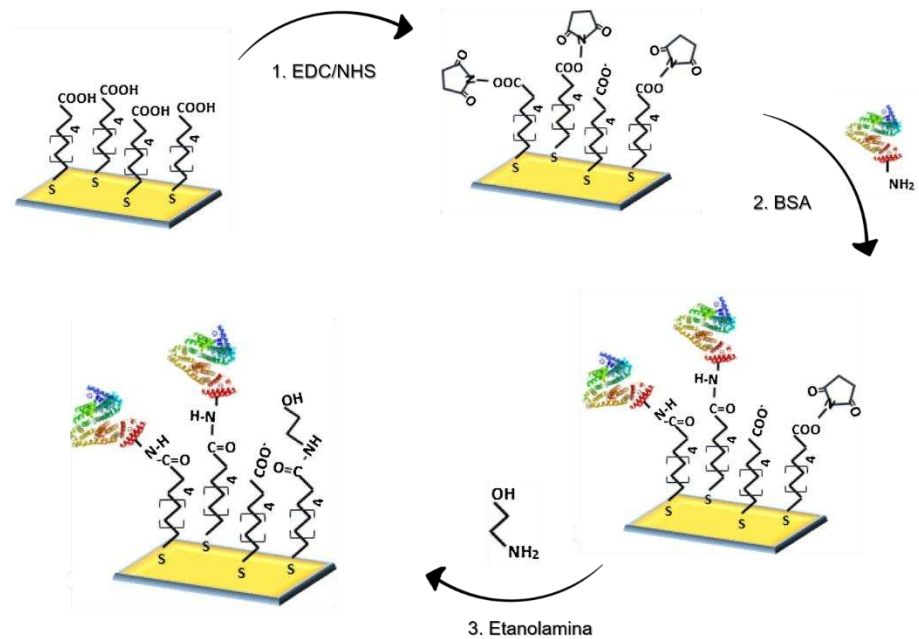


Figura 9. Imobilização da proteína BSA pelo método de acoplamento amina. (1) sensorchip com a matriz de dextrana. (2) ativação da matriz de dextrana com o EDC/NHS. (3) imobilização da BSA na matriz de dextrana. (4) desativação dos sítios de dextrana não ligados pela BSA utilizando a etanolamina (Adaptado de FATHI *et al.*, 2018).

No primeiro estágio do método de acoplamento amina faz-se a injeção, por tempo determinado, da mistura dos reagentes EDC/NHS para ativar a matriz de carboximetildextrana presente na superfície do chip CM5. No segundo estágio, faz-se a injeção da proteína de interesse, à medida que as moléculas das proteínas são imobilizadas na superfície do sensor-chip é observado um aumento no sinal em RU. Já no terceiro estágio, utiliza-se a solução de etanolamina que irá remover a proteína fracamente ligada e desativar os sítios da carboximetildextrana não ocupados pela proteína.

3 OBJETIVOS

Caracterizar a dinâmica molecular e energética da interação das proteínas BSA com os corantes fenotiazínicos (AZA ou AZB) e BLF com os corantes fenilmetanos (PhM) utilizando a técnica RPS.

- ✓ Determinar os valores das constantes cinéticas de associação (k_a) das proteínas com os corantes e a constante cinética de dissociação (k_d) do complexo proteína-corante em diferentes temperaturas;
- ✓ Determinar os valores das constantes de ligação da interação em diferentes temperaturas;
- ✓ Determinar os valores da E_{act} , ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger e $T\Delta S^\ddagger$ dos processos de associação e dissociação;
- ✓ Determinar os valores de K_b , ΔH° , ΔG° e $T\Delta S^\circ$.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produtos químicos e aparelhos

Azure A (pureza $\geq 70\%$ em peso), azul B (pureza $\geq 89\%$ em peso), MV10B (pureza $\geq 90\%$ em peso), MV6B (pureza $\geq 90\%$ em peso), MV2B (pureza $\geq 98\%$ em peso), MVB (pureza $\geq 87\%$ em peso), AO (pureza $\geq 85\%$ em peso), Lactoferrina bovina (pureza $\geq 99\%$ em peso) e BSA (pureza $\geq 99\%$ em peso) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). Todos os produtos químicos usados neste estudo eram de grau analítico e foram usados sem purificação adicional. Água deionizada foi usada para todos os experimentos.

Sensor-chips CM5 para pesquisa e reagentes de acoplamento (N -etil-N', N' dimetilaminopropilcarbodiimida (EDC), N-hidroxissuccinimida (NHS) e cloridrato de etanolamina 1 M, pH 8,5) foram adquiridos da GE Healthcare (Pittsburgh, EUA). Todos os experimentos realizados para investigar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos das interações BSA-AZA ou BSA-AZB e BLF-PhM foram realizados usando um instrumento Biacore X100 (GE Healthcare, Pittsburgh, EUA).

4.2 Soluções e métodos de preparação

O *sensor-chip* CM5 foi ativado por 7 min usando as soluções de EDC/NHS. Posteriormente, os grupos carboxila ativados em excesso foram bloqueados usando etanolamina por 7 min, com fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Posteriormente, a BSA ou BLF foi imobilizada no chip ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) preparadas em solução de acetato de sódio 10 mM, pH 4,0. A imobilização da BSA foi realizada em baixa densidade [3728 unidades de ressonância (RUs)] para reduzir qualquer potencial transporte de massa. Durante os experimentos usando BSA ou BLF imobilizada, uma célula de fluxo foi usada como superfície de referência; esta superfície foi preparada como descrito acima, mas sem imobilização da BSA ou BLF (DRAKE *et al.*, 2012).

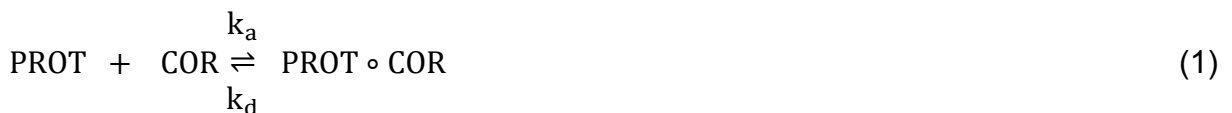
As soluções de corante foram preparadas em concentrações de trabalho (1 – 8 μM) em tampão de fluxo. Cada concentração de corante foi injetada sob a superfície do chip com BSA imobilizado (canal 1) por 25 s no fluxo de 30 $\mu\text{L min}^{-1}$ para permitir a ligação. Em seguida, o tampão de fluxo fluiu através da superfície para se dissociar por 35 s no fluxo de 30 $\mu\text{L min}^{-1}$, para regenerar a superfície do chip. O procedimento

foi realizado para cada concentração de AZA e AZB. O canal sem BSA imobilizado (canal 2) foi submetido ao mesmo procedimento, a fim de corrigir o ruído sistemático que deriva do instrumento. A resposta RU foi obtida subtraindo a resposta do canal 1 do canal 2. Os experimentos de ligação do corante com a BSA foram realizados a pH 7,4 em diferentes temperaturas (12 a 28 °C).

Os experimentos de ligação BLF-PhM seguiram o mesmo procedimento descrito para os experimentos da BSA-AZA ou BSA-AZB em temperaturas variando de 12 a 28 °C. Soluções de PhM em concentrações de trabalho variaram entre 1 e 7 µM e essas soluções foram preparadas em tampão fluxo, pH 7,4. O tempo de injeção de cada concentração dos corantes PhM variou de acordo com o corante utilizado.

4.3 Estudo cinético da interação da proteína – corante

Considerando um modelo bimolecular simples para descrever a interação entre a molécula de proteína (BSA ou BLF) imobilizada com moléculas de corante (AZA ou AZB ou PhM) livres formando um complexo [PROT-COR]^o, o processo pode ser representado pela Eq. 1, onde k_a é a constante cinética da taxa de associação ($M^{-1}s^{-1}$) e k_d é a constante cinética da taxa de dissociação (s^{-1}).



Por ajuste global dos dados dos sensorgramas com uma equação de pseudo primeira ordem (equação 2), obtem-se o valor de k_{obs} .

$$RU_{(t)} = RU_{max}[1 - e^{-k_{obs}(t-t_0)}] \quad (2)$$

O k_{obs} pode ser definido por $k_{obs} = k_a \cdot [COR] + k_d$. Plotando $k_{obs} \times [COR]$, pode-se obter k_a como a inclinação e k_d como a interceptação [Fig. S7 (a-f)]. No entanto, os valores de k_d estimados com a equação de k_{obs} são muitas das vezes imprecisos (HAND, 2008). Portanto, os valores de k_d foram estimados diretamente pelo ajuste dos dados da fase de dissociação do sensorgrama, equação 3.

$$RU_{(t)} = RU(t_m) e^{-k_d(t-t_m)} \quad (3)$$

Onde $RU_{(t)}$ é a resposta RPS no tempo t , RU_{max} é a resposta de ressonância máxima obtida em $t = \infty$, e $RU(t_f)$ é a amplitude da resposta no tempo final do fluxo da solução de corante.

Os parâmetros energéticos relacionados à formação dos complexos ativados a partir das associações das moléculas livres da proteína (BSA ou BLF) e do corante ou da dissociação dos complexos termodinamicamente estáveis (BSA–AZA e BSA–AZB ou BLF–PhM), foram obtidos usando a relação de Arrhenius ($\ln k_x$ vs. $1/T$).

$$E_{act} = -R \cdot \left(\frac{d \ln k_x}{d(1/T)} \right) \quad (4)$$

Onde, E_{act} é a energia de ativação ($J \text{ mol}^{-1}$), R a constante universal de gás ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T é a temperatura (K) e $k_x = k_a$ ou k_d .

Para determinar os parâmetros de energia do complexo de ativação (ΔG_x^\ddagger , ΔH_x^\ddagger , e ΔS_x^\ddagger) envolvidos na formação dos complexos de transição, utilizou-se as equações de 5–7.

$$\Delta G_x^\ddagger = -RT \ln \frac{k_x h}{K_B T} \quad (5)$$

$$E_{act,x} = \Delta H_x^\ddagger + RT \quad (6)$$

$$T\Delta S_x^\ddagger = \Delta H_x^\ddagger - \Delta G_x^\ddagger \quad (7)$$

Onde $E_{act, x} = E_{act, a}$ ou $E_{act, d}$ é a energia de ativação ($J \text{ mol}^{-1}$), R é a constante de gás universal ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T é a temperatura (K), (ΔG_x^\ddagger) é a mudança de energia livre de Gibbs de ativação, (ΔH_x^\ddagger) é a mudança de entalpia de ativação e ($T\Delta S_x^\ddagger$) é a mudança de entropia de ativação, k_x é a constante de taxa de ativação (k_a ou k_d), h é a constante de Planck ($6,6262 \times 10^{-34} \text{ J s}$), e K_B é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$).

4.4 Estudo termodinâmico da interação da proteína – corante

Para determinar as forças motrizes de formação dos complexos [PROT-COR]^o, é fundamental determinar os parâmetros termodinâmicos, como constante de ligação (K_b), variação da energia livre padrão de Gibbs (ΔG°), variação da entalpia padrão (ΔH°) e variação da entropia padrão (ΔS°). Para determinar esses parâmetros termodinâmicos, K_b pode ser calculado pela razão $K_b = k_a/k_d$ (JUHÁSZ *et al.*, 2019). Dos valores K_b (equação 8) e sua dependência com a temperatura (equação 9) (figura S4), pode-se calcular ΔG° e ΔH° , enquanto $T\Delta S^\circ$ pode ser determinado usando a equação fundamental da termodinâmica (equação 10).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (8)$$

$$\ln \frac{K_{b2}}{K_{b1}} = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (9)$$

$$T\Delta S^\circ = \Delta H^\circ - \Delta G^\circ \quad (10)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Abordagem do complexo ativado para descrever interações intermoleculares da albumina do soro bovino – Azure A e da albumina do soro bovino – Azure B

5.1.1 Análise da cinética de ligação da BSA-AZA e BSA-AZB usando RPS

A análise do sinal RPS, ou seja, dependência do sinal em RU com o tempo (RU x t), permitiu obter os valores das constantes cinéticas k_a e k_d das interações intermoleculares entre os diferentes compostos. Além disso, a dependência da temperatura com os valores de k_a e k_d permitiu analisar a dinâmica energética e molecular do processo de formação do complexo ativado (transição) (SCHUBERT *et al.*, 2003). A figura 2a e 2b ilustra os sensorgramas (RU x t) das interações BSA-AZA e BSA-AZB, respectivamente, na faixa de concentração de 1 – 8 μM , usando a BSA imobilizada em baixa densidade (3728 RU) na superfície do chip Biacore CM5 a 25 $^{\circ}\text{C}$. Resultados semelhantes foram obtidos em outras temperaturas (figuras S1 e S2).

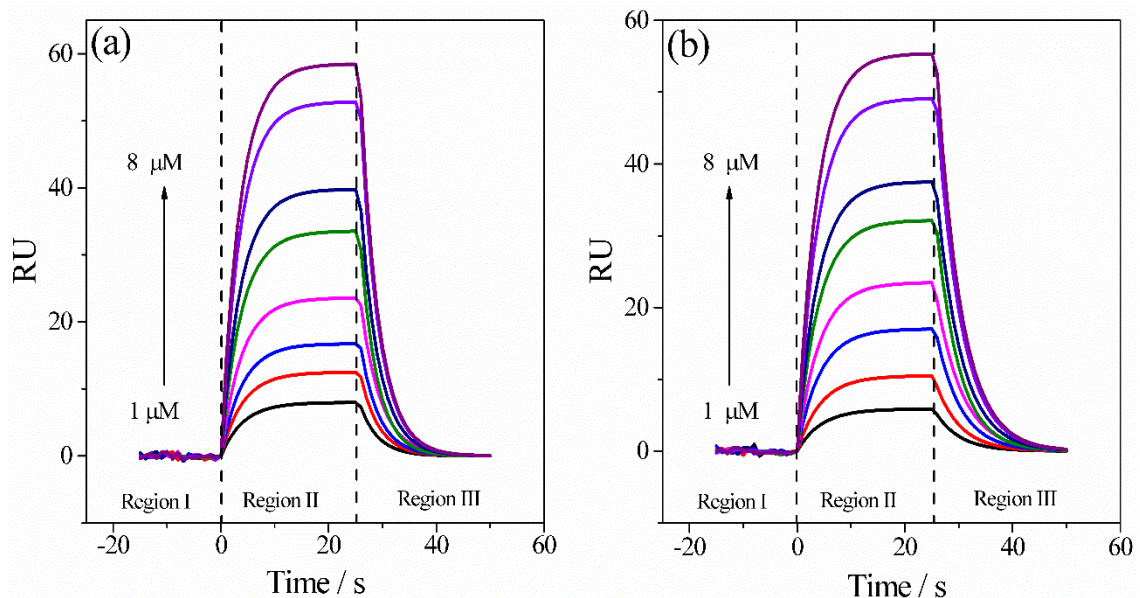


Figura 2. Sensorgramas das interações da albumina de soro bovino imobilizado com (a) azure A e (b) azure B em baixa densidade (3728 unidades de ressonância (RUs)) na superfície de chip Biacore CM5, a 25 $^{\circ}\text{C}$; $1 \leq$ concentração de corante $\leq 8 \mu\text{M}$.

Os sensorgramas foram obtidos subtraindo o sinal da célula da amostra dos sinais das células da referência e puderam ser descritos em três regiões (I, II e III). Na região I, chamada região de linha de base, o tampão fluiu nas células de amostra e referência, portanto, a diferença entre os sinais foi próxima de zero. Para a região II ($0 \leq t \leq 25$ s), as soluções tampão-corante entraram em ambas células, fazendo com que o sinal RU crescesse continuamente ao longo do tempo. Durante estes 25 s, as associações entre a BSA e as moléculas do corante livres e dissociações dos complexos termodinâmicos estáveis BSA-corante, adsorvidos nas superfícies do chip Biacore CM5, ocorreram simultaneamente. Após 25 s, a região III ($25 < t \leq 50$ s) começou, e apenas o tampão puro fluiu nas células de referência e amostra, novamente, o que levou à diminuição dos sinais de RU ao longo do tempo até que os valores de RU se tornassem iguais ao sinal de linha de base. A diminuição dos sinais de RU ocorreu porque na região III ocorreu predominantemente a dissociação dos complexos BSA-AZA ou BSA-AZB.

Os dados dos sensorgramas foram ajustados às equações 2–3 para obter os valores das constantes k_a e k_d . Os valores de k_{obs} foram linearmente dependentes das concentrações de AZA e AZB (figuras S3a e S3b) para BSA-AZA e BSA-AZB, respectivamente. A tabela 1 resume os valores dos parâmetros cinéticos (k_a e k_d) para os processos de formação do complexo BSA-AZA e BSA-AZB em diferentes temperaturas.

Tabela 1. Constantes de velocidade cinética de associação (k_a) e dissociação (k_d) para as interações da albumina sérica bovina-azure A (BSA-AZA) e albumina sérica bovina-azure B (BSA-AZB) em seis temperaturas diferentes.

Temperatura	BSA-AZA		BSA-AZB	
	k_a	k_d	k_a	k_d
°C	$10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	s^{-1}	$10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	s^{-1}
12	$9,40 \pm 0,31$	$0,248 \pm 0,007$	$9,80 \pm 0,22$	$0,250 \pm 0,008$
16	$2,80 \pm 0,15$	$0,260 \pm 0,018$	$3,60 \pm 0,21$	$0,268 \pm 0,019$
20	$2,50 \pm 0,18$	$0,274 \pm 0,017$	$3,20 \pm 0,10$	$0,285 \pm 0,014$
24	$4,60 \pm 0,24$	$0,290 \pm 0,016$	$5,40 \pm 0,36$	$0,305 \pm 0,015$
25	$6,20 \pm 0,33$	$0,295 \pm 0,018$	$7,40 \pm 0,49$	$0,310 \pm 0,021$
28	$15,30 \pm 0,80$	$0,306 \pm 0,016$	$16,40 \pm 0,66$	$0,325 \pm 0,025$

Até onde sabemos, as constantes cinéticas das interações BSA-AZA e BSA-AZB ainda não foram relatadas. Os valores de k_a para a formação do complexo termodinamicamente estável BSA-AZB e k_d para a dissociação desse complexo foram superiores aos do complexo BSA-AZA, o que indicou que o aumento no número de grupos $-CH_3$ (AZA e AZB compreendem 2 e 3 grupos $-CH_3$, respectivamente) na estrutura química do corante acelerou a formação e dissociação dos complexos. Os processos de dissociação de ambos os complexos BSA-corante foram mais rápidos em temperaturas mais altas do que em temperaturas mais baixas. No entanto, o efeito da temperatura no processo de associação foi diferente daquele observado para o processo de dissociação. Na gama de temperaturas de 12 – 20 °C, k_a diminuiu à medida que a temperatura aumentou, enquanto a temperatura no intervalo de 20 – 28 °C o comportamento oposto foi observado.

Sharma e colaboradores, 2014 e Sharma e colaboradores, 2016 relataram que AZB e AZA se ligaram ao mesmo sítio hidrofóbico da BSA localizado no subdomínio IIA do sítio I, portanto, as diferenças nos valores dos parâmetros cinéticos para a formação e dissociação dos complexos BSA-corante foram devido à mudança estrutural dinâmica dos corantes, bem como do sítio de interação da BSA (SHARMA *et al.*, 2014; SHARMA; SUBRAMANIAN *et al.*, 2016).

Em pH 7,4, as moléculas dos corantes estavam carregadas positivamente enquanto a BSA carregava carga negativa, o que promoveu interações eletrostáticas favoráveis entre o BSA e os corantes. Apesar da repulsão eletrostática entre o vermelho do Congo (VC) e BSA, bem como o grande tamanho do VC em comparação com os de AZA ou AZB, a interação entre as moléculas de VC e BSA livres ocorreu de duas a dez vezes mais rápido do que aquelas entre BSA-AZA e BSA-AZB (DE PAULA *et al.*, 2017). A maior taxa de formação do complexo BSA-VC foi causada pelos seis anéis de benzeno de rotação livre presentes na estrutura do VC, enquanto AZA e AZB compreendem apenas três anéis condensados que foram impedidos de girar para ganhar conformações favoráveis. Então, pode-se concluir que as moléculas de VC podem se auto-orientar mais rápido do que as moléculas de AZA ou AZB, para formar interações de $\pi - \pi^*$ *stacking* entre os anéis de benzeno e os aminoácidos aromáticos presentes nos sítios de ligação da BSA. No entanto, essas interações $\pi - \pi^*$ *stacking* entre VC e BSA causaram uma diminuição de seis vezes no valor de k_d para a dissociação do complexo BSA-VC em comparação com os valores para a

dissociação dos complexos BSA-AZA ou BSA-AZB. Para determinar os parâmetros energéticos associados ao ajuste da conformação do sítio de ligação BSA durante a interação com AZA ou AZB, investigou-se a dependência da temperatura com os valores de k_a e k_d . Os gráficos de Arrhenius (figura 3a e 3b para BSA-AZA e BSA-AZB, respectivamente) são geralmente utilizados para descrever as dependências da temperatura com os valores de k_a e k_d .

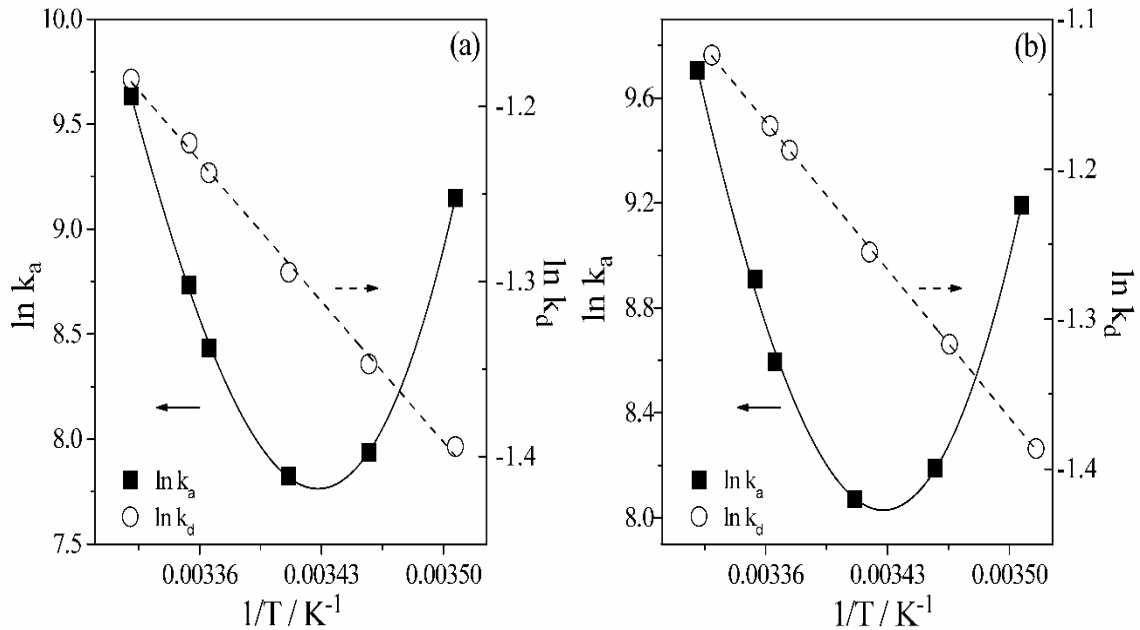


Figure 3. Gráficos de Arrhenius de $\ln k_a$ e $\ln k_d$ para (a) BSA-azure A e (b) interações BSA-azure B como funções do recíproca da temperatura.

O efeito da temperatura nos processos de associação BSA-corante não foi linear, o que sugeriu que as interações BSA-AZA e BSA-AZB ocorreram através de processos de várias etapas que provavelmente foram controlados pelo ajuste do local na estrutura do local I da BSA. No entanto, os valores de k_d para ambos os complexos termodinamicamente estáveis foram linearmente dependentes da temperatura, o que indicou que os processos de dissociação ocorreram através de processos de etapa única.

Para calcular os parâmetros energéticos ($E_{act,x}$, ΔG_x^\ddagger , ΔH_x^\ddagger , $T\Delta S_x^\ddagger$) da formação do complexo ativado usamos as equações 4 – 7, respectivamente. A tabela 2 resume os valores dos parâmetros energéticos para formação do complexo ativado em seis temperaturas diferentes.

Tabela 2. Parâmetros energéticos para (a) formação de complexos de transição BSA-AZA e BSA-AZB e (d) dissociação de complexos na faixa de temperatura de 12-28 °C.

BSA-AZA								
T	Fase de associação (a)				Fase de dissociação (d)			
	$E_{act,a}$	ΔH^{\ddagger}_a	ΔG^{\ddagger}_a	$T\Delta S^{\ddagger}_a$	$E_{act,d}$	ΔH^{\ddagger}_d	ΔG^{\ddagger}_d	$T\Delta S^{\ddagger}_d$
°C	kJ mol ⁻¹							
12	-308,20 ± 46,3	-310,57 ± 46,6	48,04 ± 7,2	-358,61 ± 53,8		7,17 ± 1,1	73,03 ± 11,0	-65,86 ± 9,9
16	-102,63 ± 48,3	-105,03 ± 49,5	51,68 ± 24,3	-156,71 ± 73,8		7,14 ± 3,4	74,00 ± 34,8	-66,86 ± 31,5
20	52,53 ± 16,2	50,09 ± 15,5	52,68 ± 16,3	-2,59 ± 0,8	9,54	7,11 ± 2,2	74,91 ± 23,1	-67,80 ± 20,9
24	173,82 ± 46,5	171,35 ± 45,9	51,93 ± 13,9	119,42 ± 32,0	± 2,4	7,07 ± 1,9	75,82 ± 20,3	-68,75 ± 18,4
25	198,50 ± 45,9	196,02 ± 45,3	51,37 ± 11,9	144,65 ± 33,4		7,07 ± 1,6	76,04 ± 17,6	-68,98 ± 16,0
28	259,64 ± 59,3	257,14 ± 58,7	49,65 ± 11,3	207,49 ± 47,4		7,04 ± 1,6	76,74 ± 17,5	-69,70 ± 15,9
BSA-AZB								
T	Fase de associação (a)				Fase de dissociação (d)			
	$E_{act,a}$	ΔH^{\ddagger}_a	ΔG^{\ddagger}_a	$T\Delta S^{\ddagger}_a$	$E_{act,d}$	ΔH^{\ddagger}_d	ΔG^{\ddagger}_d	$T\Delta S^{\ddagger}_d$
°C	kJ mol ⁻¹							
12	-254,00 ± 29,1	-256,37 ± 29,4	47,94 ± 5,5	-304,31 ± 34,9		9,34 ± 1,1	73,01 ± 8,4	-63,67 ± 7,3
16	-87,27 ± 18,3	-89,67 ± 18,8	51,07 ± 10,7	-140,75 ± 29,6		9,31 ± 2,0	73,93 ± 15,5	-64,62 ± 13,6
20	44,82 ± 12,0	42,38 ± 11,3	52,08 ± 13,9	-9,70 ± 2,6	11,7	9,28 ± 2,5	74,81 ± 20,0	-65,53 ± 17,5
24	155,42 ± 18,3	152,95 ± 18,0	51,53 ± 6,1	101,42 ± 11,9	± 0,9	9,24 ± 1,1	75,70 ± 8,9	-66,45 ± 7,8
25	179,35 ± 35,5	176,88 ± 35,1	50,93 ± 10,1	125,94 ± 25,0		9,24 ± 1,8	75,92 ± 15,0	-66,68 ± 13,2
28	242,67 ± 47,7	240,17 ± 47,2	49,48 ± 9,7	190,69 ± 37,5		9,21 ± 1,8	76,59 ± 15,1	-67,38 ± 13,3

Os valores da E_{act} para a formação dos complexos ativados ($[BSA-AZA]^{\ddagger}$ e $[BSA-AZB]^{\ddagger}$) por meio das interações das moléculas de BSA e corantes livres foram negativos em temperaturas mais baixas e aumentaram com o aumento da temperatura, enquanto E_{act} associado à dissociação dos complexos termodinâmicos estáveis BSA-corante foi independente da temperatura.

Normalmente, a E_{act} pode ser expressa como a soma de três contribuições energéticas, como segue: (i) energia de dessolvatação, E_{Des} , que é a energia necessária para remover a camada de solvatação dos reagentes livres; (ii) energia de mudança conformacional, E_{conf} , que está associada ao ajuste do local do biopolímero e ao ajuste da estrutura química do corante; e (iii) energia de interação, E_{int} , atribuída às interações dos reagentes (equação 11). Cada uma dessas contribuições pode ser dependente da temperatura.

$$E_{act} = E_{Des} + E_{int} + E_{conf} \quad \text{Equação 11}$$

O termo E_{Des} é positivo, porque para liberar o solvente da camada de solvatação do soluto, a energia deve ser absorvida do ambiente para quebrar as interações solvente-soluto. Além disso, o valor de E_{conf} é positivo, porque está associado à quebra das interações aminoácido-aminoácido que ocorrem nos sítios da

BSA. No entanto, o valor de E_{int} é negativo, devido às novas ligações intermoleculares formadas pelas interações BSA-corante.

Quando associam-se as moléculas livres de BSA e corantes a $T < 20$ °C, a $E_{act,a}$, foi negativa por duas causas: (i) a magnitude da E_{conf} foi baixa, porque, em baixa temperatura, a energia cinética molecular média não foi alta o suficiente e, portanto, a transferência de energia das colisões de partículas não foi suficiente para superar a barreira de energia potencial associada com a mudança conformacional do local de interação da BSA. Isso conferiu um caráter menos flexível a este sitio de interação; e (ii) conseqüentemente, as moléculas de corante não conseguiram penetrar muito nos sítios das moléculas de BSA, o que promoveu a liberação de pequenas quantidades de moléculas de água das conchas de solvatação da BSA e corantes e, portanto, causou o pequeno valor de E_{Des} . Posteriormente, $|E_{Des} + E_{conf}| < |E_{int}|$.

A medida que a temperatura aumentava (e conseqüentemente a energia cinética molecular média aumentava), a energia transferida via colisões moleculares aumentava, o que causava intensas mudanças conformacionais nos locais de interação da BSA e, portanto, induzia maiores graus de penetração do corante, bem como a intensa dessolvatação de moléculas em interação. Essa intensificação das mudanças de sítio conformacional e do processo de dessolvatação promovido pelo aumento da temperatura fez com que $E_{act,a}$ se tornasse positivo e, portanto, $|E_{Des} + E_{conf}| > |E_{int}|$. A mesma análise pode ser aplicada a ΔH_a^\ddagger , $T\Delta S_a^\ddagger$.

Durante o processo de associação das moléculas livres de BSA e corantes na faixa de temperatura de 12 – 20 °C, os valores de k_a diminuíram com o aumento da temperatura, enquanto o comportamento oposto foi observado na faixa de temperatura de 20 – 28 °C. Além disso, ΔG_a^\ddagger permaneceu razoavelmente constante (aproximadamente 50 kJ mol⁻¹), e ΔH_a^\ddagger e $T\Delta S_a^\ddagger$ mudaram muito mais do que os valores de ΔG_a^\ddagger , o que sugeriu a possível compensação de entalpia-entropia de ativação. Para verificar a ocorrência deste processo de compensação, plotou-se, em um gráfico, os valores de ΔH_a^\ddagger em função de $T\Delta S_a^\ddagger$ para a formação dos complexos de transição [BSA-AZA][‡] e [BSA-AZB][‡], figura 4.

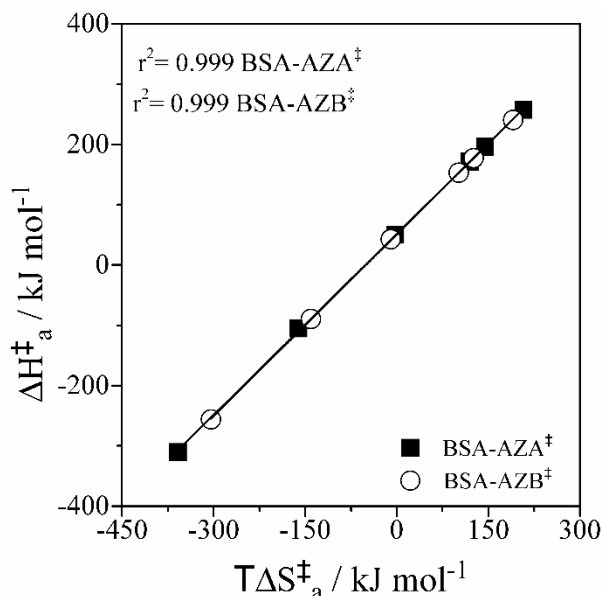


Figura 4. Gráficos de entalpia-entropia ($\Delta H_a^\ddagger - T\Delta S_a^\ddagger$) para complexos de transição $[\text{BSA-AZA}]^\ddagger$ e $[\text{BSA-AZB}]^\ddagger$.

As relações entre ΔH_a^\ddagger e $T\Delta S_a^\ddagger$ foram lineares e os coeficientes de correlação, r^2 , foram iguais a 0,999 para os processos de associação BSA-corante, o que demonstrou que as interações BSA-AZA e BSA-AZB ocorreram por meio de um processo de compensação isocinética de entalpia-entropia. A relação linear entre os valores de ΔH_a^\ddagger e $T\Delta S_a^\ddagger$ pode ser expressa usando a equação 12.

$$\Delta H_a^\ddagger = \alpha - \beta T\Delta S_a^\ddagger \quad \text{Equação 12}$$

Onde α e β são constantes ajustáveis. Aqui, $\alpha \approx 54 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\beta \approx 291 \text{ K}$ são ΔG_a^\ddagger e a temperatura de compensação, respectivamente. Esta compensação isocinética revelou a assinatura energética ativada típica para as interações hidrofóbicas, sendo promovida pelas mudanças na estrutura das camadas de solvatação das moléculas interagentes, ou seja, durante o processo de associação das moléculas livres de BSA e corantes, dois sub-processos podem ocorrer: (i) dessolvatação da BSA e do corante e (ii) interações diretas entre a BSA e as moléculas dos corantes dessolvatados. Os valores de ΔH_a^\ddagger e $T\Delta S_a^\ddagger$ associados ao primeiro e segundo subprocessos foram positivos e negativos, respectivamente. Durante o processo de associação BSA-corante a $T < 20 \text{ }^\circ\text{C}$, a

interação direta BSA-corante dessolvatada dominou as magnitudes dos valores ΔH_a^\ddagger e $T\Delta S_a^\ddagger$, principalmente porque nesta faixa de temperatura, o processo de dessolvatação ocorreu em baixa extensão. No entanto, com o aumento da temperatura, a liberação da molécula de água dissolvendo as moléculas livres de BSA e corantes determinou os valores de ΔH_a^\ddagger e $T\Delta S_a^\ddagger$, e fez com que ambos os parâmetros cinéticos ativados fossem positivos em temperaturas mais altas (LIU *et al.*, 2001; PAUL *et al.*, 2016).

Os processos de transformação dos complexos de transição [BSA-AZA] ‡ e [BSA-AZB] ‡ nos complexos termodinamicamente estáveis finais BSA-AZA e BSA-AZB, respectivamente, foram acompanhados por liberações de entalpia correspondentes de 9,54 e 11,70 kJ mol⁻¹. No entanto, esses processos causaram grandes aumentos de entropia para BSA-AZA e BSA-AZB (69 e 67 kJ mol⁻¹, respectivamente) e, portanto, a transformação dos complexos de transição [BSA-corantes] ‡ em complexos termodinamicamente estáveis BSA-corante foi impulsionado por alterações conformacionais de biopolímero e corantes.

5.1.2 Análise de parâmetros termodinâmicos de ligação BSA-AZA e BSA-AZB

Para determinar a estabilidade e a força motriz para a formação dos complexos termodinamicamente estáveis BSA-corante, foi necessário medir os seguintes parâmetros termodinâmicos padrão para a formação do complexo: ΔG° , ΔH° e ΔS° . Assim, para obter esses parâmetros termodinâmicos utilizaram-se as equações 10–12, os valores K_b e sua dependência com a temperatura são mostrados na figura S4. A tabela 3, lista os valores dos parâmetros termodinâmicos para a formação dos complexos BSA-AZA e BSA-AZB em diferentes temperaturas.

Tabela 3. Variação da energia livre de Gibbs padrão, variação da entalpia padrão e variação da entropia padrão (ΔG° , ΔH° e $T\Delta S^\circ$) para a formação de complexos BSA-AZA e BSA-AZB em temperaturas na faixa de 12 – 28 °C e pH 7,4.

T	BSA-AZA			
	K_b	ΔH°	ΔG°	$T\Delta S^\circ$
°C	10^4 L mol^{-1}		kJ mol^{-1}	
12	$3,79 \pm 0,60$	$-314,56 \pm 47,20$	$-24,99 \pm 3,8$	$-289,57 \pm 43,50$
16	$1,08 \pm 0,50$	$-111,69 \pm 52,60$	$-22,33 \pm 10,5$	$-89,37 \pm 42,10$
20	$0,91 \pm 0,30$	$42,22 \pm 13,00$	$-22,22 \pm 6,9$	$64,44 \pm 19,90$
24	$1,59 \pm 0,40$	$163,47 \pm 43,80$	$-23,89 \pm 6,4$	$187,36 \pm 50,10$
25	$2,10 \pm 0,50$	$188,32 \pm 43,50$	$-24,67 \pm 5,7$	$212,99 \pm 49,30$
28	$5,00 \pm 1,10$	$250,41 \pm 57,20$	$-27,09 \pm 6,2$	$277,50 \pm 63,40$

T	BSA-AZB			
	K_b	ΔH°	ΔG°	$T\Delta S^\circ$
°C	10^4 L mol^{-1}		kJ mol^{-1}	
12	$3,92 \pm 0,40$	$-265,73 \pm 30,50$	$-25,07 \pm 2,90$	$-240,6 \pm 27,60$
16	$1,34 \pm 0,30$	$-99,29 \pm 20,80$	$-22,86 \pm 4,80$	$-76,43 \pm 16,00$
20	$1,12 \pm 0,30$	$32,58 \pm 8,70$	$-22,73 \pm 6,10$	$55,31 \pm 14,80$
24	$1,77 \pm 0,20$	$143,01 \pm 16,80$	$-24,17 \pm 2,80$	$167,18 \pm 19,70$
25	$2,39 \pm 0,50$	$166,91 \pm 33,10$	$-24,99 \pm 5,00$	$191,90 \pm 38,00$
28	$5,05 \pm 1,00$	$230,14 \pm 45,30$	$-27,11 \pm 5,30$	$257,26 \pm 50,60$

Todos os valores dos parâmetros termodinâmicos foram dependentes da temperatura e seguiram as tendências polinomiais de segunda ordem à medida que a temperatura aumentava. Conforme a temperatura aumentou, os valores de ΔG° aumentaram até atingir o valor máximo em $T = 20 \text{ °C}$, e então diminuiu conforme a temperatura continuou a aumentar. Tanto ΔH° quanto $T\Delta S^\circ$ aumentaram monotonicamente com o aumento da temperatura. Os valores de ΔG° foram negativos em todas as temperaturas, o que demonstrou que, para as misturas de soluções aquosas de BSA e AZA ou AZB, as condições de equilíbrio termodinâmico promoveram maiores concentrações dos complexos BSA-AZA e BSA-AZB. As diferenças de estrutura química entre os corantes não afetaram a magnitude do ΔG° . Sharma *et al.* (2014) e Sharma *et al.* (2016), usaram espectroscopia de fluorescência para determinar os valores de ΔG° para os complexos BSA-AZA e BSA-AZB ($-30,35$ e $-33,61 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectivamente) que diferiram em aproximadamente 20% dos nossos resultados. Infelizmente, os autores não calcularam os parâmetros ΔH° ou $T\Delta S^\circ$ para esses complexos. As pequenas diferenças entre os resultados relatados por Sharma *et al.* (2014) e Sharma *et al.* (2016) e os valores de ΔG° obtidos neste estudo podem ser atribuídos à menor contribuição da entropia de configuração

durante o experimento de RPS, que foi principalmente devido às moléculas de proteína aderidas à superfície do chip (SHARMA *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2016). Para investigar a força motriz da formação dos complexos BSA-corante, precisamos analisar os componentes do potencial termodinâmico ΔH° e $T\Delta S^\circ$. Ambos parâmetros termodinâmicos foram negativos em baixas temperaturas e tornaram-se positivos em $T = 20^\circ\text{C}$. Ambas as interações BSA-AZA e BSA-AZB ocorreram por meio de compensação de entalpia-entropia (figura S5), que demonstrou que, conforme observado para a formação do complexo ativado, durante a síntese dos complexos termodinamicamente estáveis foi a interação hidrofóbica (liberação de água das conchas de solvatação das moléculas de BSA e corante e interações direta da BSA e corante dessolvatas) que determinou o mecanismo molecular para a formação dos complexos BSA-corante. Este efeito do aumento da temperatura na interação hidrofóbica BSA-AZA e BSA-AZB pode estar associado à destruição parcial da estrutura da proteína dobrada, expondo o núcleo hidrofóbico interno.

5.1.3 Conclusão

A técnica RPS confirmou que BSA interagiu com corantes fenotiazínicos (AZA e AZB) para formar complexos termodinamicamente estáveis (K_b de $2,1 \times 10^4$ e $2,39 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) em pH 7,4. No entanto, a força motriz para a formação dos complexos de corante BSA-fenotiazina foi dependente da temperatura. Em temperatura $\leq 16 \text{ }^\circ\text{C}$, forças entálpicas, principalmente devido a ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, governaram a formação dos complexos ($\Delta H^\circ_{12^\circ\text{C},\text{AZA}} = -314,56 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta H^\circ_{12^\circ\text{C},\text{AZB}} = -265,73 \text{ kJ mol}^{-1}$, enquanto na temperatura $\geq 20 \text{ }^\circ\text{C}$, devido ao predomínio das interações hidrofóbicas, a força motriz foi a entropia ($T\Delta S^\circ_{28^\circ\text{C},\text{AZA}} = 277,50 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $T\Delta S^\circ_{28^\circ\text{C},\text{AZB}} = 230,14 \text{ kJ mol}^{-1}$). Os resultados deste estudo sugeriram que a BSA interagiu com AZA ou AZB através de complexos de transição. As associações proteína-corante ocorreram através de processos de várias etapas e os valores de energia de ativação aumentaram com o aumento da temperatura ($E_{\text{act},a,12^\circ\text{C},\text{AZA}} = -308,20 \text{ kJ mol}^{-1}$ aumentou para $E_{\text{act},a,28^\circ\text{C},\text{AZA}} = 259,64 \text{ kJ mol}^{-1}$, e $E_{\text{act},a,12^\circ\text{C},\text{AZB}} = -254,00 \text{ kJ mol}^{-1}$ aumentou para $E_{\text{act},a,28^\circ\text{C},\text{AZB}} = 242,67 \text{ kJ mol}^{-1}$). Por outro lado, durante a dissociação dos complexos termodinamicamente estáveis BSA-AZA e BSA-AZB em complexos ativados, ocorreram processos de etapa única ($E_{\text{act},d,\text{AZA}} = 9,54 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $E_{\text{act},d,\text{AZB}} = 11,57 \text{ kJ mol}^{-1}$). Os complexos termodinamicamente estáveis BSA-AZA e BSA-AZB formados por meio de processos de compensação de entalpia-entropia e os complexos ativados $[\text{BSA-AZA}]^\ddagger$ e $[\text{BSA-AZB}]^\ddagger$ foram produzidos por compensação isocinética. As análises cinética e termodinâmica das interações entre os corantes AZA e AZB e BSA podem ajudar a elucidar o mecanismo molecular de formação de complexos entre proteínas e corantes orgânicos diferentes, o que seria útil para projetar moléculas terapêuticas de ligação a proteínas.

5.2 Dinâmica e energética da interação da lactoferrina bovina com os corantes fenilmetanos seguida pela técnica de ressonância plasmônica de superfície

5.2.1 Caracterização da interação BLF-PhM pelo RPS

O RPS foi utilizado para a determinação cinética e termodinâmica das interações entre as moléculas BLF e PhM com diferentes estruturas químicas, conforme mostrado na figura 2 (HUDSON *et al.*, 2019; PAULA *et al.*, 2020). Os sensorgramas descrevem como a resposta RPS (RU) depende dos eventos moleculares temporais que ocorrem na superfície do chip CM5, sendo dominados por processos de interação BLF-PhM. A aplicação de modelos cinéticos específicos aos dados dos sensorgramas permite determinar a constante de associação (k_a) das moléculas livres de BLF e PhM, e a constante de dissociação (k_d) do complexo termodinâmico estável, [BLF-PhM]^o. A Figura 2 mostra os sensorgramas obtidos da interação da BLF imobilizada na superfície do chip CM5, com as soluções de fluxo no pH 7,4, do corante AO, na faixa de concentração do corante de 1–7 μM , a 25 °C. Os sensorgramas da interação entre BLF e outros PhM (MVB, MV2B, MV6B e MV10B) são mostrados nas figuras S6 (a-f) – S10 (a-f), em outras temperaturas.

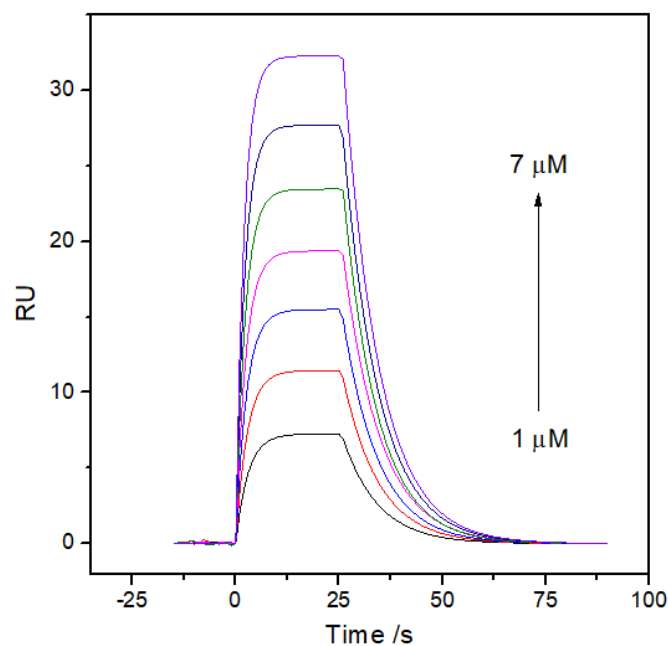


Figure 2. Sensorgramas (RU x s) para interação BLF-AO, $1 \leq [\text{AO}] \leq 7 \mu\text{M}$, soluções de corante fluindo sobre a superfície do sensor-chip CM5 com BLF imobilizada (3890 RU), a pH = 7,4 e T = 25 °C.

No início ($-20 \text{ s} < t < 0 \text{ s}$) do perfil do sensorgrama apenas a solução tampão está fluindo dentro dos canais de referência (sem BLF) e do canal de amostra (com BLF), formando a linha base ($\text{RU} = 0$). Em $t = 0$, a solução de corante com uma concentração específica começou a fluir na superfície do chip CM5 e, conforme o corante se liga à BLF imobilizada, formando o complexo $[\text{BLF-AO}]^\circ$, um aumento no sinal RU é observado durante um período de 25 segundos (fase de associação). Após este tempo, o tampão puro (sem corante) flui novamente sobre a superfície do chip CM5 para dissociar o complexo $[\text{BLF-AO}]^\circ$ que leva a uma diminuição no sinal RU (fase de dissociação) (NUNES *et al.*, 2019; PATCHING, 2014; REZENDE *et al.*, 2020).

Os dados dos sensorgramas foram ajustados às equações 2–3 para obter os valores das constantes k_a e k_d . O gráfico de k_{obs} em função da concentração do corante é mostrado na figura S11 (a-f). A tabela 1 mostra os valores dos parâmetros cinéticos k_a e k_d para a formação do complexo BLF-PhM em seis temperaturas diferentes.

Tabela 1. Constantes de taxa de associação (k_a) e dissociação (k_d) para a interação BLF-AO, BLF-MVB, BLF-MV2B, BLF-MV6B e BLF-MV10B em função da temperatura.

T (°C)	BLF-AO		BLF-MVB		BLF-MV2B	
	k_a ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-2} s^{-1})	k_a ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-2} s^{-1})	k_a ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-2} s^{-1})
12	$10,20 \pm 0,42$	$8,00 \pm 0,20$	$1,00 \pm 0,05$	$2,41 \pm 0,13$	$1,85 \pm 0,08$	$3,60 \pm 0,16$
16	$14,10 \pm 0,40$	$8,90 \pm 0,55$	$1,55 \pm 0,07$	$2,65 \pm 0,17$	$2,50 \pm 0,12$	$3,75 \pm 0,21$
20	$18,50 \pm 0,78$	$10,00 \pm 0,42$	$2,30 \pm 0,10$	$2,90 \pm 0,18$	$3,30 \pm 0,17$	$3,90 \pm 0,31$
24	$25,00 \pm 1,30$	$11,30 \pm 0,45$	$3,70 \pm 0,19$	$3,20 \pm 0,12$	$4,50 \pm 0,25$	$4,10 \pm 0,25$
25	$26,60 \pm 1,34$	$11,60 \pm 0,67$	$4,05 \pm 0,25$	$3,29 \pm 0,15$	$4,90 \pm 0,29$	$4,15 \pm 0,26$
28	$32,50 \pm 1,58$	$12,60 \pm 0,78$	$5,20 \pm 0,32$	$3,55 \pm 0,19$	$5,80 \pm 0,35$	$4,25 \pm 0,20$
T (°C)	BLF-MV6B		BLF-MV10B			
	k_a ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-2} s^{-1})	k_a ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-2} s^{-1})		
12	$3,80 \pm 0,14$	$3,45 \pm 0,16$	$6,80 \pm 0,32$	$2,24 \pm 0,10$		
16	$5,20 \pm 0,22$	$3,60 \pm 0,19$	$9,60 \pm 0,53$	$2,30 \pm 0,13$		
20	$7,20 \pm 0,33$	$3,70 \pm 0,19$	$13,50 \pm 0,84$	$2,36 \pm 0,14$		
24	$10,00 \pm 0,43$	$3,85 \pm 0,15$	$18,40 \pm 1,11$	$2,41 \pm 0,14$		
25	$11,10 \pm 0,43$	$3,90 \pm 0,16$	$20,00 \pm 1,25$	$2,43 \pm 0,14$		
28	$13,60 \pm 0,78$	$4,00 \pm 0,22$	$25,10 \pm 1,48$	$2,47 \pm 0,15$		

Independentemente da estrutura química do corante, os valores de k_a e k_d aumentaram com o aumento da temperatura, indicando que a extensão da associação das moléculas livres de BLF e PhM, bem como a dissociação do complexo $[\text{BLF-PhM}]^\circ$, aumenta com o aumento da energia cinética molecular média.

A energia de ativação ($E_{\text{act,a}}$) envolvida na associação entre as moléculas de corante livre e o BLF imobilizado, para a geração do complexo de transição $[\text{BLF-}$

PhM][‡], foi obtida através do gráfico de Arrhenius ($\ln k_a$ vs. $1/T$). Os valores de $E_{act,d}$ foram obtidos a partir do gráfico $\ln k_d$ vs. $1/T$, figura 3A e 3B.

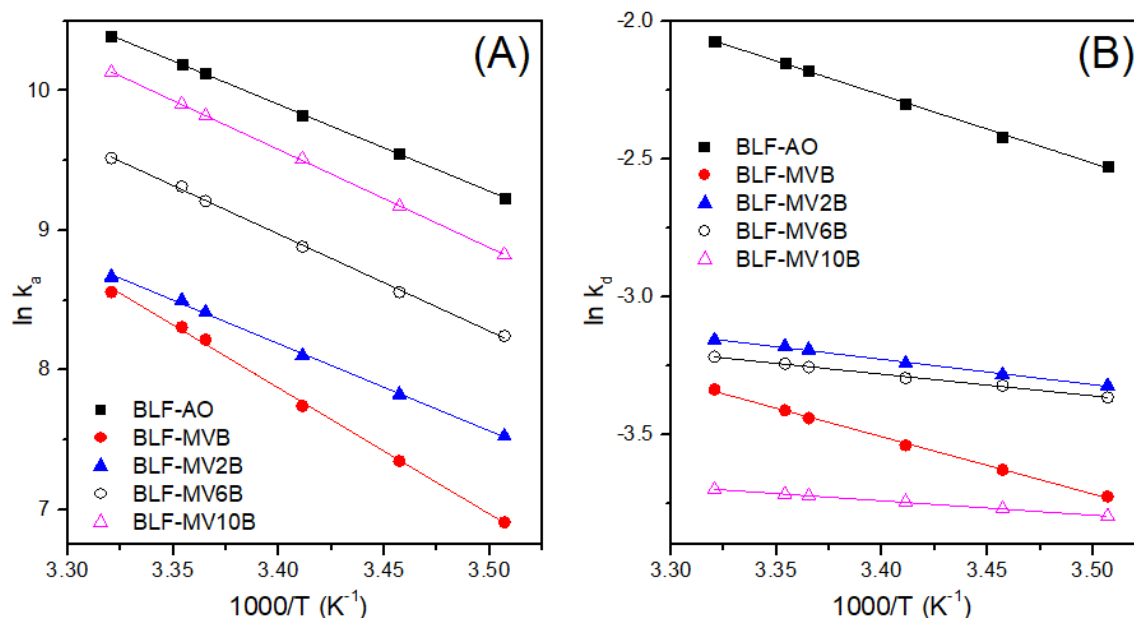


Figura 3. Gráfico de Arrhenius para a fase de associação (3A) e fase dissociação (3B) envolvida nas interações BLF-PhM em função de $1/T$. (■) BLF-AO, (●) BLF-MVB, (▲) BLF-MV2B, (○) BLF-MV6B, and (△) BLF-MV10B.

A formação do complexo ativado a partir dos processos de associação ou dissociação ocorreu em uma única etapa, evidenciada pela linearidade dos gráficos de Arrhenius (WANG *et al.*, 2013). Para calcular os parâmetros energéticos ($E_{act,x}$, ΔG_x^\ddagger , ΔH_x^\ddagger , $T\Delta S_x^\ddagger$) da formação do complexo ativado utilizaram-se as equações de 4–7. A tabela 2, mostra os valores dos parâmetros energéticos ($E_{act,x}$, ΔG_x^\ddagger , ΔH_x^\ddagger , $T\Delta S_x^\ddagger$) para os processos de formação do complexo transição [BLF-PhM][‡], a 25 °C. Foram obtidos valores dos parâmetros energéticos semelhantes para outras temperaturas, tabela S1.

Tabela 2. Parâmetros energéticos da formação do complexo de transição para: (a) associação das moléculas livres da proteína e do corante e (d) dissociação do complexo termodinamicamente estável, a 25 °C.

Complex	Fase de Associação			
	E_{act}	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$
	kJ mol ⁻¹			
BLF-AO	51,76 ± 2,27	49,28 ± 2,27	47,76 ± 2,40	1,52 ± 0,08
BLF-MVB	75,42 ± 3,85	72,61 ± 4,52	52,43 ± 3,25	20,19 ± 1,27
BLF-MV2B	51,94 ± 2,76	49,46 ± 2,91	51,95 ± 3,06	-2,50 ± 0,15
BLF-MV6B	57,84 ± 2,56	55,36 ± 2,15	49,93 ± 1,94	5,43 ± 0,21
BLF-MV10B	58,45 ± 3,38	55,97 ± 3,50	48,41 ± 3,03	7,50 ± 0,47
Complex	Fase de Dissociação			
	E_{act}	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$
	kJ mol ⁻¹			
BLF-AO	20,55 ± 0,99	18,07 ± 1,07	78,36 ± 4,51	-60,28 ± 3,47
BLF-MVB	17,27 ± 0,91	14,79 ± 0,67	81,48 ± 3,72	-66,69 ± 3,04
BLF-MV2B	7,32 ± 0,41	5,15 ± 0,31	80,91 ± 5,17	-75,75 ± 4,86
BLF-MV6B	6,54 ± 0,49	4,06 ± 0,32	81,06 ± 3,33	-76,99 ± 3,01
BLF-MV10B	4,36 ± 0,25	1,88 ± 0,11	82,23 ± 4,81	-80,35 ± 4,70

A formação do [BLF-PhM][‡] ocorre via absorção de energia, conforme evidenciado pelos valores positivos de $E_{act,a}$, $E_{act,d}$, ΔH^\ddagger_a , ΔH^\ddagger_d , ΔG^\ddagger_a e ΔG^\ddagger_d . O valor da energia de ativação está associado a potenciais barreiras de energia que devem ser superadas para formar o complexo de transição (HUDSON et al., 2019; NUNES et al., 2019; PAULA et al., 2020). As barreiras de energia ΔY_x^\ddagger ($Y = E_{act}, H^\ddagger, G^\ddagger$ e S^\ddagger , $x = a$ ou d), ocorrem porque durante a formação do complexo [BLF-PhM][‡] algumas interações devem ser quebradas e outras devem se formar, tais como: i) quebra de interações água-água na camada de solvatação das moléculas de interação livre e interações água-água posteriores no volume da solução, ΔY_{solv} ; ii) energia para a interrupção das interações de aminoácidos associadas a alterações conformacionais dos locais de ligação às proteínas, bem como para ligações rotacionais de moléculas de PhM, ΔY_{conf} ; e iii) interações diretas corante-proteína no local de ligação da proteína, ΔY_{int} . Para moléculas hidrofóbicas, como PhM, os processos moleculares (i) e (ii) ocorrem com absorção de energia, enquanto o processo (iii) ocorre com liberação de energia.

5.2.2 Efeito do número do grupo -CH₃ nos parâmetros energéticos na formação do complexo [BLF-PhM][‡]

Todos os valores dos parâmetros energéticos da formação do complexo ativado (tabela 2), bem como os valores k_a e k_d (tabela 1) dependem do número de grupos -CH₃ presentes na estrutura química das moléculas do corante. Os corantes MV2B, MV6B e MV10B têm estruturas químicas semelhantes, exceto para o número de grupos -CH₃ ligados: MV10B (6 -CH₃) > MV6B (5 -CH₃) > MV2B (4 -CH₃). Independentemente da temperatura, o processo de formação do complexo [BLF-MV10B] ° é aproximadamente 1,8 e 4,1 vezes mais rápido do que a associação com MV6B ou MV2B, respectivamente. Para o processo de dissociação, o complexo BLF-MV2B ($4,15 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) é 1,1 vezes mais rápido que o complexo BLF-MV6B ($3,9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) e 1,7 vezes mais rápido que o complexo BLF-MV10B ($2,43 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$). Moléculas de corante PhM com mais grupos -CH₃ em sua estrutura química associam mais rapidamente com locais de ligação da BLF e dissociam-se mais lentamente. Coelho e colaboradores, 2019, estudaram a interação de corantes fenotiazina com a BLF, e observaram um efeito do número de -CH₃ oposto, nas constantes de taxa de associação e dissociação, com BLF-MB (4 -CH₃) ($k_a = 5.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $k_d = 0.034 \text{ s}^{-1}$) e BLF-AZA (2 -CH₃) ($k_a = 8.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_d = 0.46 \text{ s}^{-1}$), a 25 °C. A constante de associação dos corantes PhM (exceto para MV2B) e a dissociação (exceto para MV10B) no local de ligação da BLF é mais rápido do que para as interações da BLF-AZA ou BLF-MB, o que pode ser explicado considerando o maior grau de liberdade rotacional/conformacional dos corantes PhM quando comparados aos corantes fenotiazina, principalmente causados pela rotação livre de anéis fenil anexados (PhM), enquanto os corantes AZA e MB têm três anéis condensados.

Para o processo de associação, o aumento no número de grupos -CH₃ na estrutura do corante PhM causou um aumento nos valores de $E_{act, a}$, [$E_{act, a, [BLF-MV2B]} = 51.94 \text{ kJ mol}^{-1}$ (4 -CH₃); $E_{act, a, [BLF-MV6B]} = 57.84 \text{ kJ mol}^{-1}$ (5 -CH₃); $E_{act, a, [BLF-MV10B]} = 58.45 \text{ kJ mol}^{-1}$ (6 -CH₃)]. Esse gasto energético promovido pela presença do grupo metil pode ser atribuído ao seu maior volume molecular quando comparado ao hidrogênio. Portanto, moléculas de corante com maior número de grupos metil requerem maior absorção de energia durante: a) quebra da interação BLF-solvente e PhM-solvente; e b) a mudança conformacional da proteína e das moléculas de PhM

causada pela associação das moléculas de corante nos locais de ligação do BLF. As mesmas análises são feitas para os valores de ΔH^\ddagger_a , [ΔH^\ddagger_a , [BLF-MV2B] = 49.46 kJ mol⁻¹, (4 -CH₃); ΔH^\ddagger_a , [BLF-MV6B] = 55.36 kJ mol⁻¹, (5 -CH₃); ΔH^\ddagger_a , [BLF-MV10B] = 55.97 kJ mol⁻¹ (6 -CH₃)]. Então, o efeito do número de -CH₃ no aumento da velocidade de associação, deve ser atribuído a uma impulsionada força entrópica. As moléculas de PhM com maior número de grupo -CH₃, quando se ligam ao sítio BLF para formar o [BLF-PhM][‡] promovem um grande valor de $T\Delta S^\ddagger_a$, [$T\Delta S^\ddagger_a$, [BLF-MV2B] = -2.50 kJ mol⁻¹, (4 -CH₃); $T\Delta S^\ddagger_a$, [BLF-MV6B] = 5.43 kJ mol⁻¹, (5 -CH₃); $T\Delta S^\ddagger_a$, [BLF-MV10B] = 7.50 kJ mol⁻¹ (6 -CH₃)], a 25 °C. Como discutido acima, este efeito entrópico do grupo -CH₃ ocorre porque as moléculas de PhM com maior número -CH₃ liberam mais moléculas de água dissolvendo regiões hidrofóbicas (-CH₃ é um grupo hidrofóbico) e promove uma mudança de conformação do local da BLF mais extensa.

Por outro lado, para o processo de dissociação, o aumento no número de grupos -CH₃ na estrutura do corante causou uma diminuição nos valores de $E_{act, d}$, $T\Delta S^\ddagger_d$ e ΔH^\ddagger_d [$E_{act, d}$, [BLF-MV2B] = 7.63 kJ mol⁻¹ (4 -CH₃); $E_{act, d}$, [BLF-MV6B] = 6.54 kJ mol⁻¹ (5 -CH₃); $E_{act, d}$, [BLF-MV10B] = 4.36 kJ mol⁻¹ (6 -CH₃)], valores de ΔH^\ddagger_d [ΔH^\ddagger_d , [BLF-MV2B] = 5.15 kJ mol⁻¹, (4 -CH₃); ΔH^\ddagger_d , [BLF-MV6B] = 4.06 kJ mol⁻¹, (5 -CH₃); ΔH^\ddagger_d , [BLF-MV10B] = 1.88 kJ mol⁻¹ (6 -CH₃)], valores de $T\Delta S^\ddagger_d$ [$T\Delta S^\ddagger_d$, [BLF-MV2B] = -75.75 kJ mol⁻¹, (4 -CH₃); $T\Delta S^\ddagger_d$, [BLF-MV6B] = -76.99 kJ mol⁻¹, (5 -CH₃); $T\Delta S^\ddagger_d$, [BLF-MV10B] = -80.35 kJ mol⁻¹ (6 -CH₃)], a 25 °C. Para entender esta diminuição nos valores de E_{act} e ΔH^\ddagger , $T\Delta S^\ddagger$ induzidos pelo aumento do número -CH₃, deve-se considerar que estes parâmetros energéticos estão associados à conversão de [BLF-PhM][°] em [BLF-PhM][‡]. Portanto, os resultados demonstraram que o sítio de ligação da BLF do [BLF-PhM][‡] é mais estruturado e possui interação intermolecular mais intensa. Assim, o grande volume molecular (maior número -CH₃) promoveu uma estruturação mais intensa do sítio de interação do BLF, diminuindo a velocidade de dissociação.

O aumento no número do grupo metil na estrutura do corante causou uma diminuição em ΔG^\ddagger_a e um aumento em ΔG^\ddagger_d . Para entender este efeito de -CH₃ no potencial termodinâmico de formação de complexo de transição, deve-se considerar a discussão acima sobre ΔH^\ddagger e $T\Delta S^\ddagger$.

5.2.3 Efeito de grupos fenil nos parâmetros energéticos na formação de complexos de transição [BLF-PhM][‡]

A fim de determinar o efeito dos grupos fenil na cinética do processo de associação e dissociação para a interação BLF-PhM, os parâmetros de energia de ativação da interação AO e MV2B com as moléculas de BLF foram comparados. MV2B tem três grupos fenil, enquanto AO tem apenas dois, figura 2. As constantes de taxa de associação e dissociação do sistema AO/BLF foram maiores do que para o MV2B/BLF, porque $\Delta G_{a, [BLF-AO]}^{\ddagger}$ (47.76 kJ mol⁻¹) < $\Delta G_{a, [BLF-MV2B]}^{\ddagger}$ (51.95 kJ mol⁻¹) e $\Delta G_{d, [BLF-AO]}^{\ddagger}$ (78.36 kJ mol⁻¹) < $\Delta G_{d, [BLF-MV2B]}^{\ddagger}$ (80.91 kJ mol⁻¹). Este efeito do anel aromático no potencial termodinâmico de formação do complexo de transição é 1,64 vezes maior na associação do que no processo de dissociação e pode ser proveniente de componentes entálpicos e/ou entrópicos de ΔG^{\ddagger} . Os resultados mostram que o grupo fenil não afeta os valores de $E_{act,a}$ e $\Delta H_{a, [BLF-MV2B]}^{\ddagger}$ ($E_{act,a, [BLF-MV2B]} = 51.94$ kJ mol⁻¹; $E_{act,a, [BLF-AO]} = 51.76$ kJ mol⁻¹; $\Delta H_{a, [BLF-MV2B]}^{\ddagger} = 49.46$ kJ mol⁻¹; $\Delta H_{a, [BLF-AO]}^{\ddagger} = 49,28$ kJ mol⁻¹), demonstrando que o efeito do anel aromático na fase de associação da velocidade de ligação BLF-PhM veio apenas de contribuições entrópicas.

Os valores de $T\Delta S_{a, [BLF-MV2B]}^{\ddagger}$ foram negativos para [BLF-MV2B][‡] ($T\Delta S_{a, [BLF-MV2B]}^{\ddagger} = -2.50$ kJ mol⁻¹), e positivos para a formação de [BLF-AO][‡] ($T\Delta S_{a, [BLF-AO]}^{\ddagger} = 1.52$ kJ mol⁻¹). As interações do anel aromático com aminoácidos presentes no local de interação da BLF provavelmente ocorrem por interações $\pi - \pi^*$ *stacking*, que é uma interação orientada específica que promove uma redução líquida da entropia conformacional do local de interação da BLF (LUIZA *et al.*, 2019; PAULA *et al.*, 2020). Então, a redução entrópica do sistema observada para a formação de [BLF-MV2B][‡] demonstrou que o aumento entrópico decorrente da liberação das moléculas de água de solvatação não é suficiente para superar a redução entrópica conformacional do sítio BLF induzida pelas interações $\pi - \pi^*$ *stacking* para BLF-MV2B. Como as moléculas AO têm um anel fenólico a menos, essa redução entrópica conformacional da interação $\pi - \pi^*$ *stacking* não é suficiente para equilibrar o aumento entrópico da interação hidrofóbica.

A mudança entrópica associada ao processo de conversão do complexo termodinâmico estável para o complexo de transição era dependente do número de grupos fenil. Para o corante com menor número de anéis fenil, a diminuição da entropia do sistema ($T\Delta S_{d, [BLF-AO]}^{\ddagger} = -60.28$ kJ mol⁻¹) observada foi menor do que para

o corante com maior número de anéis aromáticos ($T\Delta S^{\ddagger}_d$, [BLF-MV2B] = - 75.75 kJ mol⁻¹). No processo de conversão do [BLF-PhM]^o → [BLF-PhM][‡] não há contribuição para a mudança de entropia proveniente da solvatação de moléculas interagentes, porque todas as moléculas de água foram liberadas antes quando o seguinte ocorreu o processo BLF + PhM → [BLF-PhM][‡]. Assim, a diminuição dos valores de $T\Delta S^{\ddagger}_d$ torna-se apenas uma redução entrópica conformacional do sítio BLF pela interação $\pi - \pi^*$ *stacking*. A diminuição de $T\Delta S^{\ddagger}_d$ de [BLF-MV2B]^o → [BLF-MV2B][‡] foi maior porque as moléculas de MV2B têm mais capacidade de induzir uma orientação angular no resíduo de aminoácido do sítio BLF devido aos seus três anéis fenólicos aromáticos. Como as moléculas AO possuem apenas dois anéis aromáticos, elas induzem uma maior diminuição do valor de $T\Delta S^{\ddagger}_d$.

Por outro lado, para o processo de dissociação, o aumento do número de grupos fenil na estrutura química do corante causou uma diminuição nos valores de $E_{act,d}$ e ΔH^{\ddagger}_d , ($E_{act,d}$, [BLF-MV2B] = 7.63 kJ mol⁻¹; $E_{act,d}$, [BLF-AO] = 20.55 kJ mol⁻¹; ΔH^{\ddagger}_d , [BLF-MV2B] = + 5.15 kJ mol⁻¹; ΔH^{\ddagger}_d , [BLF-AO] = + 18.07 kJ mol⁻¹). Esses parâmetros energéticos de dissociação mostram que durante a transformação de complexos termodinamicamente estáveis em complexos de transição, a barreira potencial para o complexo BLF-MV2B é menor, porque neste complexo há mais interação $\pi - \pi^*$ *stacking* que compensa as interações aminoácido-aminoácido e aminoácido-corante quebradas nessa conversão.

5.2.4 Efeito da carga de fenilmetano nos parâmetros energéticos da formação do [BLF-PhM][‡]

A presença de carga na estrutura da molécula do corante afeta os parâmetros cinéticos dos processos de associação e dissociação para a interação BLF-PhM. O corante MVB é uma espécie neutra, enquanto MV6B é uma espécie catiônica, figura 2. A velocidade de associação das moléculas livres de MV6B e BLF e a dissociação do [BLF-MV6B]^o (BLF-MV6B $k_a = 1.1 \times 10^4$ M⁻¹s⁻¹ e $k_d = 3.9 \times 10^{-2}$ s⁻¹) foi 2,4 e 1,2 vezes mais rápido do que o processo de associação e dissociação semelhante para interação da [BLF-MVB]^o (BLF-MVB $k_a = 4.05 \times 10^3$ M⁻¹s⁻¹ e $k_d = 3.29 \times 10^{-2}$ s⁻¹) respectivamente, a 25°C. Para outras temperaturas $k_{a,MV6B} > k_{a,MVB}$ e $k_{d,MV6B} > k_{d,MVB}$. Os maiores valores de k_a para MV6B são provavelmente causados por seu caráter

hidrofóbico inferior ao da molécula MVB, os quais promovem uma interação mais hidrofílica que ocorre na superfície do BLF causando mudanças conformacionais menos intensas e/ou modificação da camada de solvatação. A mesma explicação usada para o efeito da carga no processo de associação pode ser aplicada para a etapa de dissociação.

O efeito da carga da molécula de PhM também foi observado nos valores energéticos dos processos de associação causando uma diminuição nos valores de $E_{act, a}$ e ΔH^{\ddagger}_a , ($E_{act, a, [BLF-MVB]} = 75.09 \text{ kJ mol}^{-1}$; $E_{act, a, [BLF-MV6B]} = 57.84 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta H^{\ddagger}_a, [BLF-MVB] = 72.61 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta H^{\ddagger}_a, [BLF-MV6B] = 55.36 \text{ kJ mol}^{-1}$). Apesar da repulsão eletrostática causada pelas cargas positivas presentes nas estruturas MV6B e BLF, em pH = 7,4, os valores de $E_{act, a}$ e ΔH^{\ddagger}_a são maiores para a associação MVB (molécula de corante sem carga) no local de ligação do BLF, porque, como discutido acima, MVB é mais hidrofóbico do que MV6B. Esta maior hidrofobia torna uma inserção mais profunda da molécula MVB dentro do sítio BLF promovendo uma mudança conformacional mais intensa e um grande número de moléculas de água liberadas das conchas de solvatação, promovendo um aumento no valor de $T\Delta S^{\ddagger}_a$ quando comparado ao corante MV6B ($T\Delta S^{\ddagger}_a, [BLF-MVB] = 20.19 \text{ kJ mol}^{-1}$; $T\Delta S^{\ddagger}_a, [BLF-MV6B] = 5.43 \text{ kJ mol}^{-1}$), a 298,15 K.

Por outro lado, para o processo de dissociação, a presença da carga da molécula de PhM causou uma diminuição nos valores de $E_{act, d}$ e ΔH^{\ddagger}_d , ($E_{act, d, [BLF-MVB]} = 17.27 \text{ kJ mol}^{-1}$; $E_{act, d, [BLF-MV6B]} = 6.54 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta H^{\ddagger}_d, [BLF-MVB] = 14.79 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta H^{\ddagger}_d, [BLF-MV6B] = 4.06 \text{ kJ mol}^{-1}$). No processo de conversão de $[BLF-MV6B]^{\circ} \rightarrow [BLF-MV6B]^{\ddagger}$, o caráter hidrofílico do MV6B promove sua interação na superfície do BLF, fazendo com que sua mudança conformacional e a ruptura da camada de solvatação ocorram em uma extensão menor do que aquela associada ao processo de conversão similar do BLF-MVB, resultando a valores de barreira de potencial energético mais baixos. Os valores negativos de $T\Delta S^{\ddagger}_d$ mostram que a estrutura química do $[BLF-PhM]^{\ddagger}$ tem um grau de liberdade rotacional e de conformação menor do que o $[BLF-PhM]^{\circ}$. Esta perda de liberdade rotacional e conformacional foi maior para o sistema BLF-MV6B para todas as temperaturas, indicando que a presença de carga positiva induziu interação de aminoácido - repulsão eletrostática MV6B, aumentando assim a barreira potencial rotacional e impedindo algum processo rotacional angular.

5.2.5 Termodinâmica do processo de formação do complexo BLF-PhM

As forças intermoleculares entre pequenas moléculas orgânicas como corantes PhM e macromoléculas biológicas (BLF) incluem: hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, van der Waals, empilhamento $\pi - \pi^*$ e interações eletrostáticas (ROSS *et al.*, 1981). A fim de determinar as forças motrizes de formação dos complexos [BLF-PhM]^o, é fundamental determinar os parâmetros termodinâmicos (ΔG° , ΔH° e ΔS°). Para determinar esses parâmetros termodinâmicos, utilizou-se as equações de 10–12. A tabela 3 mostra os parâmetros termodinâmicos das interações [BLF-PhM]^o em diferentes temperaturas.

Tabela 3. Valores da variação da entalpia padrão (ΔH°), variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°) e variação da entropia padrão ($T\Delta S^\circ$) para a formação dos complexos [BLF-AO]^o, [BLF-MVB]^o, [BLF-MV2B]^o, [BLF-MV6B]^o e [BLF-MV10B]^o em diferentes temperaturas, em pH 7,4.

T	[BLF – AO] ^o				[BLF – MVB] ^o			
	K _b	ΔH°	ΔG°	T ΔS°	K _b	ΔH°	ΔG°	T ΔS°
K	10 ⁵ M ⁻¹		kJ mol ⁻¹		10 ⁵ M ⁻¹		kJ mol ⁻¹	
285,15	1,28 ± 0,04	31,21 ± 1,33	-27,87 ± 0,88	59,08 ± 1,86	0,42 ± 0,02	57,82 ± 2,67	-25,21 ± 1,05	83,03 ± 3,47
289,15	1,58 ± 0,07		-28,78 ± 1,20	59,99 ± 2,51	0,58 ± 0,03		-26,39 ± 1,51	84,21 ± 4,83
293,15	1,85 ± 0,07		-29,56 ± 1,14	60,77 ± 2,35	0,79 ± 0,05		-27,49 ± 1,57	85,32 ± 4,88
297,15	2,21 ± 0,11		-30,40 ± 1,56	61,62 ± 3,17	1,16 ± 0,05		-28,80 ± 1,20	86,63 ± 3,60
298,15	2,29 ± 0,07		-30,60 ± 0,96	61,81 ± 1,93	1,23 ± 0,05		-29,05 ± 1,10	86,88 ± 3,28
301,15	2,58 ± 0,16		-31,20 ± 1,91	62,41 ± 3,82	1,46 ± 0,06		-29,78 ± 1,24	87,60 ± 3,64
T	[BLF - MV2B] ^o				[BLF - MV6B] ^o			
K	K _b	ΔH°	ΔG°	T ΔS°	K _b	ΔH°	ΔG°	T ΔS°
K	10 ⁵ M ⁻¹		kJ mol ⁻¹		10 ⁵ M ⁻¹		kJ mol ⁻¹	
285,15	0,51 ± 0,03	44,19 ± 1,95	-25,72 ± 1,32	69,90 ± 3,58	1,10 ± 0,05	51,16 ± 2,28	-27,52 ± 1,19	78,69 ± 3,41
289,15	0,67 ± 0,02		-26,70 ± 0,85	70,89 ± 2,25	1,44 ± 0,07		-28,56 ± 1,48	79,73 ± 4,13
293,15	0,85 ± 0,04		-27,65 ± 1,15	71,84 ± 2,98	1,95 ± 0,08		-29,68 ± 1,22	80,85 ± 3,33
297,15	1,10 ± 0,05		-28,67 ± 1,37	72,86 ± 3,48	2,60 ± 0,08		-30,80 ± 0,97	81,97 ± 2,58
298,15	1,18 ± 0,05		-28,95 ± 1,23	73,14 ± 3,11	2,85 ± 0,12		-31,13 ± 1,32	82,30 ± 3,50
301,15	1,36 ± 0,07		-29,60 ± 1,49	73,79 ± 3,70	3,40 ± 0,19		-31,89 ± 1,82	83,05 ± 4,75
T	[BLF - MV10B] ^o							
K	K _b	ΔH°	ΔG°	T ΔS°				
K	10 ⁵ M ⁻¹		kJ mol ⁻¹					
285,15	3,04 ± 0,11	54,09 ± 2,43	-29,93 ± 1,13	84,02 ± 3,18				
289,15	4,17 ± 0,20		-31,11 ± 1,50	85,20 ± 4,10				
293,15	5,72 ± 0,29		-32,31 ± 1,65	86,40 ± 4,42				
297,15	7,63 ± 0,39		-33,46 ± 1,72	87,56 ± 4,51				
298,15	8,23 ± 0,34		-33,76 ± 1,41	87,85 ± 3,66				
301,15	10,16 ± 0,40		-34,63 ± 1,37	88,72 ± 3,50				

Os valores de K_b dependeram da estrutura química dos corantes e sua magnitude variou entre $1,23 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para [BLF-MVB] $^\circ$ a $8,23 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para [BLF-MV10B] $^\circ$, a 25 °C. O aumento da temperatura favorece a formação de [BLF-PhM] $^\circ$ indicando que o processo de formação do complexo é endotérmico. Coelho e colaboradores (2019), encontraram que os valores de K_b para [BLF-AZA] $^\circ$ foi $1,75 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, enquanto K_b para [BLF-MB] $^\circ$ foi $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, a 25°C, mostrando que a BLF interage do mesmo modo com os corantes PhM e fenotiazina (COELHO *et al.*, 2019). O sinal negativo de ΔG° revela que, no equilíbrio termodinâmico, o complexo [BLF-PhM] $^\circ$ é mais estável do que as moléculas de BLF e PhM livres em solução. Os valores positivos de ΔH° e ΔS° revelaram que a formação desses complexos foi conduzida entropicamente, provavelmente porque as interações hidrofóbicas contribuíram predominantemente para a formação do complexo [BLF-PhM] $^\circ$. A fim de analisar a contribuição dos diferentes grupos químicos presentes na estrutura química do corante, cada parâmetro termodinâmico foi comparado e analisado para corantes com estruturas químicas semelhantes.

5.2.6 Efeito do número do grupo -CH₃ nos parâmetros termodinâmicos

Para melhor elucidar o poder de condução envolvido na interação BLF-PhM, é necessário avaliar como o número de grupos -CH₃ na estrutura do corante afeta os parâmetros termodinâmicos. O aumento do número de grupos metil na estrutura do corante causou um aumento nos valores de K_b , diminuindo linearmente os valores de ΔG° (figura S12), demonstrando que, para todas as temperaturas estudadas, cada grupo metil contribui com cerca de $2,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ para a estabilização do complexo [BLF-PhM] $^\circ$.

Ao contrário de ΔG° , os valores de ΔH° e $T\Delta S^\circ$ aumentaram à medida que o número de grupos -CH₃ ligados à molécula de corante aumentou, tabela 3. As alterações nos valores de ΔH° e $T\Delta S^\circ$ são causadas pelos seguintes processos moleculares: i) repulsão eletrostática pelas cargas positivas presentes nas moléculas de PhM e BLF em pH 7,4; ii) absorção de energia para quebrar a camada de solvatação das moléculas BLF e PhM livres; iii) mudanças conformacionais dos locais de ligação às proteínas; iv) interação direta corante-proteína no local de ligação da proteína. O efeito -CH₃ pode ser atribuído ao aumento da energia de absorção nas

etapas (ii) e (iii), que foi mais intenso do que a energia liberada na etapa (iv). Consequentemente, o maior número de moléculas de água liberadas, bem como as alterações conformacionais do sítio BLF mais intensas causadas pelo aumento no número de grupos $-CH_3$, promoveram o aumento dos valores de ΔH° e $T\Delta S^\circ$. O efeito positivo do grupo $-CH_3$ nos valores de ΔH° e no $T\Delta S^\circ$ deriva de interações hidrofóbicas, indicando que a interação das moléculas de PhM ocorre nos sítios hidrofóbicos da BLF.

Xu *et al.*, (2009) e Qin *et al.*, (2016) estudaram a interação de BSA e MV10B por técnicas de fluorescência, *docking* molecular, espalhamento de luz dinâmico, absorção de UV-visível e espectroscopia FTIR, em pH 7,4. Ambos grupos de pesquisa relataram valores de K_b na ordem de $10^4 M^{-1}$ e sugeriram que as interações hidrofóbicas foram fundamentais para a estabilização do complexo $[BSA-MV10B]^\circ$, com valores de ΔH° e $T\Delta S^\circ$ ($\Delta H^\circ = 29.17 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $T\Delta S^\circ = 56.32 \text{ kJ mol}^{-1}$) e ($\Delta H^\circ = 17.90 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $T\Delta S^\circ = 41.37 \text{ kJ mol}^{-1}$), para os relatórios de Xu e Qin, respectivamente (QIN *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2009).

5.2.7 Efeito dos grupos fenil nos parâmetros termodinâmicos

O aumento no número de grupos fenil na estrutura do corante fez com que os valores de ΔH° e $T\Delta S^\circ$ aumentassem ($\Delta H^\circ_{[BLF-AO]^\circ} = 31.21 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta H^\circ_{[BLF-MV2B]^\circ} = 44.19 \text{ kJ mol}^{-1}$) e ($T\Delta S^\circ_{[BLF-AO]^\circ} = 61.81 \text{ kJ mol}^{-1}$; $T\Delta S^\circ_{[BLF-MV2B]^\circ} = 73.14 \text{ kJ mol}^{-1}$), a 25 °C. Como discutido acima, a adição de um anel fenil na estrutura química do corante aumentou os valores de ΔH° e $T\Delta S^\circ$, porque mais energia é necessária para: i) liberar moléculas de água que dissolvem este anel fenil extra e ii) quebrar as interações de aminoácidos perto do local de ligação da BLF.

5.2.8 Efeito da carga nos parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos foram muito afetados pela presença da carga na estrutura do corante. Os valores de ΔH° e $T\Delta S^\circ$ diminuíram com a presença da carga na molécula do corante ($\Delta H^\circ_{[BLF-MVB]^\circ} = 57.82 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta H^\circ_{[BLF-MV6B]^\circ} = 51.16 \text{ kJ mol}^{-1}$) e ($T\Delta S^\circ_{[BLF-MVB]^\circ} = 86.88 \text{ kJ mol}^{-1}$; $T\Delta S^\circ_{[BLF-MV6B]^\circ} = 82.30 \text{ kJ mol}^{-1}$), a 298,15K. A diminuição dos valores de ΔH° e $T\Delta S^\circ$ causada pela presença da carga foi induzida pelo maior caráter hidrofílico do MV6B que promove sua interação na superfície da

BLF, fazendo com que a mudança conformacional do MV6B e da BLF e a liberação da camada de solvatação ocorram em uma extensão menor do que aquela associada ao processo de conversão semelhante ao BLF-MVB.

5.2.9 Conclusão

Neste trabalho, investigou-se os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação do BLF com os corantes PhM. Os dados mostraram que no equilíbrio termodinâmico a formação dos complexos BLF-PhM é mais favorável do que ligantes livres em solução. As taxas de associação de moléculas livres de BLF e PhM e a dissociação do complexo termodinamicamente estável [BLF-PhM]^o aumentam com o aumento da temperatura.

Os grupos funcionais ligados à estrutura do corante causaram alterações nos parâmetros energéticos na formação do complexo BLF-PhM. O aumento no número de grupos metil na estrutura química do corante PhM [MV10B (6 -CH₃) > MV6B (5 -CH₃) e MV2B (4 -CH₃)], promoveu um aumento na taxa de associação no sítio de ligação da BLF e uma diminuição na taxa de dissociação dos complexos termodinamicamente estáveis, aumentando assim os valores de K_b (K_{b, [BLF-MV2B]}^o = 1.18 × 10⁵ M⁻¹; K_{b, [BLF-MV6B]}^o = 2.85 × 10⁵ L mol⁻¹; K_{b, [BLF-MV10B]}^o = 1.02 × 10⁶ M⁻¹). O gasto energético promovido pela presença de grupos metil foi demonstrado pelos valores de ΔH^o (ΔH^o_[BLF-MV2B] = 44.19 kJ mol⁻¹; ΔH^o_[BLF-MV6B] = 51.16 kJ mol⁻¹; ΔH^o_[BLF-MV10B] = 54.09 kJ mol⁻¹), e nos valores de TΔS^o, (TΔS^o_[BLF-MV2B] = 73.14 kJ mol⁻¹; TΔS^o_[BLF-MV6B] = 82.30 kJ mol⁻¹; TΔS^o_[BLF-MV10B] = 87.85 kJ mol⁻¹), a 298,15 K. Por outro lado, o aumento no número de grupos fenil nas estruturas dos corantes AO (dois anéis) e MV2B (três anéis) é de difícil acesso ao sítio de ligação da BLF, promovendo uma diminuição dos valores de K_b (K_{b, [BLF-MV2B]}^o = 1.18 × 10⁵ M⁻¹; K_{b, [BLF-AO]}^o = 2.29 × 10⁵ M⁻¹). No entanto, o aumento da hidrofobicidade de MV2B em comparação com AO causou um aumento nos valores de ΔH^o e TΔS^o. O efeito da carga sobre o corante, ao comparar as estruturas dos corantes MVB e M6B, foi evidenciado pelos parâmetros cinéticos e termodinâmicos. O gasto energético necessário para romper a camada de solvatação do corante MVB é maior em relação ao corante MV6B, promovendo um aumento no parâmetro energético. A presença de carga também promoveu um aumento nos valores de K_b (K_{b, [BLF-MVB]}^o = 1.23 × 10⁵ M⁻¹; K_{b, [BLF-MV6B]}^o = 2.85 × 10⁵ M⁻¹), a 25 °C.

A formação dos complexos [BLF-PhM]^o foi conduzida entropicamente. Os valores positivos de ΔH^o e TΔS^o revelaram que as interações hidrofóbicas foram mais pronunciadas para a estabilização dos complexos. Este estudo forneceu uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pelas interações proteína-corante. O

conhecimento desses mecanismos de ligação é fundamental para a otimização e desenvolvimento de novos medicamentos usando corantes PhM.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. B. Predição de Estrutura Terciária de Proteínas com Técnicas Multiobjetivo no Algoritmo de Monte Carlo. p. 129, 2016.

ATALE, S. S. et al. Understanding the nano-bio interactions using real-time surface plasmon resonance tool. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 97–107, 2019.

BAPTISTA, M. S.; INDIG, G. L. Effect of BSA Binding on Photophysical and Photochemical Properties of Triarylmethane Dyes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 23, p. 4678–4688, 1998.

CAGNIN, R. L. [UNESP]. Método de Wang-Landau para sequenciamento de aminoácidos em estrutura nativa de proteínas em modelos de rede. p. 79 f. : il., tabs., 2010.

COELHO, Y. L. et al. Lactoferrin-phenothiazine dye interactions: Thermodynamic and kinetic approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 559–569, 2019.

ČULO, F. et al. Anti-tumoral and anti-inflammatory effects of biological stains. **Agents and Actions**, v. 34, n. 3–4, p. 424–428, 1991.

DAS, S. et al. Molecular binding of toxic phenothiazinium derivatives, azures to bovine serum albumin: A comparative spectroscopic, calorimetric, and in silico study. **J. Mol. Recognit**, v. 30, p. 1–11, 2016.

DE CARVALHO, R. M.; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR - Uma nova ferramenta para biossensores. **Quimica Nova**, v. 26, n. 1, p. 97–104, 2003.

DE PAULA, H. M. C. et al. Kinetics and thermodynamics of bovine serum albumin interactions with Congo red dye. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p.

737–742, 2017.

DENMAN, S. et al. Photostability of crystal violet (CI 42555). **Dyes and Pigments**, v. 30, n. 1, p. 67–72, 1996.

DOERGE, D. R. et al. Mechanism for Inhibition of Thyroid Peroxidase by Leucomalachite Green. n. 97, p. 1098–1104, 1998.

DRAKE, A. W. et al. Biacore surface matrix effects on the binding kinetics and affinity of an antigen/antibody complex. **Analytical Biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 58–69, 2012.

EFTINK, M. R.; GHIRON, C. A. Fluorescence Quenching of Indole and Model Micelle Systems'. v. 80, n. 5, 1976.

EMBLETON, N. D. et al. Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 18, n. 3, p. 143–149, 2013.

FATHI, F. et al. International Journal of Biological Macromolecules Kinetic studies of bovine serum albumin interaction with PG and TBHQ using surface plasmon resonance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1045–1050, 2016.

FATHI, F. et al. Kinetic and thermodynamic studies of bovine serum albumin interaction with ascorbyl palmitate and ascorbyl stearate food additives using surface plasmon resonance. **Food Chemistry**, v. 246, n. August 2017, p. 228–232, 2018.

FERREIRA, A. U. C. et al. Interaction of Auramine O with montmorillonite clays. **Journal of Luminescence**, v. 136, p. 63–67, 2013.

FLARAKOS, J.; MORAND, K. L.; VOUIROS, P. High-throughput solution-based medicinal library screening against human serum albumin. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 5, p. 1345–1353, 2005.

GARCÍA-MONTOYA, I. A. et al. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 3, p. 226–236, 2012.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, S. A.; ARÉVALO-GALLEGOS, S.; RASCÓN-CRUZ, Q. Lactoferrin: structure, function and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 4, p. 301.e1-301.e8, 2009.

GÜLLÜ, Ö.; AYDOĞAN, Ş.; TÜRÜT, A. Fabrication and electrical characteristics of Schottky diode based on organic material. **Microelectronic Engineering**, v. 85, n. 7, p. 1647–1651, 2008.

HAMEED, B. H. Equilibrium and kinetic studies of methyl violet sorption by agricultural waste. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, n. 1–3, p. 204–212, 2008.

Handbook of Surface Plasmon Resonance. [2nd Ed.: s.n.].

HASEGAWA, M. et al. Microviscosity in water pool of aerosol-OT reversed micelle determined with viscosity-sensitive fluorescence probe, auramine O, and fluorescence depolarization of xanthene dyes. **Journal of Physical Chemistry**, v. 98, n. 8, p. 2120–2124, 1994.

HUANG, H. Y.; WANG, C. M. Phenothiazine: An effective molecular adhesive for protein immobilization. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 8, p. 3560–3567, 2010.

HUDSON, E. A. et al. Energetic parameters of β -casein/quercetin activated and thermodynamically stable complex formation accessed by Surface Plasmon Resonance. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, p. 798–805, set. 2019.

IGLESIAS-FIGUEROA, B. F. et al. Lactoferrin as a nutraceutical protein from milk, an overview. **International Dairy Journal**, v. 89, p. 37–41, 2019.

ISENMANN, A. F. **Corantes**. [s.l: s.n.].

JUHÁSZ, Á. et al. General method for kinetic and thermodynamic evaluation of a receptor model peptide-drug molecule interaction studied by surface plasmon resonance. **Microchemical Journal**, v. 147, n. January, p. 311–318, 2019.

KHAN, A. Y.; KUMAR, G. S. A thermodynamic investigation on the binding of phenothiazinium dyes azure A and azure B to double stranded RNA polynucleotides. **THE JOURNAL OF CHEMICAL THERMODYNAMICS**, v. 91, p. 225–233, 2015.

KRAY, L. J. **Estudo cinético da fotodegradação de corantes comerciais utilizando semi-condutores de óxido de tântalo sintetizados a partir de líquidos iônicos.** [s.l: s.n.].

LELIS, C. A. et al. Binding thermodynamics of synthetic dye Allura Red with bovine serum albumin. **Food Chemistry**, v. 217, p. 52–58, 2017.

LELIS, C. A. et al. Insights into protein-curcumin interactions: Kinetics and thermodynamics of curcumin and lactoferrin binding. v. 105, n. February, 2020.

LEWIS, G. N. et al. Dimeric and Other Forms of Methylene Blue: Absorption and Fluorescence of the Pure Monomer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 65, n. 6, p. 1150–1154, 1943.

LIMA, C. H. M. et al. Doxorubicin hinders DNA condensation promoted by the protein bovine serum albumin (BSA). **Biopolymers**, v. 107, n. 12, 2017.

LIU, L.; GUO, Q. Isokinetic Relationship, Isoequilibrium Relationship, and Enthalpy – Entropy Compensation. **Chemical Review**, v. 101, n. 3, p. 673–695, 2001.

LUECK, H. B.; RICE, B. L.; MCHALE, J. L. Aggregation of triphenylmethane dyes in aqueous solution: Dimerization and trimerization of crystal violet and ethyl violet. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 48, n. 6, p. 819–828, 1992.

LUIZA, Y. et al. International Journal of Biological Macromolecules Lactoferrin-phenothiazine dye interactions : Thermodynamic and kinetic approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 559–569, 2019.

MALEY, A. M.; ARBISER, J. L. Gentian violet: A 19th century drug re-emerges in the 21st century. **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 12, p. 775–780, 2013.

MATHEW, T. V.; KURIAKOSE, S. Studies on the antimicrobial properties of colloidal silver nanoparticles stabilized by bovine serum albumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 14–18, 2013.

MITTAL, A.; GAJBE, V.; MITTAL, J. Removal and recovery of hazardous triphenylmethane dye, Methyl Violet through adsorption over granulated waste materials. **Journal of Hazardous Materials**, v. 150, n. 2, p. 364–375, 2008.

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

MOREIRA, M. B. et al. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Quimica Nova**, v. 38, n. 2, p. 227–232, 2015.

MORR, C. V; HA, E. Y. W. Critical Reviews in Food Science and Nutrition Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties Whey Protein Concentrates and Isolates: Processing and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 431–76, 1993.

MOWLA, R. et al. Kinetic analysis of the inhibition of the drug efflux protein AcrB using surface plasmon resonance. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1860, n. 4, p. 878–886, 2018.

MWALUPINDI, A. G. et al. Influence of organized media on the absorption and

fluorescence spectra of Auramine-O dye. **Talanta**, v. 41, n. 4, p. 599–609, 1994.

NAIK, K. M.; NANDIBEWOOR, S. T. Spectral characterization of the binding and conformational changes of bovine serum albumin upon interaction with an anti-fungal drug, methylparaben. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 105, p. 418–423, 2013.

NAKAGAWA, S.; SAKAKIBARA, K.; GOTOH, H. Novel degradation mechanism for triarylmethane dyes: Acceleration of degradation speed by the attack of active oxygen to halogen groups. **Dyes and Pigments**, v. 124, p. 130–132, 2016.

NUNES, N. M. et al. Surface plasmon resonance study of interaction between lactoferrin and naringin. **Food Chemistry**, v. 297, p. 125022, nov. 2019.

PATCHING, S. G. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 1 PARTA, p. 43–55, 2014.

PATIL, S.; SISTLA, S.; JADHAV, J. Interaction of small molecules with human tyrosinase: A surface plasmon resonance and molecular docking study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 1123–1129, 2016.

PAUL, B. K.; GHOSH, N.; MUKHERJEE, S. RSC Advances Direct insight into the nonclassical hydrophobic effect in bile salt: β -cyclodextrin interaction: role of hydrophobicity in governing the prototropism of a biological photosensitizer †. **RSC Advances**, v. 6, p. 9984–9993, 2016.

PAUL, P.; SURESH KUMAR, G. Thermodynamics of the DNA binding of phenothiazinium dyes toluidine blue O, azure A and azure B. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 64, p. 50–57, 2013.

PAULA, H. M. C. DE et al. Activated Complex Approach to Describe Bovine Serum Albumin-Azure A and Bovine Serum Albumin-Azure B Intermolecular Interactions. v.

31, n. 12, p. 2611–2619, 2020.

PEREIRA, R. V.; GEHLEN, M. H. Spectroscopy of auramine fluorescent probes free and bound to poly(methacrylic acid). **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 13, p. 6537–6542, 2006.

PETZER, A. et al. Azure B , a metabolite of methylene blue , is a high-potency , reversible inhibitor of monoamine oxidase. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 3, p. 403–409, 2012.

POULIOS, I. et al. Photocatalytic oxidation of Auramine O in the presence of semiconducting oxides. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 75, n. 3, p. 205–212, 2000.

QIN, M.; YIN, T.; SHEN, W. The Interaction Between Crystal Violet and Bovine Serum Albumin: Spectroscopic and Molecular Docking Investigations. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 37, n. 11, p. 1623–1629, 2016.

REZENDE, J. DE P. et al. Thermodynamic and kinetic study of epigallocatechin-3-gallate-bovine lactoferrin complex formation determined by surface plasmon resonance (SPR): A comparative study with fluorescence spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 95, n. May, p. 526–532, 2019.

REZENDE, J. DE P. et al. Human serum albumin-resveratrol complex formation: Effect of the phenolic chemical structure on the kinetic and thermodynamic parameters of the interactions. **Food Chemistry**, v. 307, p. 125514, 2020.

RIBEIRO, O. A. S. DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSENSOR PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-Trypanosoma cruzi POR MEIO DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE. **Dissertação: Mestrado**, n. 38, p. 153, 2014.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions:

Forces Contributing to Stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1981.

SCHUBERT, F. et al. Comparative thermodynamic analysis of DNA-protein interactions using surface plasmon resonance and fluorescence correlation spectroscopy. **Biochemistry**, v. 42, n. 34, p. 10288–10294, 2003.

SEARCH, H. et al. Association of Dye Molecules and Its Spectroscopic Manifestation Association of Dye Molecules and Its Spectroscopic Manifestation. v. 1076, 1979.

SHAHABADI, N.; MAGHSUDI, M.; ROUHANI, S. Study on the interaction of food colourant quinoline yellow with bovine serum albumin by spectroscopic techniques. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1836–1841, 2012.

SHARMA, A. S.; ANANDAKUMAR, S.; ILANCHELIAN, M. In vitro investigation of domain specific interactions of phenothiazine dye with serum proteins by spectroscopic and molecular docking approaches. **RSC Adv.**, v. 4, n. 68, p. 36267–36281, 2014.

SHARMA, S.; SUBRAMANIAN, N.; MALAICHAMY, I. Journal of Photochemistry & Photobiology , B: Biology New insights into the dimerization and site-specific cooperative interaction of Azure B with model transport proteins by spectroscopic and computational studies. **JPB**, v. 164, p. 212–225, 2016.

SHI, J. HUA et al. Characterizing the binding interaction between antimalarial artemether (AMT) and bovine serum albumin (BSA): Spectroscopic and molecular docking methods. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 14–23, 2016.

SILVA, I. R. **Enovelamento protéico: fatores topológicos**. [s.l: s.n.].

SLOKAR, Y. M.; MAJCEN LE MARECHAL, A. Methods of decoloration of textile wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 37, n. 4, p. 335–356, 1998.

VENNERSTROM, J. L. et al. Antimalarial Dyes Revisited: Xanthenes, Azines, Oxazines, and Thiazines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2671–

2677, 1995.

WAINWRIGHT, M.; BYRNE, M. N.; GATTRELL, M. A. Phenothiazinium-based photobactericidal materials. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, n. 3, p. 227–230, 2006.

WALLY, J.; BUCHANAN, S. K. A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. **BioMetals**, v. 20, n. 3–4, p. 249–262, 2007.

WANG, W.; ROBERTS, C. J. Non-arrhenius protein aggregation. **AAPS Journal**, v. 15, n. 3, p. 840–851, 2013.

WISCHIK, C. M. et al. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 20, p. 11213–11218, 1996.

XU, H. et al. Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of crystal violet with bovine serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 919, n. 1–3, p. 334–338, 2009.

ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. **Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento**. [s.l: s.n.].

ZEYADA, H. M. et al. Annealing temperatures induced optical constant variations of methyl violet 2B thin films manufactured by the spin coating technique. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 358, n. 3, p. 625–636, 2012.

ZHANG, Y. Z. et al. Interaction of malachite green with bovine serum albumin: Determination of the binding mechanism and binding site by spectroscopic methods. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n. 2–3, p. 1345–1352, 2009.

MATERIAIS SUPLEMENTARES

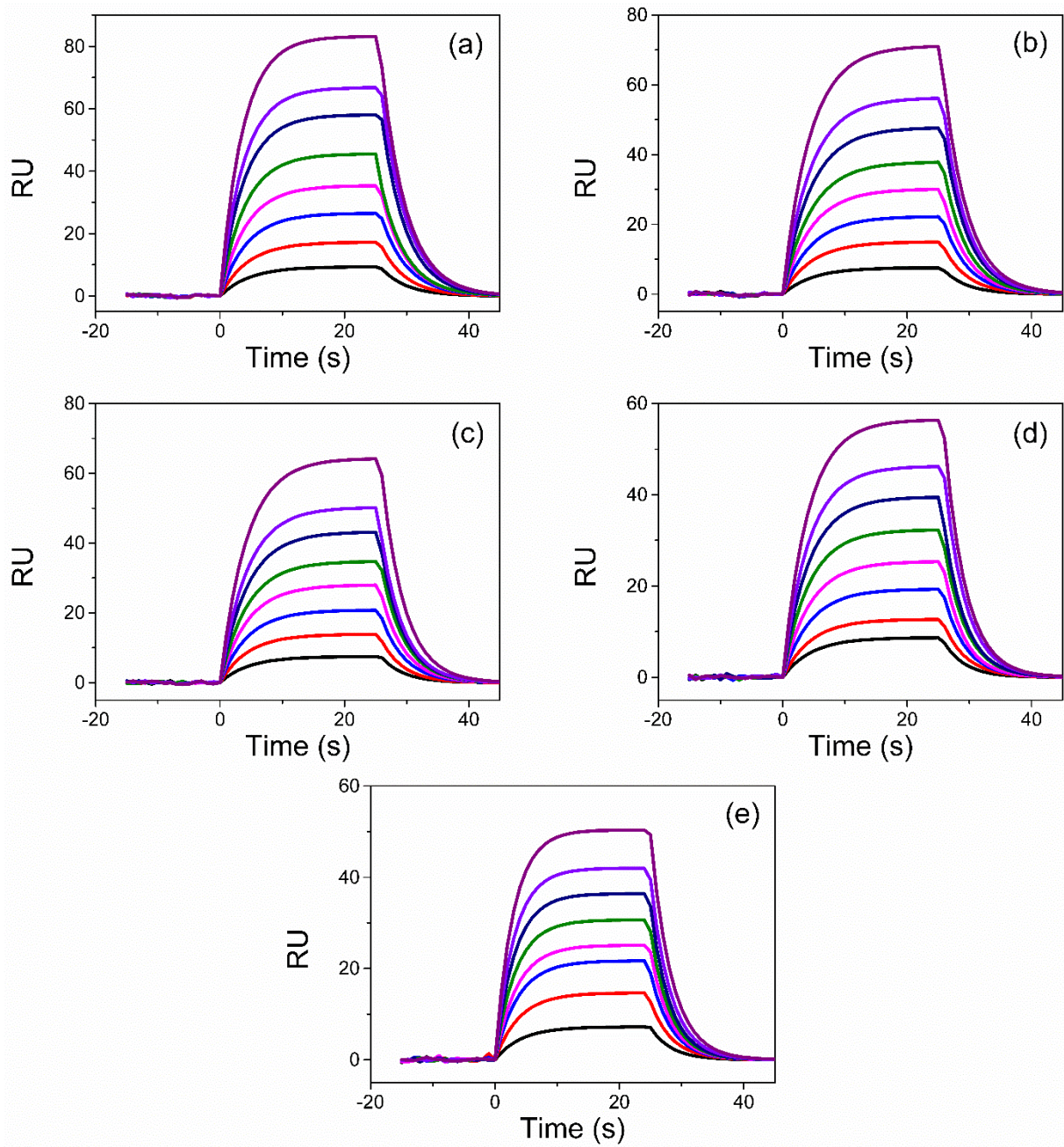


Figura S1. Sensorgramas para cinética de interação AZA de 1 – 8 μM para soluções que fluem sobre uma superfície de chip sensor BSA imobilizada CM5 de baixa densidade (3728 RU) em um chip sensor CM5 Biacore em temperaturas: (a) 12 °C, (b) 16 °C, (c) 20 °C, (d) 24 °C e (e) 28 °C.

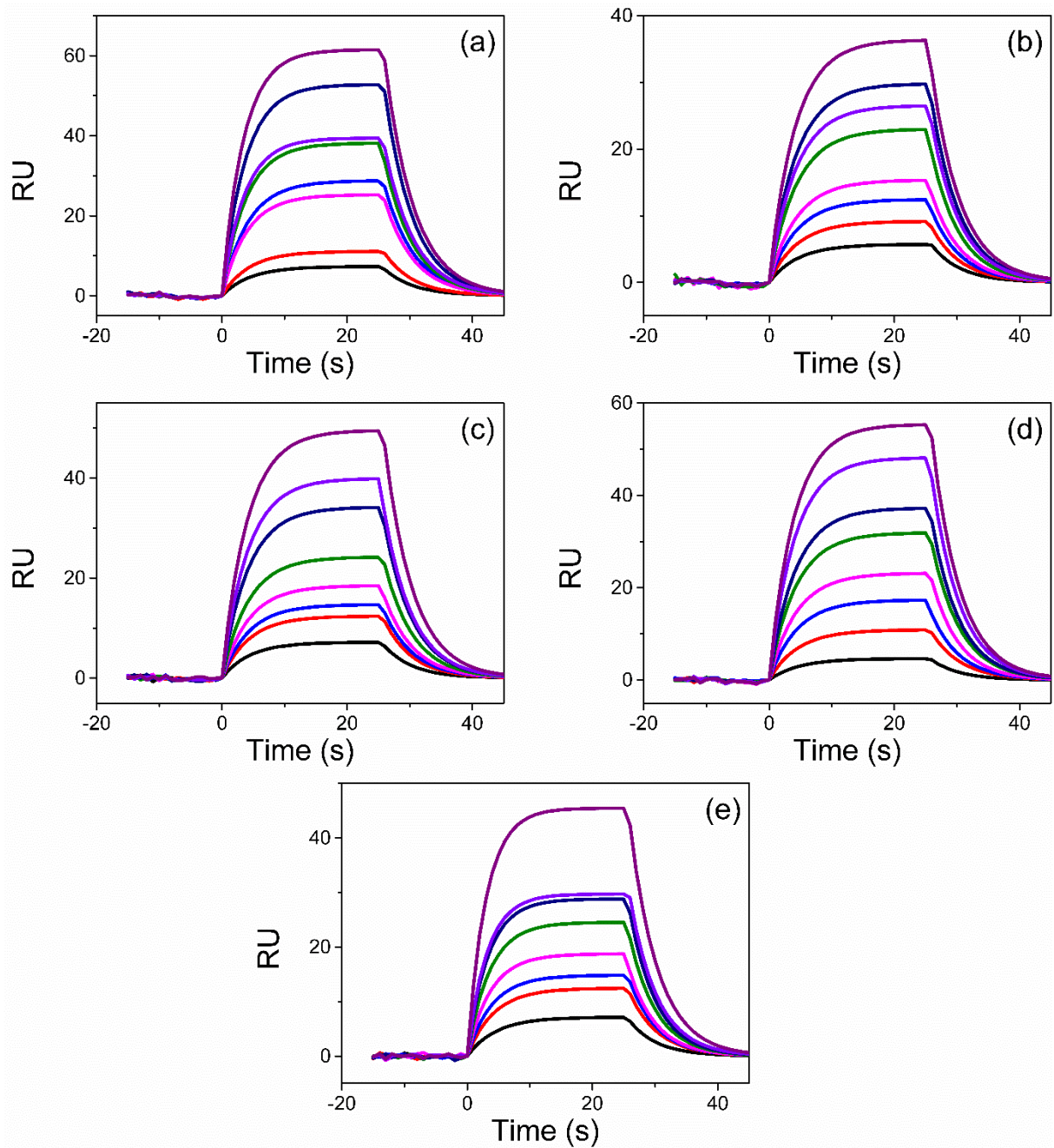


Figura S2. Sensorgramas para cinética de interação AZA de 1 – 8 μM para soluções que fluem sobre uma superfície de chip sensor BSA imobilizada CM5 de baixa densidade (3728 RU) em um chip sensor CM5 Biacore em temperaturas: (a) 12 $^{\circ}\text{C}$, (b) 16 $^{\circ}\text{C}$, (c) 20 $^{\circ}\text{C}$, (d) 24 $^{\circ}\text{C}$ e (e) 28 $^{\circ}\text{C}$.

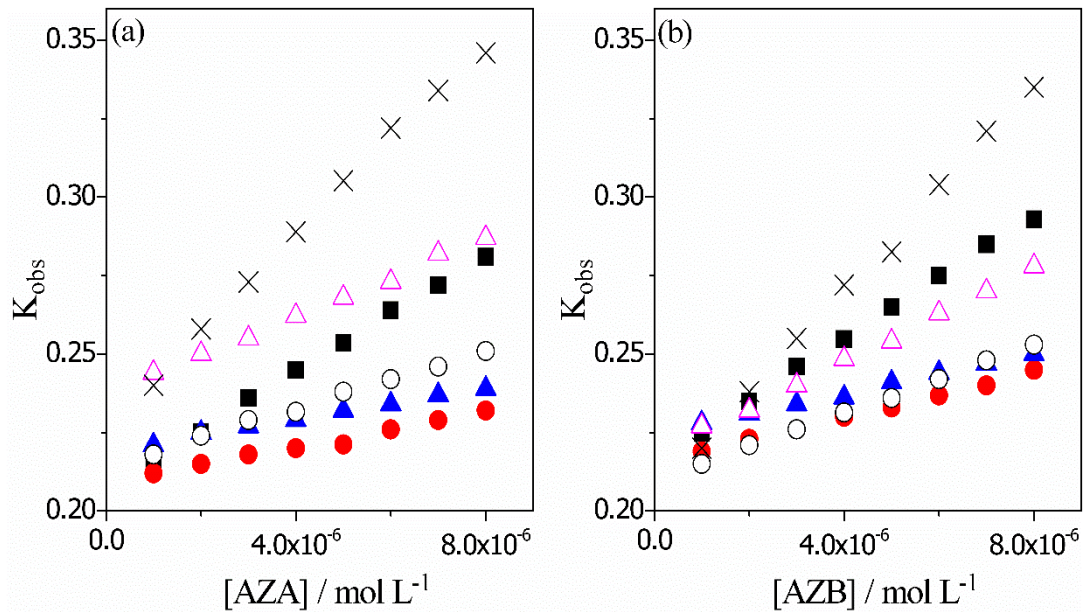


Figura S3. Gráfico de K_{obs} em função da concentração (a) BSA-AZA e (b) BSA-AZB, usado para determinar k_a em temperaturas: (■) 12 °C, (●) 16 °C, (▲) 20 °C, (○) 24 °C, (△) and (X) 28 °C.

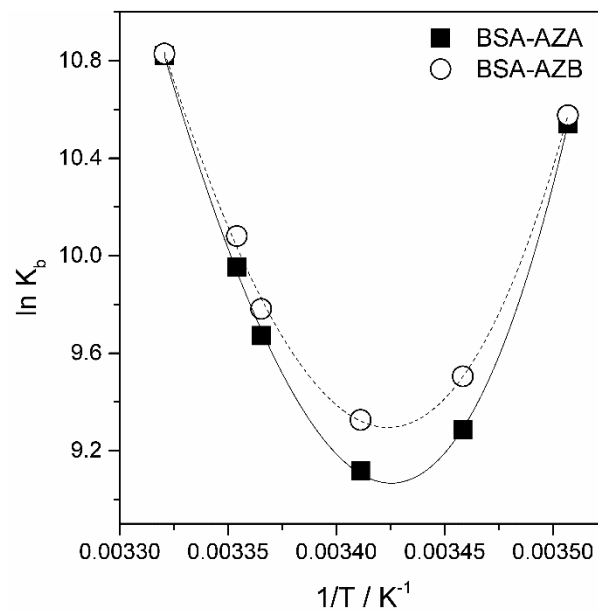


Figura S4. Gráfico de $\ln K_b$ em relação a $1/T$ (abordagem de van't Hoff) para a interação de: (■) BSA-AZA e (○) BSA-AZB.

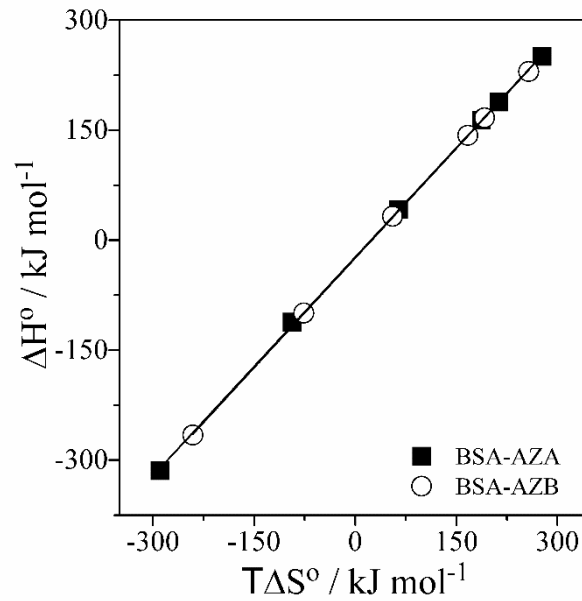


Figura S5. Gráficos de entalpia-entropia para (■) BSA-AZA e (○) BSA-AZB.

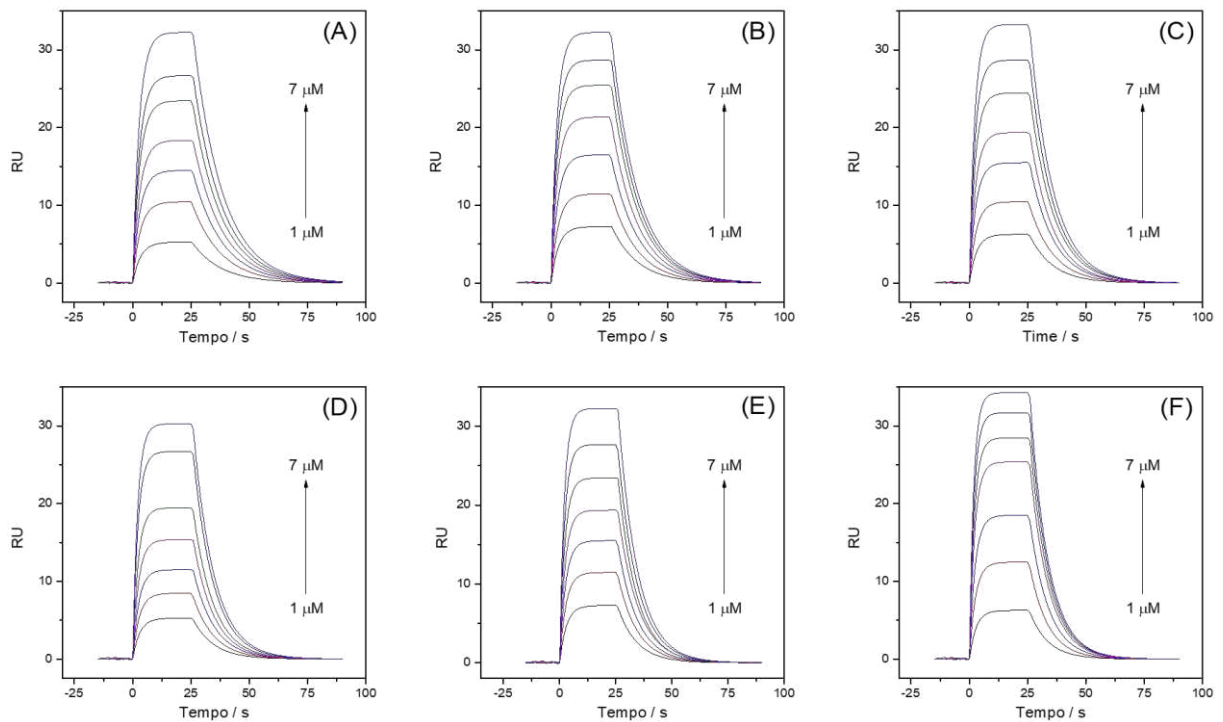


Figura S6. Mostra os sensorgramas (RU x tempo) mostra a interação AO e BLF imobilizado a uma densidade (3890,0 RU) em um chip sensor Biacore CM5 em diferentes temperaturas: (A) 285.15 K, (B) 289.15 K, (C) 293.15 K, (D) 297.15 K, (E) 298.15 K, and (F) 301.15 K. $1 \leq [\text{AO}] \leq 7 \mu\text{M}$.

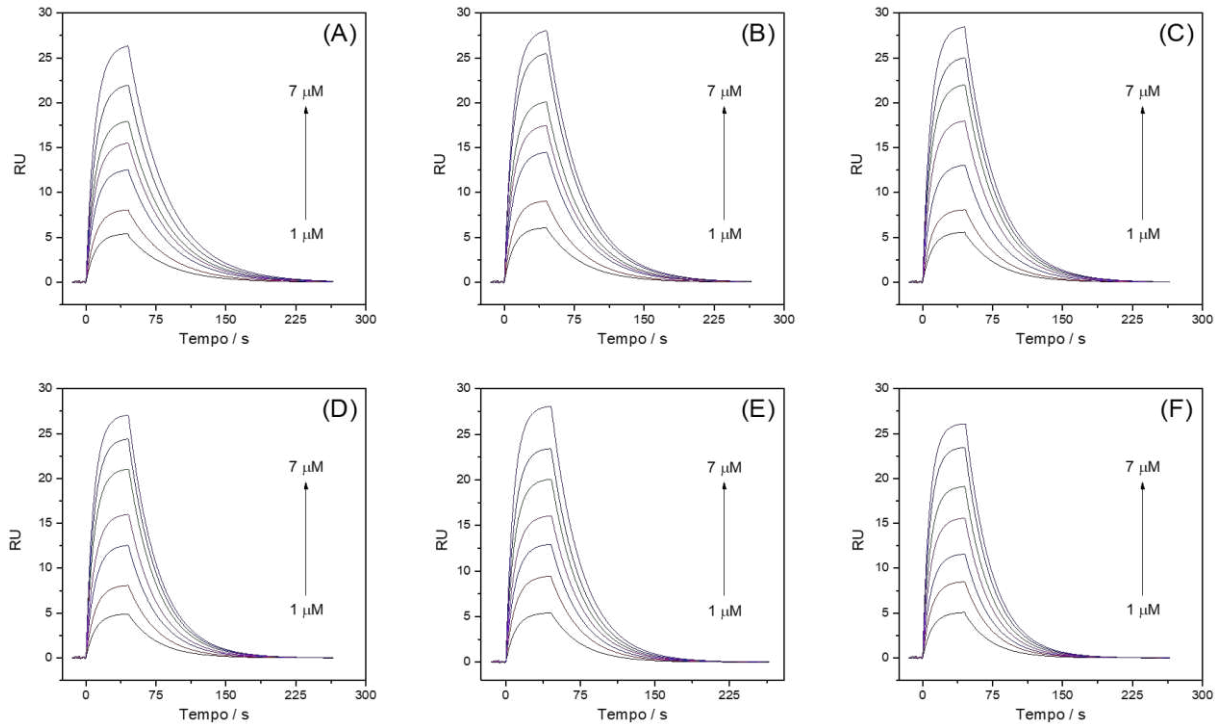


Figura S7. Mostra os sensorgramas (RU x tempo) mostra a interação MVB e BLF imobilizado a uma densidade (3890,0 RU) em um chip sensor Biacore CM5 em diferentes temperaturas: (A) 285.15 K, (B) 289.15 K, (C) 293.15 K, (D) 297.15 K, (E) 298.15 K, and (F) 301.15 K. $1 \leq [MVB] \leq 7 \mu\text{M}$.

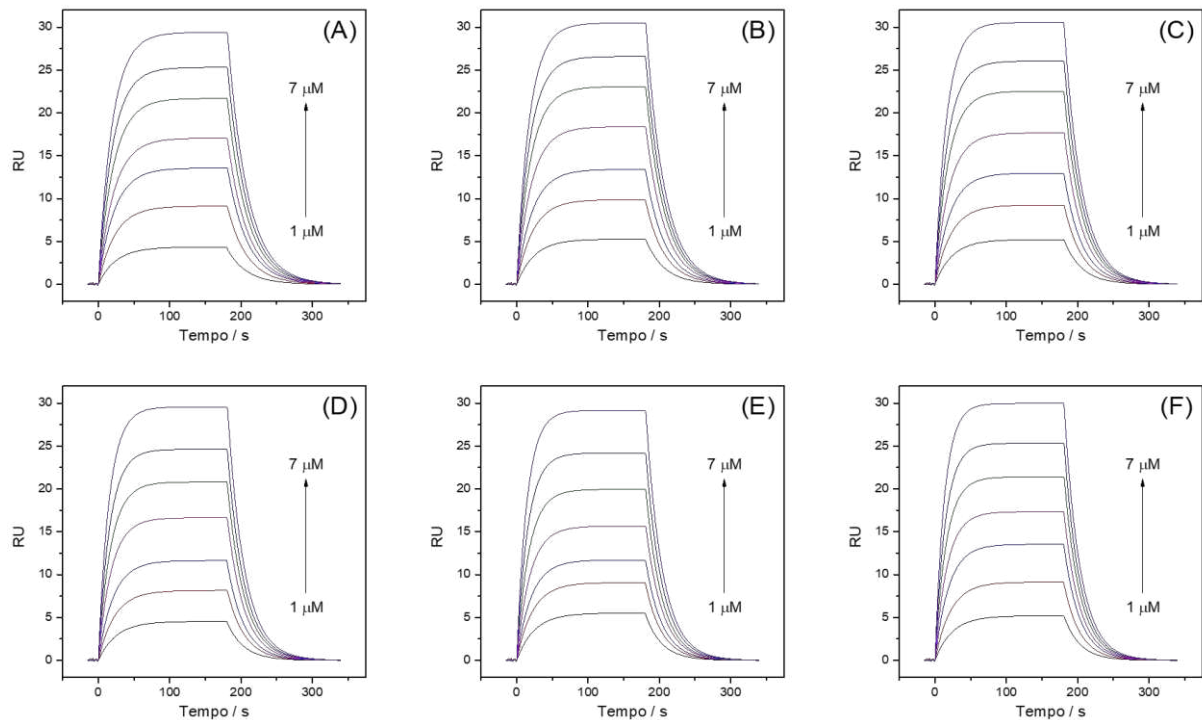


Figura S8. Mostra os sensorgramas (RU x tempo) mostra a interação MV2B e BLF imobilizado a uma densidade (3890,0 RU) em um chip sensor Biacore CM5 em

diferentes temperaturas: (A) 285.15 K, (B) 289.15 K, (C) 293.15 K, (D) 297.15 K, (E) 298.15 K, and (F) 301.15 K. $1 \leq [MV2B] \leq 7 \mu\text{M}$.

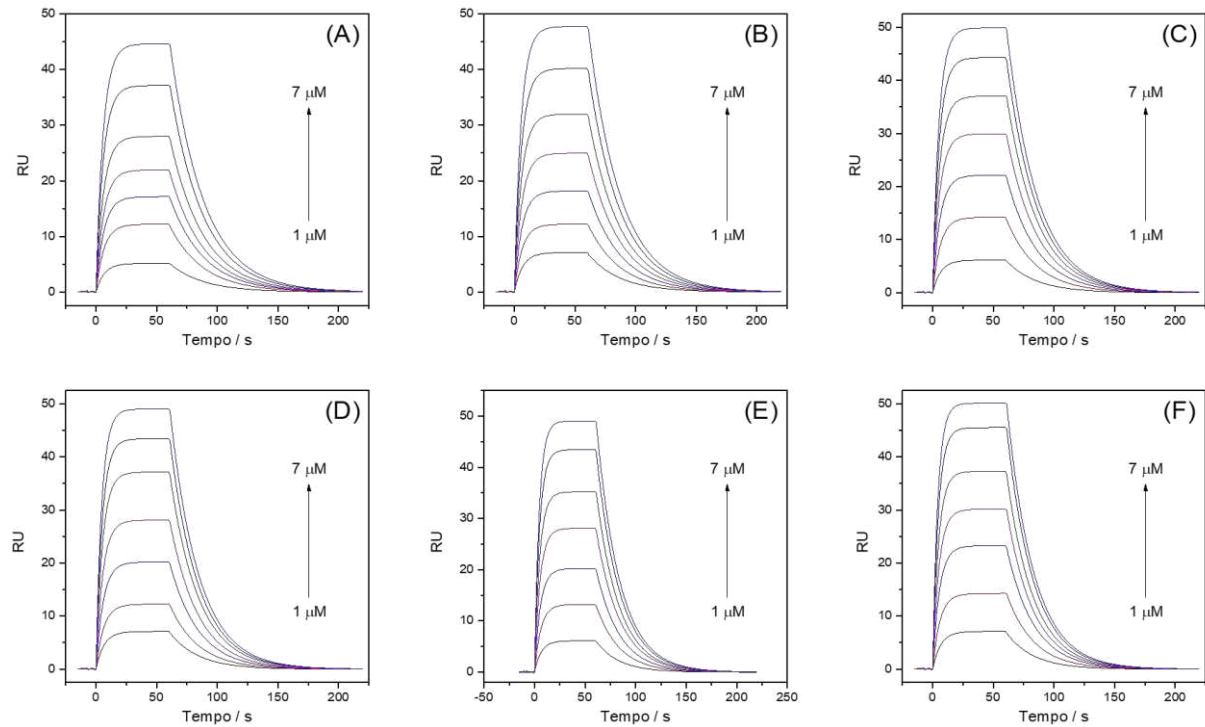


Figura S9. Mostra os sensorgramas (RU x tempo) mostra a interação MV6B e BLF imobilizado a uma densidade (3890,0 RU) em um chip sensor Biacore CM5 em diferentes temperaturas: (A) 285.15 K, (B) 289.15 K, (C) 293.15 K, (D) 297.15 K, (E) 298.15 K, and (F) 301.15 K. $1 \leq [MV6B] \leq 7 \mu\text{M}$.

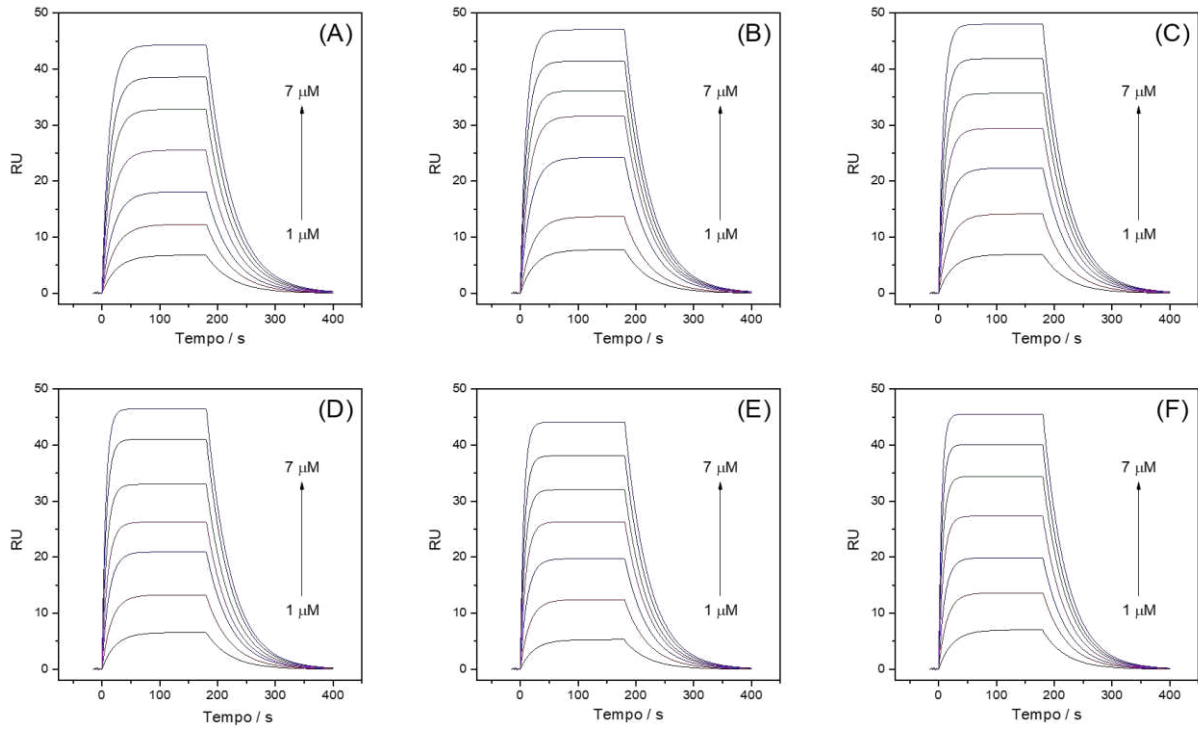


Figura S10. Mostra os sensorgramas (RU x tempo) mostra a interação MV10B e BLF imobilizado a uma densidade (3890,0 RU) em um chip sensor Biacore CM5 em diferentes temperaturas: (A) 285.15 K, (B) 289.15 K, (C) 293.15 K, (D) 297.15 K, (E) 298.15 K, and (F) 301.15 K. $1 \leq [\text{MV10B}] \leq 7 \mu\text{M}$.

Tabela S1. Parâmetros energéticos da formação do complexo de transição para: (a) associação de corante e moléculas livres de proteína e (d) dissociação do complexo termodinamicamente estável.

BLF – AO								
T	Fase de Associação (a)				Fase de Dissociação (d)			
	E_{act}	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$	E_{act}	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$
K	kJ mol ⁻¹							
285,15		49,39 ± 2,05	47,85 ± 1,99	1,55 ± 0,06		18,18 ± 0,46	75,72 ± 1,93	-57,53 ± 1,47
289,15		49,36 ± 1,41	47,77 ± 1,36	1,59 ± 0,05		18,15 ± 1,13	76,56 ± 4,77	-58,41 ± 3,64
293,15	51,76 ±	49,33 ± 2,09	47,80 ± 2,02	1,52 ± 0,06	20,55 ±	18,11 ± 0,76	77,36 ± 3,25	-59,25 ± 2,49
297,15	2,27	49,29 ± 2,56	47,75 ± 2,48	1,55 ± 0,08	0,99	18,08 ± 0,72	78,15 ± 3,11	-60,07 ± 2,39
298,15		49,28 ± 2,47	47,76 ± 2,40	1,52 ± 0,08		18,07 ± 1,04	78,36 ± 4,51	-60,28 ± 3,47
301,15		49,26 ± 2,39	47,77 ± 2,32	1,49 ± 0,07		18,05 ± 1,12	78,96 ± 4,92	-60,92 ± 3,80
BLF – MVB								
T	Fase de Associação (a)				Fase de Dissociação (d)			
	E_{act}	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$	E_{act}	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$
K	kJ mol ⁻¹							
285,15		73,05 ± 3,40	53,35 ± 2,48	19,70 ± 0,92		14,90 ± 0,81	78,56 ± 4,28	-63,66 ± 3,47
289,15		73,02 ± 3,09	53,08 ± 2,25	19,94 ± 0,84		14,86 ± 0,93	79,47 ± 4,97	-64,60 ± 4,04
293,15	75,42 ±	72,99 ± 3,12	52,89 ± 2,26	20,10 ± 0,86	17,27 ±	14,83 ± 0,94	80,38 ± 5,08	-65,55 ± 4,14
297,15	3,85	72,95 ± 3,76	52,47 ± 2,70	20,49 ± 1,06	0,91	14,80 ± 0,56	81,27 ± 3,07	-66,47 ± 2,51
298,15		72,95 ± 4,52	52,43 ± 3,25	20,52 ± 1,27		14,79 ± 0,67	81,48 ± 3,72	-66,69 ± 3,04
301,15		72,92 ± 4,46	52,35 ± 3,20	20,57 ± 1,26		14,76 ± 0,77	82,13 ± 4,30	-67,37 ± 3,52
BLF - MV2B								
T	Fase de Associação (a)				Fase de Dissociação (d)			
	E_{act}	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$	E_{act}	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$
K	kJ mol ⁻¹							
285,15		49,57 ± 2,14	51,89 ± 2,24	-2,33 ± 0,10		4,95 ± 0,23	77,74 ± 3,54	-72,79 ± 3,31
289,15		49,53 ± 2,37	51,93 ± 2,48	-2,40 ± 0,11		4,92 ± 0,28	78,76 ± 4,45	-73,84 ± 4,17
293,15	51,94 ±	49,50 ± 2,59	52,01 ± 2,72	-2,51 ± 0,13	7,32 ± 0,41	4,89 ± 0,30	79,79 ± 4,97	-74,90 ± 4,67
297,15	2,76	49,47 ± 2,79	51,98 ± 2,93	-2,52 ± 0,14		4,85 ± 0,29	80,81 ± 4,89	-75,96 ± 4,60
298,15		49,46 ± 2,91	51,95 ± 3,06	-2,50 ± 0,15		4,85 ± 0,31	81,06 ± 5,17	-76,21 ± 4,86
301,15		49,43 ± 2,98	52,08 ± 3,14	-2,65 ± 0,16		4,82 ± 0,23	81,84 ± 3,89	-77,02 ± 3,66
BLF - MV6B								
T	Fase de Associação (a)				Fase de Dissociação (d)			
	E_{act}	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$	E_{act}	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$
K	kJ mol ⁻¹							
285,15		55,47 ± 2,08	50,19 ± 1,88	5,28 ± 0,20		7,90 ± 0,38	77,61 ± 3,71	-69,71 ± 3,33
289,15		55,44 ± 2,37	50,17 ± 2,15	5,27 ± 0,23		7,86 ± 0,41	78,60 ± 4,11	-70,74 ± 3,70
293,15	57,84 ±	55,40 ± 2,52	50,10 ± 2,28	5,30 ± 0,24	10,27 ±	7,83 ± 0,40	79,60 ± 4,02	-71,77 ± 3,62
297,15	2,56	55,37 ± 2,40	50,01 ± 2,17	5,36 ± 0,23	0,49	7,80 ± 0,31	80,57 ± 3,18	-72,77 ± 2,87
298,15		55,36 ± 2,15	49,93 ± 1,94	5,43 ± 0,21		7,79 ± 0,32	80,79 ± 3,33	-73,00 ± 3,01
301,15		55,34 ± 3,18	49,95 ± 2,87	5,39 ± 0,31		7,76 ± 0,42	81,53 ± 4,44	-73,77 ± 4,02
BLF - MV10B								
T	Fase de Associação (a)				Fase de Dissociação (d)			
	E_{act}	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$	E_{act}	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$
K	kJ mol ⁻¹							
285,15		56,08 ± 2,66	48,81 ± 2,32	7,27 ± 0,35		1,99 ± 0,09	78,73 ± 3,59	-76,75 ± 3,50
289,15		56,04 ± 3,12	48,70 ± 2,71	7,35 ± 0,41		1,95 ± 0,11	79,81 ± 4,51	-77,86 ± 4,40
293,15	58,45 ±	56,01 ± 3,49	48,57 ± 3,03	7,44 ± 0,46	4,36 ± 0,25	1,92 ± 0,11	80,88 ± 4,75	-78,96 ± 4,63
297,15	3,38	55,98 ± 3,37	48,50 ± 2,92	7,47 ± 0,45		1,89 ± 0,11	81,97 ± 4,85	-80,08 ± 4,74
298,15		55,97 ± 3,50	48,47 ± 3,03	7,50 ± 0,47		1,88 ± 0,11	82,23 ± 4,81	-80,35 ± 4,70
301,15		55,94 ± 3,29	48,41 ± 2,85	7,53 ± 0,44		1,85 ± 0,12	83,04 ± 5,17	-81,19 ± 5,06

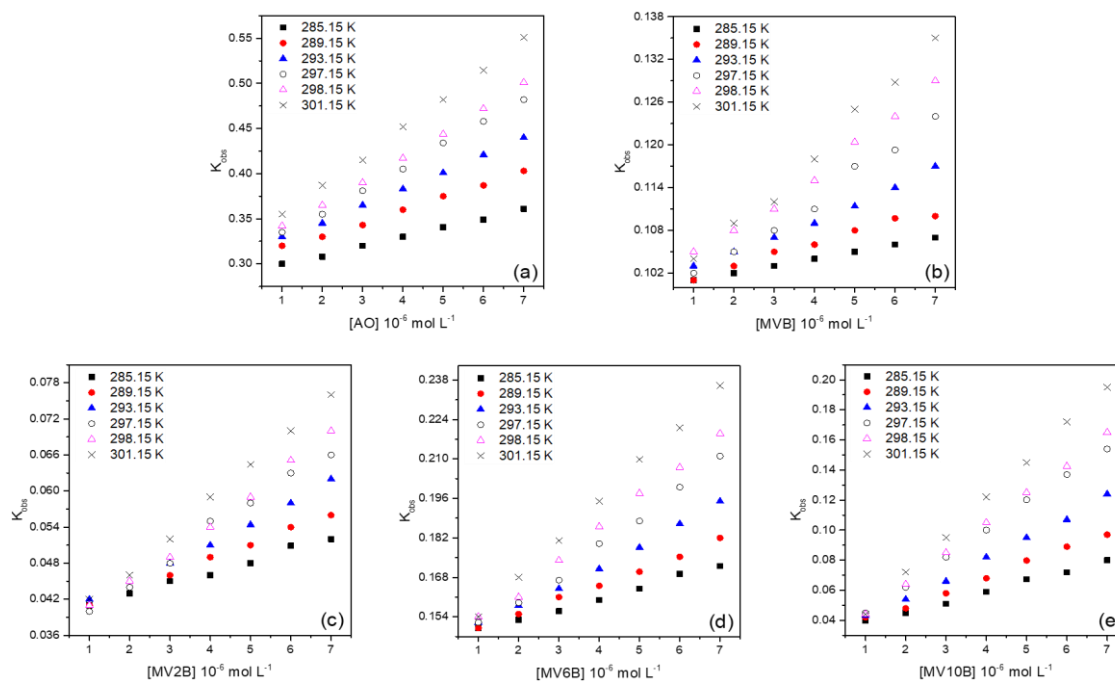


Figura S11. Gráfico de k_{obs} em função da concentração do corante, usado para determinar k_a em temperaturas: (■) 285.15 K, (■) 289.15 K, (▲) 293.15 K, (○) 297.15 K, (△) 298.15 K e (X) 301.15 K. (a) BLF-AO, (b) BLF-MVB, (c) BLF-MV2B, (d) BLF-MV6B, and (e) BLF-MV10B.

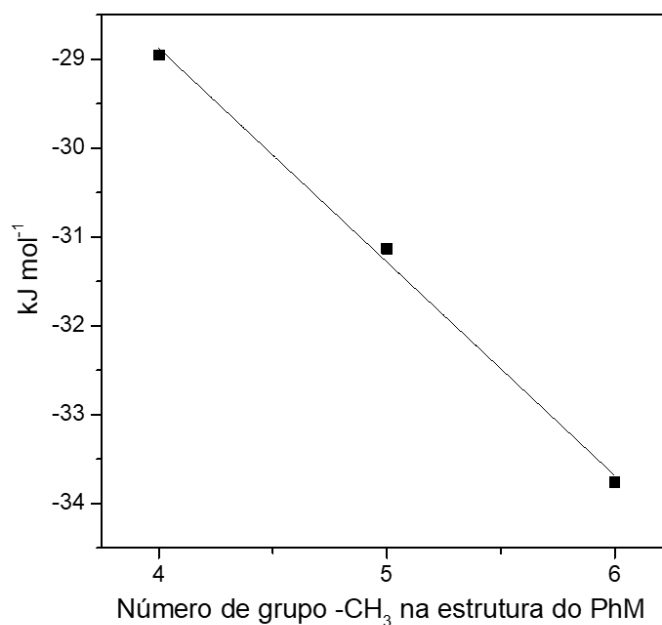


Figura S12. Gráfico de ΔG° em função do número de grupos -CH₃ na estrutura do PhM.