

08 a 11 de Outubro de 2018
Instituto Federal Fluminense
Búzios - RJ

ENSAIOS DE INTERAÇÕES MOLECULARES ENTRE A ALBUMINA BOVINA SÉRICA COM OS AGROTÓXICOS GLIFOSATO E METOMIL PARA ESTUDOS DE TOXICOCINÉTICA USANDO COPASI (*COMPLEX PATHWAY SIMULATOR*)

Elizama Tavares¹ - elizamacandeias@gmail.com
Susane Vieira¹ - su_valeu@yahoo.com.br>
Mônica Santana Vianna^{1,2} - monicaviann@gmail.com
João Paulo Machado Torres¹ - jptorres@biof.ufrj.br
Antônio J. da Silva Neto¹ - ajsneto@iprj.uerj.br

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

² Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Politécnico – Nova Friburgo, RJ, Brazil

Resumo. *Em Toxicologia é necessário determinar a concentração das substâncias tóxicas no plasma e em outros compartimentos do organismo. Entretanto, estudos tem mostrado que a fração ligada à proteínas como a albumina sérica pode ter um efeito protetivo por diminuir os efeitos de toxicidade do composto além de determinar os demais processos toxicocinéticos. Este trabalho propõe determinar a formação de complexos entre a albumina bovina sérica (BSA), glifosato e metomil (princípios ativos de agrotóxicos) baseados em modelos moleculares de ligantes. Tais ligações entre princípios ativos de agrotóxicos e a albumina bovina sérica serão caracterizadas por ensaios de afinidade química medidos através da fluorescência intrínseca desta proteína. Estes conjuntos de parâmetros bioquímicos, obtidos experimentalmente, terão sua inserção futura no programa COPASI para modelagem e simulação da toxicocinética desses agrotóxicos no organismo humano. Os resultados experimentais de ligação entre a BSA e os ingredientes de agrotóxicos evidenciam valores de constantes de associação que ressaltam a importância dos estudos toxicológicos de agrotóxicos no âmbito das ligações com proteínas. A complexidade dos modelos de proteínas e ligantes torna imprescindível a aplicação de simuladores nos estudos toxicológicos para tornar mais eficiente os resultados obtidos pelos ensaios in vitro.*

Keywords: *Toxicocinética, COPASI, Albumina, Glifosato, Metomil.*

1. INTRODUÇÃO

A toxicocinética estuda quantitativamente a cronologia dos processos metabólicos da absorção, distribuição, biotransformação e eliminação de substâncias tóxicas e os processos envolvidos em sua disponibilidade química nos diferentes tecidos do organismo. A concentração sérica das substâncias está em equilíbrio dinâmico com as moléculas receptoras de tais compostos químicos. Portanto, seu nível sérico é um adequado indicador para prever seus efeitos tóxicos.

Existe uma estreita correlação entre o nível sanguíneo das substâncias e a intensidade de seus efeitos. Os parâmetros toxicológicos que representam a absorção, distribuição e eliminação são obtidos do perfil de concentração plasmática do agente tóxico. O efeito de um agente tóxico geralmente aparece quando a concentração deste no sangue atinge um certo nível plasmático efetivo. A elevação deste nível pode causar sérios problemas ao aproximar-se do nível plasmático tóxico.

Tais compostos são transportados para os seus sítios de ação, biotransformação e excreção normalmente ligados à proteínas plasmáticas. Ao mesmo tempo, a forma livre e ligada à proteínas plasmáticas pode ter influência sobre a sua ação tóxica. Estas geralmente se ligam a sítios específicos do plasma e dos tecidos e a afinidade de uma substância pelo seu local de ligação é medida pela constante de associação (K_a) entre esta e a proteína (seu receptor).

A ligação pode ser considerada como uma associação simples das moléculas do composto a uma população finita de locais de ligação: Neste contexto, a albumina possui importância fundamental na toxicocinética de várias substâncias tóxicas (Olson, 2013). Esta proteína possui sítios de ligação com constantes de associação (K_a) que refletem suas diferentes afinidades químicas por moléculas ligantes. A competição de substâncias por estes sítios na molécula de albumina pode influenciar a concentração de sua forma livre (não-ligada) e, conseqüentemente seus processos toxicocinéticos. As moléculas de inúmeros agentes tóxicos se apresentam ligadas à proteínas plasmáticas e podem, assim, estar envolvidas em interações por deslocamento de Ligação à Proteínas Plasmáticas (LPP) (Olson, 2013).

As albuminas do soro humano e bovino foram intensamente estudadas de forma específica ou como modelos de interações moleculares aplicados à outras proteínas. A albumina sérica é o principal constituinte proteico do plasma sanguíneo. Ela contém aproximadamente 100 grupos carboxílicos ionizáveis, e aproximadamente o mesmo número de grupos que são carregados positivamente no seu ponto isoelétrico. A complexidade da relação entre proteínas, substâncias complexadas e seu potencial de toxicidade aumenta considerando as características intrínsecas às proteínas que alteram suas afinidades químicas em sítios não-ligados por mudanças em sua estrutura espacial induzidas por ligações em outros sítios. Neste sentido é imprescindível o estudo articulado entre ensaios experimentais com substâncias tóxicas de exposição ocupacional e/ou contínua e modelos matemáticos para a descrição e previsibilidade de seus efeitos tóxicos.

1.1. Obtenção de Valores Experimentais dos Parâmetros de Interações Moleculares por Espectroscopia de Fluorescência

A fluorescência intrínseca das proteínas está relacionada à presença de grupos aromáticos em três aminoácidos: triptofano (Trip), tirosina (Tir) e fenilalanina (Fen). O grupo indol do resíduo de trip é a fonte dominante de absorvância no ultravioleta e de emissão de

fluorescência na estrutura das moléculas protéicas. Apesar de relativamente poucos, os resíduos de Trip, com sua grande superfície hidrofóbica, tem um papel fundamental na estrutura terciária e quaternária e nos sítios de ligação de muitas proteínas (Perraut et al.1998). A aplicação mais freqüente que envolve a medição das variações de fluorescência (baseadas na diferença do sinal fluorescente para os diferentes estados da proteína) estão relacionadas com estudos de transições conformacionais, incluindo as causadas por ligações com diferentes ligantes e processos de interação proteína-proteína (Harel et al.1995; Katz. et al 1995). Esse tipo de aplicação gera informações cinéticas e termodinâmicas fundamentais para a descrição dos fenômenos moleculares.

A diminuição de fluorescência também pode ocorrer pela formação de complexos estáveis não-fluorescentes entre o fluoróforo e a molécula supressora. Este mecanismo, denominado supressão estática, ocorre no estado fundamental e não depende da difusão e/ou colisões moleculares. Neste caso, a relação entre a intensidade de fluorescência e a concentração do supressor é facilmente determinada pelo cálculo da constante de associação para a formação do complexo. No caso de ensaios de complexação por supressão de fluorescência, esta constante é chamada de constante de Stern-Volmer (K_{SV}).

Em Toxicologica é necessário determinar a concentração das substancias tóxicas no plasma e em outros compartimentos do organismos. Com relação às concentrações sanguíneas, a quantificação no plasma não considera a fração da substância ligada à proteínas como a albumina, considera-se apenas a fração livre (não ligada). Entretanto, estudos tem mostrado que a fração ligada à proteínas como a albumina sérica pode ter um efeito protetivo diminuindo os efeitos de toxicidade do composto além de determinar os demais processos toxicocinéticos. Este trabalho propõe estudos para determinar a formação de complexos entre a albumina bovina sérica (BSA), os compostos glifosato e metomil (princípios ativos de agrotóxicos) baseados em modelos de ligantes. Tais ligações entre princípios ativos de agrotóxicos e a albumina bovina sérica (BSA) serão baseadas em ensaios de afinidade química medidos pela variação da fluorescência intrínseca desta proteína. Este conjuntos de parâmetros bioquímicos obtidos experimentalmente, terão sua inserção futura no programa COPASI (*CComplex Pathway Simulator* - www.copasi.org) para modelagem e simulação da toxicocinética desses agrotóxicos no organismo humano.

2. METODOLOGIA

2.1. Experimentos de Complexação BSA-agrotóxicos

Os ensaios de complexação da albumina com os dois compostos foram realizados em condições de pH de 7,0 (tampão fosfato de sódio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e $3,15 \times 10 \text{ mg mL}^{-1}$ de albumina (Sigma-Aldrich, fração V). A concentração de glifosato foi $4,73 \text{ mol } 10^{-8} \text{ L}^{-1}$ até $2,82 \text{ } 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e de metomil na faixa de $2,22 \times 10^{-7}$ à $1,55 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Nos ensaios, as medidas de fluorescência da molécula de albumina foram feitas após adições de alíquotas da solução aquosa do princípios ativo. O valor da intensidade de emissão de fluorescência foi medido em 280 nm (excitação) e 340 nm (emissão). Essas medidas foram realizadas em fluorímetro Jasco modelo FP-8000.

2.2. Equação Geral para Ligação por uma Molécula ou Íon com η Sítios Disponíveis

Em geral, se uma molécula contém η sítios reativos em que se ligarão a um determinado ligante A, a ligação de A pode ser caracterizada por η constantes de associação. Em Edsall & Wyman (1958) demonstra-se que se a molécula de proteína P possuir η sítios de ligação para A, onde as constantes de associação são:

$$\kappa_1 = \frac{(PA)}{(P)(A)}; \kappa_2 = \frac{(PA_2)}{(PA)(A)} \dots; \kappa_i = \frac{(PA_i)}{(PA_{i-1})(A)} \dots; \kappa_n = \frac{(PA_n)}{(PA_{n-1})(A)}$$

Aqui (PA) denota a soma das concentrações de todas as n espécies diferentes em que uma molécula A está ligada a proteína P em qualquer um dos n sítios e (PA_i) indica a soma correspondente para todos os $n! / i! (n - i)!$ espécies em que i dos n sítios são ocupados por A. Assim κ_1, κ_2 , etc., correspondem, no caso especial dos equilíbrios ácido-base, aos inversos das constantes de dissociação macroscópica, K_1, K_2 , etc., se definirmos $\kappa_1 = 1 / K_n, \kappa_2 = 1 / k_{n-1}, \dots, \kappa_n = 1 / k_1$.

Também se define as constantes $L_0^* = 1, L_1^* = \kappa_1, L_2^* = \kappa_1 \kappa_2, \dots, L_n^* = \kappa_1 \kappa_2 \dots \kappa_n$. Neste caso há uma relação recíproca com as constantes $L_1, L_2, \dots, L_n, L_1^* = 1 / L_n, L_2^* = 1 / L_{n-1}, \dots, L_n^* = 1 / L_1$. Então a expressão geral para \bar{v} é:

$$\begin{aligned} \bar{v} &= \frac{(PA) + 2(PA_2) + \dots + (n-1)(PA_{n-1}) + n(PA_n)}{(P) + (PA) + (PA_2) + \dots + (PA_{n-1}) + (PA_n)} \\ &= \frac{\kappa_1(A) + 2\kappa_1\kappa_2(A)^2 + \dots + n\kappa_1\kappa_2 \dots \kappa_n(A)^n}{1 + \kappa_1(A) + \kappa_1\kappa_2(A)^2 + \dots + \kappa_1\kappa_2 \dots \kappa_n(A)^n} \end{aligned} \quad (1)$$

$$\frac{\sum_{i=0}^n i L^*(A)^i}{\sum_{i=0}^n L^*(A)^i} = \frac{\partial \ln \sum_{i=0}^n L_i^*(A)^i}{\partial \ln(A)}$$

Se todos os sítios são equivalentes e independentes, de modo que a reação em cada local pode ser caracterizada por uma única constante microscópica intrínseca, κ , o que é o mesmo para todos tem-se:

$$\kappa_1 = n\kappa; \kappa_2 = \frac{(n-1)\kappa}{3}; \dots; \kappa_n = \frac{\kappa}{n} \quad (2)$$

Os fatores $n, \frac{(n-1)}{2}, \frac{n-2}{3}$, etc., em (2) são fatores estatísticos. Por exemplo, κ_1 é n vezes maior como κ no caso limite dado acima, porque P contém n aceptores de sítios para A, enquanto que qualquer uma das espécies microscópicas da classe PA contém apenas um sítio doador do qual A pode ser liberado. Similarmente PA contém $n - 1$ sítios receptores para A, mas PA_2 contém dois sítios doadores dos quais A pode ser liberado; a razão desses dois fatores é $(n - 1) / 2$. Esses fatores estatísticos estão sempre presentes em qualquer equilíbrio deste tipo, sejam ou não os grupos equivalentes e independentes. Por isso, muitas vezes é mais adequado expressar as constantes de ligação para que sejam corrigidas por esses fatores estatísticos. Nós devemos denotar as constantes resultantes pelos símbolos $\kappa_1, \kappa_2, \dots, \kappa_n$.

$$\kappa_1 = \frac{k_1}{n}; \kappa_2 = \frac{2k_2}{n-1}; \dots; \kappa_{n-1} = \frac{(n-1)\kappa_{n-1}}{2}; \kappa_n = nk_n \quad (3)$$

Para grupos equivalentes e independentes, deveríamos ter diferenças observadas entre os sucessivos valores κ , indicando diferenças intrínsecas entre as afinidades dos grupos. Neste caso tem-se a relação entre as constantes de associação, k_1, k_2, \dots, k_n , ou $L_1^*, L_2^*, \dots, L_n^*$ e um conjunto de "constantes de titulação," g_1, g_2, \dots, g_n , para a associação de P com n moléculas de A:

$$\sum_{i=0}^n L_i^* (A)^i = [1 + g_1(A)] [1 + g_2(A)] \dots [1 + g_n(A)] \quad (4)$$

Igualando os coeficientes de potências correspondentes de (A) em ambos os lados da equação, as relações entre os sucessivos valores L^* (ou k) e os correspondentes valores de g são dados. As constantes de titulação g_1, g_2, \dots, g_n são números reais positivos, porém somente se eles formam uma série progressiva em ordem decrescente de magnitude, ou - no caso limitante de grupos equivalentes e independentes - são todos iguais ($g_1 \geq g_2 \geq \dots \geq g_n$). Isso é sempre verdade para uma titulação ácido-base, exceto por raros casos em que a ligação (ou liberação) de um próton leva a um rearranjo molecular resultando na formação de um novo grupo ácido de maior força que o que existia na molécula original, P, no início da titulação.

Existem sistemas, no entanto, que mostram interações positivas entre as sucessivas constantes de ligação. Para estas, as curvas de ligação observadas para \bar{v} como uma função de (A) não podem ser reproduzidas por nenhum conjunto de valores positivos reais para g_1, g_2 , etc. Para provar esta proposição em geral, podemos ilustrá-la para o simples caso de uma molécula, P, contendo dois sítios de ligação. Para $n = 2$, a equação (27) se torna:

$$\sum_{i=0}^2 L_i^* (A)^i = 1 + \kappa_1(A) + \kappa_1\kappa_2(A)^2 = 1 + (g_1 + g_2)(A) + g_1g_2(A)^2 \quad (5)$$

Portanto, $\kappa_1 = g_1 + g_2$ e $\kappa_1\kappa_2 = g_1g_2$. No caso limitante em que os grupos são equivalentes e independentes, $g_1 = g_2$ e $\kappa_2 = \kappa_1/4$. Em outros casos, podemos escrever $\kappa_1 = \beta\kappa_2/4$, onde o fator β leva em conta as diferenças inerentes entre os grupos e a interação entre eles. Portanto $\kappa_1\kappa_2 = \frac{\beta\kappa_1^2}{4} = g_1g_2$, e $g^2 = \frac{\beta\kappa_1^2}{4g_1}$. Logo, pode-se expressar g_1 como uma função de κ_1 e β :

$$\kappa_1 = g_1 + g_2 = g_1 + \frac{\beta\kappa_1^2}{4g_1} \quad (6.a)$$

ou

$$g_1^2 - \kappa_1g_1 + \frac{\beta\kappa_1^2}{4} = 0 \quad (6.b)$$

Uma expressão de forma idêntica é obtida como a solução para g_2 . Este quando resolvido para g_1 ou g_2):

$$g_1 \text{ ou } g_2 = \frac{\kappa_1(1 \pm \sqrt{1 - \beta})}{2} \quad (7)$$

Desde que $g_1 \geq g_2$, o sinal de soma em (30) corresponde a g_1 , o sinal de subtração à g_2 .

Obviamente, o valor de g_1 só pode ser real se $\beta \leq 1$. Para dois grupos equivalentes com interações positivas, no entanto, β deve ser maior que a unidade, e g seria imaginário. Se os dois grupos forem diferentes em suas constantes de ligação, β pode ser menos de uma unidade, mesmo que haja interações positivas entre os grupos. O significado físico dessas

relações matemáticas deve ser claramente entendido. As constantes de titulação g_1, g_2, \dots, g_n são as constantes de associação que seriam obtidas por um sistema em que a molécula P, com suas n combinações de grupos, é substituído por n moléculas hipotéticas, cada uma com um grupo de combinação. Cada um desses grupos recebe uma constante de associação g_1, g_2, \dots , de tal forma que a ligação de A devido a todas essas moléculas, juntas na solução, se ajustam na curva observada para a ligação de A a P. Dois ou mais grupos equivalentes com interações negativas dão uma curva de ligação, para \bar{v} em função do $\log(A)$, corresponde a uma curva para dois grupos independentes com diferentes valores de g . A curva de ligação que se eleva mais abruptamente no ponto médio, à medida que o $\log(A)$ aumenta, para grupos independentes, é obtido quando os dois grupos são equivalentes. Uma curva que sobe mais acentuadamente do que esta só pode ser obtida se os grupos ligantes interagirem positivamente - isto é, se a ligação de uma molécula A promover a ligação de outra. Se os grupos são em moléculas separadas, isso não ocorre a menos que as moléculas interajam por forças de longo alcance.

2.2. Efeitos da competição entre diferentes ligantes para o mesmo sítio de ligação

Freqüentemente duas ou mais substâncias estão presentes na solução e ambas podem se ligar aos mesmos sítios de ligação em uma macromolécula, P. O caso mais simples ocorre quando todos os sítios são equivalentes e independente. Se chamarmos as duas espécies reagentes A e B, e as constantes de associação correspondentes κ_A e κ_B , então a ligação de A na presença de B é dada pela equação

$$\bar{v}_A = \frac{n\kappa_A(A)}{1 + \kappa_A(A) + \kappa_B(B)} \quad (8)$$

Esta pode ser escrita como:

$$\bar{v}_A = \frac{n\kappa_A(A)}{1 + \kappa'_A(A)} \quad (8.1)$$

onde κ'_A é dado por:

$$\kappa'_A = \frac{\kappa_A}{1 + \kappa_B(B)} \quad (8.2)$$

Se κ_A é conhecido e κ'_A determinado para um valor conhecido de (B), κ_B pode ser determinado a partir de uma equação obtida pelo rearranjo (8.2):

$$\kappa_B = \frac{1}{(B)} \left(\frac{\kappa_A}{\kappa'_A} - 1 \right) \dots \dots \dots (8.3)$$

Se κ'_A é determinado para valores diferentes de (B), e um valor de constante de κ_B é então derivado de (8.3), isto dá uma forte indicação da validade da suposição de que A e B estão ambos reagindo reversivelmente com o mesmo conjunto de sítios em P.

É importante considerar que em sistemas contendo tampões, seus constituintes podem agir como concorrentes para o ligante em estudo. Isso é particularmente verdadeiro no estudo das ligações com a albumina sérica. As constantes de afinidade aparente de tal proteína para um dado ligante, quando determinado na presença de um tampão, é muito provável que seja menor do que eles seriam na ausência de tampão. O efeito de variar a concentração de tampão, a pH constante, deve ser sempre estudada nesses casos para conhecer as constantes de afinidade exatas.

2.4 Computacional

Os modelos de formação dos complexos e as simulações toxicocinéticas, baseados nos dados experimentais apresentados neste trabalho serão gerados pelo programa COPASI (*COmplex PAthway Simulator*) e hospedados na plataforma BioModels-EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/>). O programa COPASI foi criado para aplicação de modelos e simulações de eventos bioquímicos diversos tendo sua aplicação notória em Farmacologia e ampliada em estudos biotecnológicos (Bergmann et al.2017). A simulação pode ser realizada com entrada de um número ilimitado de espécies químicas, reações e compartimentos bioquímicos com medidas experimentais de ensaios estacionários e de perfil cinético. A plataforma BioModels Database (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/>) é um repositório de modelos matemáticos de sistemas biológicos. Ele hospeda uma vasta seleção de modelos mecanicistas relevantes para estudos biológicos, médicos e farmacológicos baseados em literatura existentes em formato padrão. O objetivo é fornecer à comunidade de modelagem de sistemas modelos reprodutíveis, de alta qualidade e de livre acesso publicados na literatura científica.

3. RESULTADOS

O uso do programa COPASI considera que um agente tóxico liga-se a um receptor com uma estequiometria determinada experimentalmente para formar um complexo proteína-ligante. Inicialmente é necessário determinar as espécies químicas do modelo considerado: os agentes tóxicos, a proteína de estudo - albumina - e o complexo com suas respectivas concentrações. Na sequência, especifica-se o conjunto de reações e suas constantes indicando sua reversibilidade ou não. A partir deste ponto pode-se solicitar a simulação das concentrações transitórias das espécies químicas ao longo de um tempo determinado. Assim, pode-se estudar situações de alcance do estado estacionário, reversibilidade ou não das reações e as alterações reacionais possíveis e alterações pela mudança das concentrações de receptores e ligantes. Avançando na aplicação do programa, pode-se adotar um fluxo constante de entrada de agentes tóxicos e uma taxa determinada de depuração que pode ser constante ou não. Em se tratando de estudos de ligantes com proteínas (fármacos e/ou agentes tóxicos), codifica-se modelos bioquímicos de interações moleculares sítio-ligantes considerando sítios únicos por molécula protéica, múltiplos sítios independentes ou dependentes (influência de efeitos estéricos, eletrostáticos e/ou conformacionais) e a presença de substâncias competitivas. Estas possibilidades de simulação são fundamentais nos estudos da cinética de tais ligações, pela mudança das condições de concentração de ligantes e receptores (proteínas), e o monitoramento das mudanças reacionais em sistemas de ligantes competitivos e/ ou alostéricos.

Para a aquisição de parâmetros experimentais foram realizados ensaios de complexação BSA-agrotóxico em condições de pH biológico e constante. Estes ensaios permitem as determinações estequiométricas dos complexos formados (BSA-Agrotóxicos) e suas respectivas constantes de associação. No caso de ensaios adotados neste trabalho (baseados no princípio da supressão de fluorescência) a constante de associação é expressa pela constante de Stern-Volmer (K_{SV}). A literatura apresenta alguns métodos clássicos que utilizam dados de fluorescência para determinar o número de equivalentes de sítios de ligação por proteína. Um dos tratamentos mais utilizados baseia-se em um gráfico que permite

calcular, a partir da inclinação, o número de moléculas do complexante (supressor) que interage simultaneamente com cada sítio de ligação da proteína (fluoróforo). Esta inclinação do gráfico indica a estequiometria do complexo proteína-supressor (Xu et al.2009; Liu, et al.2010 : Wang, et al.2009).

Por esta abordagem, a relação entre a intensidade de extinção de fluorescência da proteína e da concentração do supressor (ligante) pode ser descrita como indicado na Equação 9:

$$\text{Log}_{10}\{(F_0 - F)/F\} = \text{Log}_{10}K_a + n\text{Log}_{10}[Q] \quad (9)$$

onde K_a é a constante de ligação ou a constante de associação da interação e, n é o número de moléculas do supressor que interage simultaneamente com cada sítio ligante.

As titulações realizadas com a albumina e metomil em tampão fosfato de sódio ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7,0$) são mostradas na figura 1 cujo valor de K_{sv} foi de $1,18 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$.

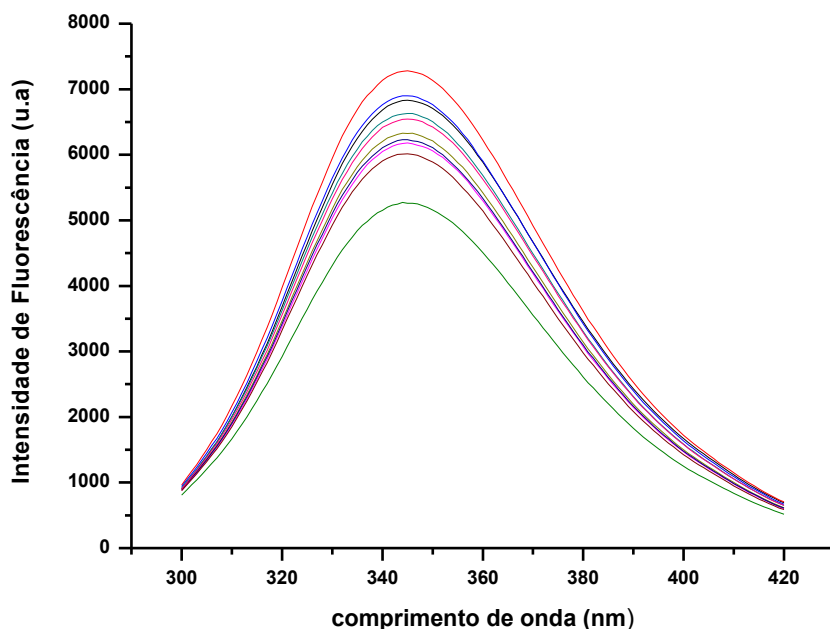


Figura 1 – Espectro de fluorescência da solução de albumina bovina ($3,15 \times 10 \text{ mg mL}^{-1}$) durante titulação com metomil ($2,22 \times 10^{-7}$ à $1,55 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).

A curva de Stern-Volmer mostra um valor de K_{SV} para o princípio ativo de agrotóxico glifosato igual a $5,07 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}$. O aspecto linear da curva indica a presença de apenas um tipo de mecanismo de supressão de fluorescência.

As titulações realizadas com a albumina e glifosato em tampão fosfato de sódio $\text{pH} = 7.0$ são mostradas na figura 2.

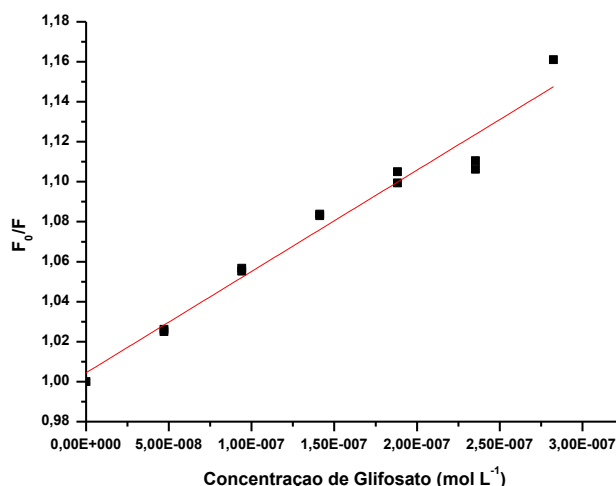


Figura 2 – Gráfico de Stern-Volmer da supressão de Fluorescência da Albumina por glifosato ($4,73 \text{ mol } 10^{-8} \text{ L}^{-1}$ até $2,82 \text{ mol } 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em pH = 7.0.

Na Figura 3 é mostrado o gráfico de duplo log para a titulação da fração protéica com metomil. Através da regressão identifica se que os complexos BSA-metomil tem estequiometria do tipo 1:1. Para este composto não foi encontrado na literatura estudos de formação de complexos com a albumina bovina sérica ou mesmo com a albumina humana.

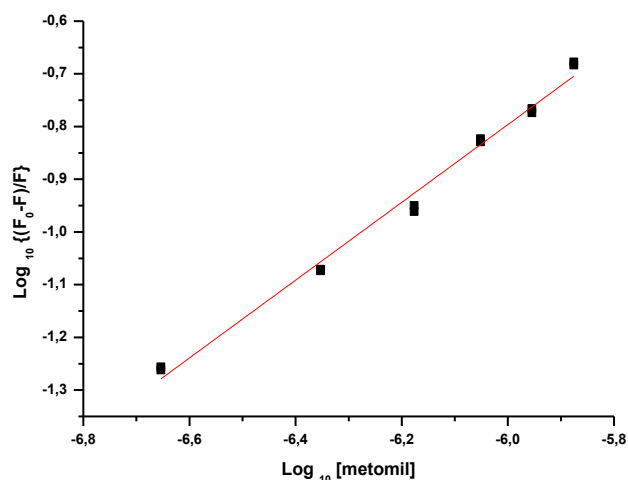


Figura 3- Gráfico log-log da supressão da fluorescência da BSA em titulação com metomil ($36 \mu\text{g L}^{-1}$ x à $57,6 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$).

A razão estequimétrica dos complexos BSA-glifosato obtidas nos ensaios foi de 1:1, calculado através do gráfico log-log e semelhante aos resultados obtidos em ensaios por fluorescência (Y. Yue et al. 2008).

4. CONCLUSÃO

Os resultados experimentais de ligação entre a BSA e os ingredientes de agrotóxicos evidenciam valores de constantes de associação que ressaltam a importância dos estudos toxicológicos de agrotóxicos no âmbito das ligações com proteínas. A complexidade dos

modelos de proteínas e ligantes torna imprescindível a aplicação de simuladores nos estudos toxicológicos para tornar mais eficiente os resultados obtidos pelos ensaios *in vitro*.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPERJ-Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, do CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e da CAPES – Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

REFERÊNCIAS

- Bergmann F. et al. (2017). Review COPASI and its applications in biotechnology. *Journal of Biotechnology* 261 215–220.
- BioModels Database- Disponível em <https://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/>. Acesso em 15 de agosto de 2018.
- Complex Pathway Simulator – Disponível em www.copasi.org. Acesso em 15 de agosto de 2018.
- Harel, M. et al. 1995. Crystal structure of an acetylcholinesterase-fasciculin complex: Interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target. *Structure*, v. 3, n. 12, p. 1355-1366,
- Liu, X. et al. 2010. Effect of Hydrogenation on Ring C of Flavonols on Their Affinity for Bovine Serum Albumin. *Journal of Solution Chemistry*, v. 39, n. 4, p. 533-542,
- Perraut C. et al. 1998. Role of quaternary structure in muscle creatine kinase stability: Tryptophan 210 is important for dimer cohesion. *Proteins-Structure Function and Genetics*, v. 32, n. 1, p. 43-51,
- Olson R. 2013 *Manual de Toxicologia Clínica* - 6ª Ed.
- Xu, H. et al. 2009. Spectroscopic Studies on the Interaction of Vitamin C with Bovine Serum Albumin. *Journal of Solution Chemistry*, v. 38, n. 1, p. 15-25,
- Yue Y. et al. (2008) In vitro study on the binding of herbicide glyphosate to human serum albumin by optical spectroscopy and molecular modeling. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 90 26–32
- Wang, M. et al. 2009. Study on the Binding Behavior of Lysozyme with Cephalosporin Analogues by Fluorescence Spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, v. 19, n. 5, p. 801-808,
- Edsall J. e Wyman J. *Biophysical Chemistry: Thermodynamics, electrostatics, and the biological significance of the properties of matter* (1958) Volume 1 – pp 699 Academic Press Inc Publishers – New York

TESTS OF MOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN SERUM BOVINE ALBUMIN WITH PESTICIDES GLYPHOSATE AND METHOMYL FOR STUDIES OF TOXICOCYNETICS USING COPASI (COMPLEX PATHWAY SIMULATOR)

Abstract. *In Toxicology it is necessary to determine the concentration of the toxic substances in the plasma and in other compartments of the organism. However, studies have shown that protein-bound fraction such as serum albumin can have a protective effect by decreasing the toxicity effects of the compound and to determining the toxicokinetic processes. This work proposes to determine the formation of complexes between bovine serum albumin (BSA), glyphosate and methomyl (active principles of pesticide) based on molecular models of ligands. Such linkages between pesticides and serum bovine albumin will be characterized by chemical affinity assays measured by the intrinsic fluorescence of this protein. These sets of biochemical parameters, obtained experimentally, will have their future insertion in the COPASI program for modeling and simulation of the toxicokinetics of these pesticides in the human organism. The experimental results of the link between BSA and pesticides show values of association constants that highlight the importance of toxicological studies of pesticides in the field of protein binding. The complexity of protein and ligand models makes it imperative to apply simulators for more efficient toxicological results.*

Keywords: *Toxicokinetic, COPASI, Albumin, Glyphosate, Methomyl.*