

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Materiais

Luiza de Carvalho Bertozo

**Desenvolvimento de Sondas Fluorescentes para Determinação de Sítios de
Ligação em Albumina: Estudo da Relação entre Estrutura Molecular,
Constante de Associação e Especificidade**

Bauru – SP

2021

Luiza de Carvalho Bertozo

Desenvolvimento de Sondas Fluorescentes para Determinação de Sítios de Ligação em Albumina: Estudo da Relação entre Estrutura Molecular, Constante de Associação e Especificidade

Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Doutor à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração Química dos Materiais, sob a orientação do Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Bauru – SP

2021

Bertoza, Luiza de Carvalho.

Desenvolvimento de Sondas Fluorescentes para a Determinação de Sítio de Ligação em Albumina: Estudo da Relação entre Estrutura Molecular, Constante de Associação e Especificidade / Luiza de Carvalho
Bertoza, 2021

151 f.:il

Orientador: Valdecir Farias Ximenes

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2021

1. Aminoácidos dansilados. 2. Fluorescência molecular. 3. Albumina. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Bauru



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE LUIZA DE CARVALHO BERTOZO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 08 dias do mês de junho do ano de 2021, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de LUIZA DE CARVALHO BERTOZO, intitulada **Desenvolvimento de Sondas Fluorescentes para Determinação de Sítios de Ligação em Albumina: Estudo da Relação entre Estrutura Molecular, Constante de Associação e Especificidade**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru (participação por videoconferência), Prof. Dr. PIETRO CIANCAGLINI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, Profa. Dra. VIVIANE MUNIZ DA SILVA FRAGOSO (Participação Virtual) do(a) Laboratório de inovações em terapias, educação e bioprodutos / Instituto Oswaldo Cruz, Prof. Dr. LEANDRO CRISTANTE DE OLIVEIRA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / UNESP/Câmpus de São José do Rio Preto, Prof. Dr. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química, Faculdade de Ciências / UNESP - Câmpus de Bauru. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES

Agradecimentos

Eu gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a finalização deste trabalho, em especial, ao professor Valdecir por todos esses anos de parceria e amizade. Agradeço a sua disponibilidade em me permitir evoluir durante esses anos no laboratório de Bioquímica, por meio de discussões, realizações de outros projetos, acompanhamento de outros alunos, ministrando as aulas de bioquímica. Me considero uma pessoa de muita sorte em ter tido a oportunidade de tê-lo como orientador durante esses anos. Muito obrigada!

Agradeço também aos meus colegas de laboratório que estiveram no dia a dia ao meu lado, partilhando as inseguranças e, também, as realizações obtidas durante todo o período da pós-graduação. Ao professor Aguinaldo pelas ricas discussões durante as reuniões de grupo.

Agradeço ao professor Pietro e a Maytê por terem me recebido com todo o carinho durante as análises de ITC, por terem confiado no meu trabalho possibilitando que eu utilizasse o equipamento e desenvolvesse os resultados que estão apresentados neste trabalho.

Agradeço a Dani, acredito que mesmo distante fisicamente sempre estivemos muito próximas, compartilhando as dúvidas, incertezas e vitórias pessoais e profissionais.

Agradeço ao Vinícius por ter estado sempre ao meu lado, me apoiando, me aconselhando e participando de toda a minha evolução profissional e pessoal durante esses anos do doutorado.

Agradeço aos meus pais, que mesmo sem compreender muito a minha linha de pesquisa, sempre me apoiaram e me incentivaram a buscar as minhas conquistas.

Agradeço a Deus pela oportunidade de viver toda essa experiência.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (processo nº 2016/22014-1) pela contribuição financeira ao trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho: Muito obrigada!

BERTOZO, L. C. **Desenvolvimento de Sondas Fluorescentes para Determinação de Sítios de Ligação em Albumina: Estudo da Relação entre Estrutura Molecular, Constante de Associação e Especificidade.** 2021. 151 f. Tese (Doutor em Ciência e Tecnologia de Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2021.

Resumo

A albumina sérica humana, HSA, é a principal proteína do plasma sanguíneo e responsável pelo transporte de compostos endógenos e exógenos. As propriedades farmacocinéticas de um fármaco podem ser alteradas devido a sua interação com a albumina. Por isso, quando um novo fármaco está em desenvolvimento, a sua interação com a albumina é extensivamente estudada, sendo, por exemplo, determinado sua constante de associação e sítios de ligação na albumina, sítio I ou sítio II. A determinação do local preferencial de ligação de um novo composto pode ser realizada por estudos de competição envolvendo sondas fluorescentes. Neste contexto, se destaca os aminoácidos dansilados, que são sondas fluorescentes que possuem especificidade pelo sítio I ou pelo sítio II da HSA. O levantamento crítico da literatura mostra que os aminoácidos dansilados de sítio I são menos aplicados como sondas do que os de sítio II, isso porque, eles parecem apresentar menor especificidade. Neste trabalho estudamos a interação entre oito aminoácidos dansilados e a HSA buscando compreender a diferença de especificidade encontrada nos dois sítios de ligação da proteína. Além disso, utilizamos sondas de diferentes hidrofobicidade para verificar a influência desta propriedade na interação de compostos com a albumina. Os resultados de rendimento quântico, tempo de vida, anisotropia de fluorescência e dicróismo circular mostraram a maior afinidade entre os aminoácidos dansilados de sítio II e a HSA. Os aminoácidos dansilados de sítio II também apresentaram maiores valores de constante de associação. Os estudos de calorimetria de titulação isotérmica, ITC, confirmaram a menor afinidade dos dansilados de sítio I com a HSA. A aplicação da dansil-glutamina (DGlu) como sonda do sítio I da HSA evidenciou que a carga positiva encontrada nas estruturas dos demais dansilados de sítio I parece prejudicar suas ligações com a proteína. Os estudos envolvendo ligantes com diferentes hidrofobicidade mostraram que o ligante mais hidrofóbico apresenta maior afinidade com a albumina. Neste caso, a interação é entropicamente dirigida e por isso o critério envolvendo a temperatura na distinção do tipo de quenching não foi o mais adequado. Os estudos de *docking* e dinâmica molecular confirmaram os achados experimentais. Em conclusão, a menor afinidade dos aminoácidos dansilado de sítio I em HSA está relacionada a maior energia que esses compostos devem ter para acessar esta cavidade da proteína. Isso ocorre devido a uma repulsão eletrostática entre aminoácidos Lys195, Lys199, Arg218 e Arg222 na entrada do sítio I e a carga positiva dos aminoácidos dansilados do sítio I.

Palavras – chave: aminoácidos dansilados, fluorescência molecular, dicróismo circular induzido, calorimetria de titulação isotérmica, albumina.

Abstract

Human serum albumin, HSA, is the main protein in blood plasma and it is responsible for the transport of endogenous and exogenous compounds. The pharmacokinetic properties of a drug can be altered due to its interaction with albumin. Therefore, when a new drug is under development, its interaction with albumin is extensively studied, for example, in determining its association constant and binding sites on albumin, site I or site II. The determination of the preferred binding site for a new compound can be carried out by competition studies involving fluorescent probes. In this context, we highlight the dansyl amino acids which are fluorescent probes that have specificity for site I or site II of HSA. The critical survey of the literature shows that the dansyl amino acids of site I are less applied as probes than those of site II, because, they seem to have less specificity. In this work, we study the interaction between the eight dansyl amino acids and HSA in order to understand the difference in specificity found between the two protein binding sites. In addition, we use probes of different hydrophobicity to verify the influence of this property on the interaction of compounds with albumin. The results of quantum yield, lifetime, fluorescence anisotropy and circular dichroism showed the greatest affinity between the dansyl amino acids of site II and HSA. The dansyl amino acids from site II also showed higher values of association constant. The isothermal titration calorimetry, ITC, studies confirmed the lower affinity of the site I dansyl amino acids with HSA. The application of dansyl-glutamine (DGlu) as a probe of the site I of HSA showed that the positive charge found in the structures of the other dansyl amino acids of site I seems to impair its binding with the protein. Studies involving ligands with different hydrophobicity have shown that the more hydrophobic ligand has greater affinity with albumin. In this case, the interaction is entropically-driven and, therefore, the criterion involving temperature in distinguishing the type of quenching was not the most appropriate. Docking and molecular dynamics studies confirmed the experimental findings. In conclusion, the lower affinity of the dansyl amino acids of site I of HSA is related to the greater energy that these compounds must have to access this protein cavity. This is due to an electrostatic repulsion between amino acids Lys195, Lys199, Arg218 and Arg222 at the entrance to site I and the positive charge of dansylated amino acids at site I.

Keywords: dansyl amino acids, molecular fluorescence, induced circular dichroism, isothermal titration calorimetry, albumin

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura cristalina da albumina sérica humana (HSA) na resolução de 2,6 Å. | 3 |
| Figura 2 - Os efeitos da varfarina e do ibuprofeno na fluorescência de DNSA-HSA e/ou DLP-HSA. | 11 |
| Figura 3 - Diagrama de Jablonski simplificado. | 13 |
| Figura 4 - Esquema do equipamento de ITC. | 16 |
| Figura 5 - Estrutura dos aminoácidos dansilados que possuem preferência em se ligar ao sítio I da HSA. | 19 |
| Figura 6 - Estrutura dos aminoácidos dansilados que possuem preferência em se ligar ao sítio II da HSA. | 20 |
| Figura 7 - Espectros de fluorescência dos aminoácidos dansilados obtidos em solução tampão PBS, álcool etílico e HSA 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Sítio I versus Sítio II. | 40 |
| Figura 8 - Diagrama simplificado mostrando a relação entre a taxa de decaimento radioativa (K_r) e a taxa de decaimento não-radioativa (K_{nr}). | 42 |
| Figura 9 - Comparação do tempo de vida de fluorescência do DL e DP em álcool etílico e na presença de HSA. | 44 |
| Figura 10 - Espectros de fluorescência para a HSA, dansilados e HSA com os dansilados. ... | 47 |
| Figura 11 - Espectros de fluorescência com a adição de HSA. | 48 |
| Figura 12 - Regressão linear utilizando a Equação 13. (A) DL e (B) DP. | 49 |
| Figura 13 - Espectros de fluorescência obtidos com o aumento da concentração dos aminoácidos dansilados. | 51 |
| Figura 14 - <i>Quenching</i> ou supressão de fluorescência da HSA pelos aminoácidos dansilados. | 53 |
| Figura 15 - Gráfico de Stern-Volmer para os aminoácidos dansilados com HSA. | 55 |
| Figura 16 - Determinação de K_a a partir do <i>quenching</i> de fluorescência. (A) DL e (B) DP. | 57 |
| Figura 17 - Diagrama de Job's plot para o DP em associação com a HSA obtido a partir de medidas de fluorescência. | 58 |
| Figura 18 - Ensaio de competição utilizando o DL e o DP. | 60 |
| Figura 19 - Porcentagem de deslocamento dos aminoácidos dansilados a partir da adição de fenilbutazona (FBZ) e ibuprofeno (IBU). | 61 |
| Figura 20 - Espectro de fluorescência da HSA e da varfarina (VAR) na ausência e na presença de HSA. | 62 |

| | |
|---|----|
| Figura 21 - Estudo do deslocamento de fluorescência da varfarina-HSA utilizando DL, DP, fenilbutazona (FBZ) e ibuprofeno (IBU)..... | 63 |
| Figura 22 - Espectros de dicroísmo circular para os aminoácidos dansilados na HSA..... | 65 |
| Figura 23 - Espectros de dicroísmo circular para a avaliação da estrutura secundária. | 66 |
| Figura 24 - Espectros de dicroísmo circular para o estudo de deslocamento dos aminoácidos dansilados que se ligam preferencialmente ao sítio II da HSA utilizando naproxeno (NPX) e varfarina (VAR)..... | 67 |
| Figura 25 - Espectros de dicroísmo circular da biliverdina (BLV) com HSA na presença de DA e DP. | 68 |
| Figura 26 - Espectros de dicroísmo circular da fenilbutazona (FBZ) com HSA na presença de DA e DP. | 69 |
| Figura 27 - Análise de ITC para a interação dos aminoácidos dansilados com a HSA. (A) Injeções sequenciais de DA na HSA. (B) Injeções sequenciais de DP na HSA (C) Ajuste linear obtido no modo independente. | 73 |
| Figura 28 - Fenômeno de FRET para o DL e DG. | 75 |
| Figura 29 - Sobreposição entre o espectro de fluorescência do doador e o espectro de absorbância do aceitador. | 76 |
| Figura 30 - Representação realizada pelo software RASMOL de moléculas que preferem se ligar ao sítio I ou ao sítio II da HSA juntamente com o resíduo de triptofano da proteína. | 79 |
| Figura 31 - Estrutura molecular da dansil-glutamina (DGlu)..... | 81 |
| Figura 32 - Espectros de fluorescência para a DGlu em solução tampão PBS, álcool etílico e complexado a HSA..... | 82 |
| Figura 33 - Espectros de fluorescência da DGlu para a determinação de K_a . (A) aumento de fluorescência provocado pela adição de HSA. (B) aumento de fluorescência provocado pela adição de DGlu. (C) <i>quenching</i> de fluorescência..... | 84 |
| Figura 34 - Porcentagem de deslocamento para DL, DGlu e DP após a adição de fenilbutazona (FBZ) e ibuprofeno (IBU)..... | 87 |
| Figura 35 - Espectro de dicroísmo circular para a DGlu em associação com a HSA. | 88 |
| Figura 36 - Espectro de dicroísmo circular do complexo FBZ-HSA com a adição de DGlu. | 89 |
| Figura 37 - Sobreposição dos espectros de fluorescência e absorbância para a aplicação de FRET para a DGlu..... | 90 |
| Figura 38 - Interações entre DL e DP com a HSA a partir do <i>docking</i> molecular..... | 92 |
| Figura 39 - PMF de DArg (DA, em preto) e DPro (DP, em vermelho) nos sites I e II, respectivamente, calculados pela abordagem Umbrella Sampling. | 96 |

| | |
|--|-----|
| Figura 40 - Estruturas moleculares e o valor do coeficiente de partição (log P). (a) ácido gálico; (b) galato de octila; (c) ácido ascórbico; (d) palmitato de ascorbila..... | 98 |
| Figura 41 - <i>Quenching</i> da fluorescência intrínseca da albumina provocada pela interação com G0 e G8..... | 99 |
| Figura 42 - Espectros de UV-Vis para o G0 e G8..... | 100 |
| Figura 43 - Efeito da temperatura na interação do G8 com a albumina..... | 103 |
| Figura 44 - Fluorescência resolvida no tempo para o G8. (A) gráfico de decaimento de tempo de vida com adições de G8. (B) Comparação de Stern-Volmer obtido por fluorescência no estado estacionário e fluorescência resolvida no tempo..... | 105 |
| Figura 45 - Análise de ITC para a interação entre o G8 e a albumina. | 107 |
| Figura 46 - <i>Quenching</i> de fluorescência da albumina provocado pela adição de ácido ascórbico e palmitato de ascorbila..... | 108 |
| Figura 47 - <i>Quenching</i> de fluorescência da albumina provocado pela adição de palmitato de ascorbila em diferentes temperaturas. | 109 |
| Figura 48 - Espectros de dicroísmo circular analisando a competição entre o G8 com (a) fenilbutazona e (b) DP..... | 110 |
| Figura 49 - Estrutura de menor energia (a,b) e interações (c) do G8 do sítio I da BSA. | 112 |
| Figura 50 - Estrutura de menor energia (a) e interações (b) do G0 com o sítio I da BSA. | 112 |
| | |
| Figura A 1 - Espectros de fluorescência para os aminoácidos dansilados em solução tampão PBS, álcool etílico ou complexado a HSA..... | 129 |
| Figura A 2 - Espectros de fluorescência dos aminoácidos dansilados na ausência e na presença de HSA. | 130 |
| Figura A 3 - Determinação da constante de associação a partir da adição de HSA..... | 131 |
| Figura A 4 - Espectros de fluorescência dos aminoácidos dansilados obtidos após a adição das sondas dansiladas..... | 132 |
| Figura A 5 - Determinação da constante de associação a partir da adição dos aminoácidos dansilados. | 133 |
| Figura A 6 - Espectros de <i>quenching</i> para os aminoácidos dansilados. | 134 |
| Figura A 7 - Determinação da constante de associação pelo <i>quenching</i> de fluorescência..... | 135 |
| Figura A 8 - Espectros de fluorescência para os aminoácidos dansilados de sítio I após a adição de fenilbutazona (FBZ) ou ibuprofeno (IBU). | 136 |

| | |
|---|-----|
| Figura A 9 - Espectros de fluorescência para os aminoácidos dansilados de sítio II após a adição de fenilbutazona (FBZ) ou ibuprofeno (IBU). | 137 |
| Figura A 10 - Espectros de dicroísmo circular para os aminoácidos dansilados em associação com a HSA. | 138 |
| Figura A 11 - Espectros de dicroísmo circular para os aminoácidos dansilados em associação com a HSA – Avaliação de alterações na estrutura secundária da HSA. | 139 |
| Figura A 12 - Espectros de dicroísmo circular para os aminoácidos dansilados de sítio II em competição com varfarina (VAR) e naproxeno (NPX). | 140 |
| Figura A 13 - Perfil de ITC para o DL e o DG. | 141 |
| Figura A 14 - Sobreposição dos espectros de absorvância e fluorescência para a aplicação do FRET. | 142 |
| Figura A 15 - Determinação da constante de associação entre a DGlu e a HSA utilizando fluorescência. | 143 |
| Figura A 16 - Interação dos aminoácidos dansilados na entrada e no interior do sítio I da HSA a partir da <i>docking</i> molecular | 144 |
| Figura A 17 - Interação entre os aminoácidos dansilados e o sítio II da HSA a partir de <i>docking</i> molecular. | 145 |
| Figura A 18 - O processo de dissociação de DA (esquerda) e DP (direita) dos locais de ligação I e II, respectivamente. | 146 |
| | |
| Figura B 1 - Perfil de ITC comparando a análise do branco com G8-BSA. | 149 |
| Figura B 2 - G0 no sítio II da BSA. | 149 |
| Figura B 3 - G0 no sítio III da BSA. | 150 |
| Figura B 4 - G0 no sítio VI da BSA. | 150 |
| Figura B 5 - G8 no sítio III da BSA. | 151 |
| Figura B 6 - G8 no sítio VI da BSA. | 151 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 - Valores máximos de comprimento de onda de emissão em PBS, complexados com a HSA e em álcool etílico. | 40 |
| Tabela 2 – Rendimento quântico para os aminoácidos dansilados de sítio I e II em solução tampão PBS, complexados com HSA e em álcool etílico. | 41 |
| Tabela 3 - Tempo de vida de fluorescência para os aminoácidos dansilados de sítio I e II. | 44 |
| Tabela 4 - Taxa de decaimento radioativa (K_r) e taxa de decaimento não radioativa (K_{nr}) para os aminoácidos dansilados. | 45 |
| Tabela 5 - Constantes de associação obtidas pelo experimento de aumento de fluorescência com a adição de HSA. | 50 |
| Tabela 6 - Constantes de associação obtidas pelo experimento de aumento de fluorescência com a adição dos aminoácidos dansilados. | 52 |
| Tabela 7 - Constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e Coeficiente de correlação (R^2). | 54 |
| Tabela 8 - Constantes de associação obtidas pelo experimento de <i>quenching</i> de fluorescência. | 57 |
| Tabela 9 - Anisotropia para os aminoácidos dansilados. | 71 |
| Tabela 10 - Parâmetros termodinâmicos obtidos por ITC. | 74 |
| Tabela 11 - Valores de J, E, R_0 e r obtidos pelo FRET. | 77 |
| Tabela 12 - Valores aproximados da distância entre o resíduo de triptofano da HSA e alguns ligantes específicos de sítio I ou II na proteína determinados pelo software RASMOL. | 78 |
| Tabela 13 - Valores de rendimento quântico para DL, DGlu e DP. | 82 |
| Tabela 14 - Tempo de vida para DL, DGlu e DP em álcool etílico e complexado a HSA. | 83 |
| Tabela 15 - Valores de K_a para o DL, DGlu e DP em associação com a HSA. | 85 |
| Tabela 16 - Valores de anisotropia de fluorescência para o DL, DGlu e DP na ausência e na presença de HSA. | 86 |
| Tabela 17 - Valores de J, E, R_0 e r para a DGlu e determinados por FRET. | 90 |
| Tabela 18 - Valores de <i>score</i> para a interação entre os aminoácidos dansilados e a HSA. | 93 |
| Tabela 19 - Análise de energia livre de ligação de MM-GBSA de complexos de HSA-aminoácidos dansilados. | 95 |
| Tabela 20 - Valores de K_{sv} e K_q para o G0 e o G8. | 100 |
| Tabela 21 - Interação do G8 com a albumina. Efeito do meio na constante de Stern-Volmer (K_{sv}). | 103 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 22 - Constante de associação e parâmetros termodinâmicos para a interação G8-BSA. | 104 |
| Tabela 23 - Valores de K_a e dos parâmetros termodinâmicos para o palmitato de ascorbila em 20°C e 40°C..... | 108 |
| Tabela 24 - Energia de ligação e número de ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos para a interação G0 ou G8 com a BSA obtidos por <i>docking</i> molecular..... | 113 |
| | |
| Tabela A 1 - Decomposição de energia livre de MM-GBSA por resíduo para os complexos de HSA com aminoácidos dansilados ligados nos sítios I e II..... | 147 |

Lista de abreviaturas

BLV – biliverdina

BSA – albumina sérica bovina

DA – dansil-arginina

DC – dansil-cadaverina

DG – dansil-glicina

DGlu – dansil-glutamina

DL – dansil-lisina

DN – dansil-norleucina

DP – dansil-prolina

DS – dansil-serina

FBZ – fenilbutazona

G0 – ácido gálico

G8 – galato de octila

HSA – albumina sérica humana

IBU – ibuprofeno

ICD – dicroísmo circular induzido

ITC – calorimetria de titulação isotérmica

K_{nr} – taxa de decaimento não-radioativa

K_r – taxa de decaimento radioativa

NPX - naproxeno

PBS – solução fisiológica salina tamponada com fosfato

VAR – varfarina

Sumário

| | |
|--|----|
| 1- Introdução..... | 1 |
| 2 – Fundamentação teórica..... | 3 |
| 2.1 – Albumina sérica humana: estrutura e interação com os fármacos..... | 3 |
| 2.2 – Determinação do sítio de ligação dos fármacos na albumina..... | 7 |
| 2.3 – Controvérsias sobre o uso de aminoácidos dansilados..... | 9 |
| 2.4 – Técnicas para o estudo da interação entre ligantes e proteína..... | 12 |
| 3 – Objetivos..... | 18 |
| 3.1 – Objetivos específicos..... | 18 |
| 4 – Materiais e Métodos..... | 21 |
| 4.1 – Materiais..... | 21 |
| 4.1.1 – Reagentes..... | 21 |
| 4.1.2 – Equipamentos..... | 21 |
| 4.1.3 – Preparo das soluções..... | 21 |
| 4.2 – Métodos..... | 26 |
| 4.2.1 – Determinação do espectro de fluorescência dos aminoácidos dansilados em solução tampão PBS, álcool etílico ou HSA..... | 26 |
| 4.2.2 – Determinação do rendimento quântico de fluorescência dos aminoácidos dansilados em solução tampão PBS, álcool etílico ou HSA..... | 27 |
| 4.2.3 – Tempo de vida de fluorescência para os aminoácidos dansilados..... | 27 |
| 4.2.4 – Espectros de fluorescência a partir da adição de HSA: determinação da constante de associação (K_a)..... | 28 |

| | |
|---|----|
| 4.2.5 – Espectros de fluorescência a partir da adição dos aminoácidos dansilados: determinação da constante de associação (K_a)..... | 28 |
| 4.2.6 – Espectros de supressão de fluorescência a partir da adição dos aminoácidos dansilados: Determinação da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e da constante de associação (K_a)..... | 29 |
| 4.2.7 – Aplicação da metodologia de Job's plot para a determinação da estequiometria do complexo dansilados-HSA..... | 29 |
| 4.2.8 – Estudo do sítio de ligação dos aminoácidos dansilados utilizando o experimento de deslocamento a partir de adição de ligantes conhecidos. | 30 |
| 4.2.9 – Elucidação do sítio de ligação a partir do deslocamento da varfarina no sítio de ligação da HSA..... | 30 |
| 4.2.10 – Interação entre os aminoácidos dansilados e a HSA utilizando dicroísmo circular..... | 30 |
| 4.2.11 – Elucidação do local de ligação de ligação utilizando o dicroísmo circular. | 31 |
| 4.2.12 – Anisotropia na fluorescência para os aminoácidos dansilados. | 31 |
| 4.2.13 – Interação entre os aminoácidos dansilados e a HSA utilizando calorimetria de titulação isotérmica (ITC). | 31 |
| 4.2.14 – Aplicação da técnica de transferência de energia ressonante de fluorescência (FRET) para os aminoácidos dansilados em associação com a HSA. | 32 |
| 4.2.15 – Estudos de <i>docking</i> molecular para os aminoácidos dansilados associados a HSA | 32 |
| 4.2.16 – Espectros de UV-Vis para o ácido gálico e o galato de octila | 35 |

| | |
|---|----|
| 4.2.17 – Estudos de <i>quenching</i> de fluorescência e determinação da constante de associação para o ácido gálico, galato de octila, ácido ascórbico e palmitato de ascorbila. | 35 |
| 4.2.18 – Tempo de vida de fluorescência para a interação entre a albumina e o G8. | 36 |
| 4.2.19 – Estudos de calorimetria de titulação isotérmica envolvendo o G8 e a BSA. | 36 |
| 4.2.20 – Elucidação do local de ligação do G8 na BSA utilizando dicroísmo circular. ... | 37 |
| 4.2.21 – Estudos de <i>docking</i> molecular para o G0 e G8 em associação com a BSA..... | 37 |
| 4.2.22 – Análises gráficas | 37 |
| 5 – Resultados e Discussão..... | 38 |
| Capítulo 1: Aplicação dos aminoácidos dansilados como sondas para a determinação de sítios de ligação em albumina: estudo das diferentes afinidades entre os dansilados de sítio I e os dansilados de sítio II com a albumina sérica humana | 38 |
| 5.1.1 – Efeito solvatocrômico: determinação do rendimento quântico de fluorescência. | 38 |
| 5.1.2 – Fluorescência resolvida no tempo: estudo da interação dansilados-HSA e determinação da taxa de decaimento radioativa (K_r) e não-radioativa (K_{nr})..... | 43 |
| 5.1.3 – Determinação da constante de associação (K_a) a partir do aumento de fluorescência com a adição de HSA..... | 46 |
| 5.1.4 – Determinação da constante de associação (K_a) a partir do aumento da fluorescência com a adição dos aminoácidos dansilados..... | 50 |
| 5.1.5 – Determinação da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e da constante de associação (K_a) utilizando a supressão de fluorescência da proteína a partir da adição dos aminoácidos dansilados..... | 52 |

| | |
|---|----|
| 5.1.6 – Elucidação do local de ligação de aminoácidos dansilados utilizando a fluorescência | 59 |
| 5.1.6.1 – Ensaio de competição utilizando os aminoácidos dansilados e ligantes específicos de sítio I ou de sítio II da HSA. | 59 |
| 5.1.6.2 – Verificação do local de ligação do DL e do DP a partir do decréscimo da intensidade de fluorescência do complexo varfarina-HSA. | 62 |
| 5.1.7 – Estudo da interação entre a HSA e os aminoácidos dansilados utilizando dicroísmo circular induzido (ICD). | 64 |
| 5.1.8 – Verificação do local de ligação dos dansilados utilizando dicroísmo circular. | 66 |
| 5.1.9 – Estudo da variação da anisotropia de fluorescência dos aminoácidos dansilados a partir da adição de HSA. | 70 |
| 5.1.10 – Estudo da interação entre os aminoácidos dansilados e a HSA utilizando a calorimetria de titulação isotérmica. | 72 |
| 5.1.11 – Determinação da distância entre o resíduo de triptofano na HSA e os aminoácidos dansilados utilizando transferência de energia ressonante de fluorescência (FRET). | 74 |
| 5.1.12 – Utilização da dansil-glutamina como sonda específica para o sítio I da HSA. | 81 |
| 5.1.13 – Estudos de <i>docking</i> molecular | 91 |
| 5.1.14 – Considerações finais sobre os estudos envolvendo os aminoácidos dansilados com a HSA. | 97 |
| Capítulo 2 - Aplicação de sondas de diferentes hidrofobicidades para a verificação da afinidade de ligação com a albumina. | 98 |
| 5.2.1 – Interação entre o G0 e G8 com a albumina: análises utilizando a fluorescência no estado estacionário. | 99 |

| | |
|--|-----|
| 5.2.2 – Estudo da interação G8 com a albumina utilizando a fluorescência resolvida no tempo. | 104 |
| 5.2.3 – Estudo da interação G8 com albumina utilizando a calorimetria de titulação isotérmica..... | 106 |
| 5.2.4 – Interação entre o ácido ascórbico e o palmitato de ascorbila com a albumina | 107 |
| 5.2.5 – Determinação do sítio de ligação do G8 na albumina: aplicação de ensaios de deslocamento. | 109 |
| 5.2.6 – Estudo da interação entre G0 ou G8 com a albumina utilizando o <i>docking</i> molecular. | 111 |
| 5.2.7 – Considerações finais dos estudos envolvendo a interação dos galatos com a albumina..... | 114 |
| 6 – Conclusões..... | 116 |
| Referências Bibliográficas..... | 119 |
| Anexo A..... | 129 |
| Anexo B..... | 149 |

1- Introdução

A albumina sérica humana, HSA, é a mais abundante proteína constituinte do plasma sanguíneo. Ela é formada por uma única cadeia polipeptídica contendo 585 resíduos de aminoácidos. Dentre todos os resíduos de aminoácidos que constituem a HSA há somente um único resíduo de triptofano na posição 214 (CARTER et al., 1989; FANALI et al., 2012). A HSA desempenha um papel crucial no transporte de compostos endógenos e exógenos, tais como fármacos. Neste contexto, destaca-se a importância do estudo da ligação fármaco-albumina, já que as propriedades farmacocinéticas dos fármacos podem ser influenciadas pela interação com a HSA (AL-HARTHI et al., 2019; GHUMAN et al., 2005; MUSA et al., 2020).

A estrutura da HSA é constituída de subunidades com distâncias aproximadamente semelhantes entre as ligações de dissulfeto e organizada em domínios e subdomínios. O transporte dos compostos exógenos ocorre em dois principais sítios de ligação denominados de sítio I e sítio II. O sítio I está localizado no subdomínio IIA e apresenta uma cavidade apolar com dois agregados polares: um na entrada e outro no fundo da cavidade (FANALI et al., 2012; GHUMAN et al., 2005). Comparado ao outro sítio de ligação, o sítio I possui um tamanho grande e por isso, em alguns trabalhos, esta cavidade foi subdividida em três diferentes regiões (AL-HARTHI et al., 2019). O único resíduo de triptofano, Trp-214, responsável pela fluorescência intrínseca da HSA, está localizado nas proximidades do sítio I. O sítio II é uma cavidade apolar localizada no subdomínio IIIA e apresenta um único agregado polar localizado de um lado da entrada do sítio (GHUMAN et al., 2005; RYAN; CHUNG; CURRY, 2011).

A interação de um fármaco com a HSA depende das suas propriedades estruturais. Apesar de aspectos estruturais serem utilizados como critério para identificar a preferência de ligação de um composto em um sítio específico da proteína, esta determinação somente é possível por meio de procedimentos experimentais (DE; KAUR; DATTA, 2013; YAMASAKI, KEISHI et al., 2013). A importância de descobrir o sítio preferencial de ligação de um composto na HSA pode ser simplificada quando consideramos a coadministração de fármacos, por exemplo. Considerando que somente a fração livre de fármaco é capaz de produzir efeito terapêutico, a coadministração de dois compostos que se liguem ao mesmo local da HSA poderá influenciar nas suas propriedades farmacocinéticas (KRAGH-HANSEN; CHUANG; OTAGIRI, 2002; MUSA et al., 2020; RODRIGUEZ et al., 2016; VALERIO et al., 2016; YAMASAKI, KEISHI et al., 2013).

Desta maneira, quando um novo fármaco é desenvolvido e este poderá ser transportado pela HSA é necessário estudar a interação fármaco-proteína, assim como, determinar o sítio preferencial de ligação. Experimentalmente, a determinação do sítio preferencial de ligação de um fármaco na HSA pode ser realizada a partir de estudos de competição (DEMORO et al., 2013; HE et al., 2016; KUNWAR et al., 2006; POÓR et al., 2015). Nesses estudos é utilizado uma sonda em que o sítio de ligação na proteína é conhecido. Dentre essas sondas utilizadas como competidores de sítio na HSA se destacam os aminoácidos dansilados (ABUIN; CALDERÓN; LISSI, 2008; CHEN, YAN-MIN; GUO, 2009; DE; KAUR; DATTA, 2013; RODRIGUEZ et al., 2016; TAGUCHI et al., 2015; WU et al., 2011). Os aminoácidos dansilados são fluorescentes e são específicos para um determinado sítio da HSA, ou seja, existem dansilados que possuem preferência para o sítio I, assim como há aqueles que tem o sítio II como preferencial. Os dansilados são sondas fluorescentes e alteram esta propriedade quando estão ligados a HSA, de maneira que apresentam aumento da intensidade e deslocamento do espectro de emissão quando estão no microambiente apolar da cavidade da proteína (RYAN et al., 2011).

Desde 1975, Sudlow e seus colaboradores aplicam os aminoácidos dansilados como sondas para a determinação do sítio preferencial de outros compostos na HSA (SUDLOW; BIRKETT; WADE, 1975). Porém, um levantamento crítico da literatura mostra que a utilização das sondas dansiladas que preferencialmente se ligam ao sítio I da HSA apresenta equívocos de interpretação (CHEN, YAN-MIN; GUO, 2009; MALISZEWSKA et al., 2016). Algumas vezes ao se utilizar um aminoácido de sítio I em ensaios de competição, os resultados não são conclusivos e levam a necessidade de se aplicar outra sonda ou outra técnica para se obter com maior confiabilidade o local preferencial de ligação do composto (DUFOUR; DANGLES, 2005; MALISZEWSKA et al., 2016). De fato, os aminoácidos dansilados que preferem se ligar ao sítio I da HSA possuem menor afinidade com a proteína e talvez esta seja a razão da menor especificidade destes compostos com a albumina.

Diante do exposto e da importância do tema, neste trabalho procuramos compreender a menor afinidade que existe dos dansilados de sítio I quando comparados com os que preferem o sítio II da HSA. Para auxiliar nestes estudos utilizamos a combinação das técnicas de espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de dicroísmo circular, calorimetria de titulação isotérmica e *docking* molecular e dinâmica molecular. Conseguimos elucidar esta característica dos dansilados de sítio I, mostrando que se trata de uma repulsão eletrostática

entre os aminoácidos na entrada do sítio e a carga positiva na cadeia lateral dos aminoácidos danilados de sítio I.

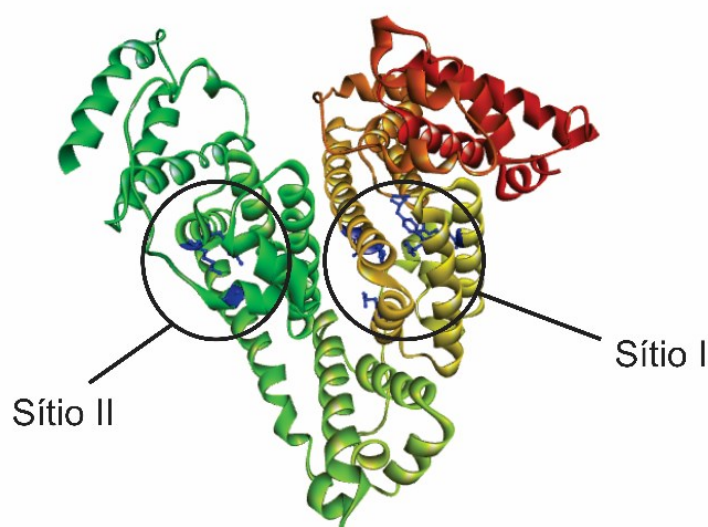
2 – Fundamentação teórica

2.1 – Albumina sérica humana: estrutura e interação com os fármacos

A albumina sérica humana (*human serum albumin*, HSA) é formada por uma única cadeia polipeptídica que contém 585 resíduos de aminoácidos. A proteína possui 35 resíduos de cisteína, formando 17 ligações de dissulfeto, as quais auxiliam na estabilidade da estrutura da proteína, sendo que o resíduo Cys34 é o único grupo de sulfidril livre. A cadeia da HSA é constituída de subunidades com distâncias aproximadamente semelhantes entre as ligações de dissulfeto. A primeira estrutura cristalográfica da HSA foi apresentada em 1989 e mostrou que a proteína é formada principalmente por α -hélice (~ 67%) e é organizada em domínios homólogos (I, II e III), sendo que cada um apresenta dois subdomínios (A e B) (Figura 1) (CARTER *et al.*, 1989; FANALI *et al.*, 2012; YAMASAKI, KEISHI *et al.*, 2013; ZHIVKOVA, ZVETANKA D, 2015). Ela é a principal proteína constituinte do plasma sanguíneo, sendo que nos seres humanos sua concentração varia de 35-50 mg/mL (MERLOT; KALINOWSKI; RICHARDSON, 2014).

Figura 1 - Estrutura cristalina da albumina sérica humana (HSA) na resolução de 2,6 Å.

Em destaque na figura estão apresentados o sítio I localizado no subdomínio II A e o sítio II localizado no subdomínio IIIA.



Adaptada do Protein Data Bank (ID: 1E78) (BHATTACHARYA; CURRY; FRANKS, 2000) criada utilizando o Discovery Studio 4.5 (D.S. 4.5).

Uma das principais funções da HSA é a regulação da pressão osmótica do sangue. Além disso, a HSA desempenha um papel crucial na ligação, armazenamento e transporta de diversos ligantes endógenos, tais como ácidos graxos, heme, bilirrubina, entre outros (AL-HARTHI *et al.*, 2019). No contexto farmacológico, uma das principais características da HSA é transportar fármacos e, dessa maneira, a proteína influencia diretamente suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (GHUMAN *et al.*, 2005; RONZETTI *et al.*, 2018; SAKURAMA *et al.*, 2018; TIAN *et al.*, 2018; WANG, QI *et al.*, 2016). Deve-se considerar que compreender a atividade farmacocinética de um fármaco no organismo engloba estudar sua distribuição, taxa de metabolismo e sua excreção, etc, pois tais fatores são de fundamental interesse no desenvolvimento de novos medicamentos (COLMENAREJO; ALVAREZ-PEDRAGLIO; LAVANDERA, 2001). Desta maneira, estudar a ligação fármaco-albumina é da maior importância, pois está diretamente relacionada com estes processos (MUSA *et al.*, 2020; SALDANHA *et al.*, 2016; ZHANG, YE-ZHONG *et al.*, 2008). De fato, somente moléculas de fármacos livres são capazes de produzir efeitos terapêuticos, ou seja, a afinidade da ligação entre o fármaco e a HSA poderá afetar a sua atuação no organismo (GHUMAN *et al.*, 2005). A HSA transporta uma variedade de fármacos, sendo que, atualmente são 250 fármacos transportadas por esta proteína que estão registradas no mercado (AL-HARTHI *et al.*, 2019).

Os principais locais de ligação de fármacos na HSA são denominados de sítio I e sítio II e estão localizados nos subdomínios IIA e IIIA, respectivamente (FANALI *et al.*, 2012; YAMASAKI, KEISHI *et al.*, 2013; ZHIVKOVA, ZVETANKA, 2015). O sítio I e o sítio II se diferem ao considerar a sua forma, tamanho e polaridade, as quais determinam a especificidade da ligação nas duas cavidades. O sítio I é uma cavidade predominantemente não-polar e o único resíduo de triptofano presente na HSA está localizado nas proximidades deste local. Dois agregados polares de resíduos de aminoácidos podem ser identificados neste sítio: um no fundo da cavidade (Tyr150, His242, Arg257) e outro na entrada da cavidade (Lys195, Lys199, Arg218, Arg222). Os aminoácidos dos agregados polares estão destacados em azul na Figura 1. Este sítio é considerado grande em tamanho quando comparado ao sítio II e, desta forma, a sua zona central pode ser dividida em três compartimentos (AL-HARTHI *et al.*, 2019). A Tyr150 parece ter um papel central na interação dos ligantes com esse sítio, uma vez que está envolvida na formação de ligação de hidrogênio com diversas moléculas

(GHUMAN *et al.*, 2005; RYAN *et al.*, 2011; RYAN; CHUNG; CURRY, 2011; ZHIVKOVA, ZVETANKA D, 2015).

O sítio II é menor do que o sítio I e foi observado que o acesso a este sítio ocorre somente após o movimento da cadeia lateral induzido pelo ligante, com isso a entrada do sítio é exposta ao solvente (AL-HARTHI *et al.*, 2019). Na cavidade do sítio II existe um único agregado polar localizado perto de um lado da entrada do sítio incluindo Arg410, Tyr411, Lys414 e Ser489. Os aminoácidos do agregado polar deste sítio estão destacados em azul na Figura 1. A presença de somente um agregado polar localizado unilateralmente a entrada da cavidade hidrofóbica determina a especificidade do sítio II. Ligantes de sítio II, como diflunisal, ibuprofeno e sulfato indoxil, estão localizados no centro da cavidade e interagem com a Tyr411 (GHUMAN *et al.*, 2005; RYAN *et al.*, 2011; ZHIVKOVA, ZVETANKA D, 2015).

A ligação de um fármaco à HSA depende de suas características estruturais, o que o levará a maior ou menor afinidade por um sítio ou outro. Geralmente, moléculas heterocíclicas volumosas com carga negativa localizada na parte central ligam-se preferencialmente ao sítio I; enquanto moléculas aromáticas que possuem em sua estrutura ácidos carboxílicos com a carga negativa localizada nas extremidades e separada por um centro hidrofóbico ligam-se preferencialmente ao sítio II da HSA (YAMASAKI, KEISHI *et al.*, 2013). Apesar dessas tendências, não existe um modelo teórico que possa determinar por qual sítio um fármaco terá preferência, ou maior ou menor afinidade de ligação pela simples inspeção de sua estrutura molecular, ou seja, somente experimentalmente se determina essas características (DE; KAUR; DATTA, 2013; ZSILA *et al.*, 2011).

A força da interação entre o fármaco e a HSA depende da afinidade do composto pelos sítios da proteína e do número de sítios de ligação ativos (BRUTON; HILAL-DANDAN, 2015). A afinidade entre a HSA e os fármacos é mensurada por meio da constante de afinidade (K_a). Ela representa o equilíbrio entre o complexo proteína-fármaco e seus componentes não ligados. Também é comum utilizar a constante de dissociação, K_d , que corresponde ao inverso de K_a (COX, MICHAEL, M. COX, MICHAEL, DOUDNA, 2012). Se a concentração do fármaco estiver abaixo do valor da constante de dissociação, a fração ligada do fármaco à proteína depende da concentração dos sítios de ligação. Do mesmo modo, se o fármaco está presente em grandes concentrações, o número de sítios ativos na proteína também influenciará a sua distribuição (BRUTON; HILAL-DANDAN, 2015).

A ligação da HSA com o fármaco pode ser afetada pela presença de outros fármacos ou compostos endógenos. Uma vez que um determinado fármaco possua preferência por um dos sítios de ligação da proteína, a coadministração com outro fármaco que compete pelo mesmo local de ligação poderá alterar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (KRAGH-HANSEN; CHUANG; OTAGIRI, 2002; RODRIGUEZ et al., 2016). Além disso, a presença de outros compostos pode interferir alostericamente na afinidade do fármaco pela HSA, aumentando ou diminuindo a interação fármaco-proteína, por meio de alterações provocadas no microambiente do sítio de ligação. Esses compostos também podem interferir nas forças intermoleculares que estabilizam a estrutura secundária e terciária da proteína, podendo causar alterações em sua conformação, o que também irá afetar a afinidade entre o fármaco e a HSA (MUSA et al., 2020; OTAGIRI, 2005; VALERIO et al., 2016). A coadministração da furosemida e do bucolome é um exemplo da aplicação do deslocamento de um fármaco pelo outro. Pacientes que possuem a síndrome nefrótica são tratados com a furosemida. Porém, nestes pacientes, a concentração do fármaco livre é pequena, ou seja, a afinidade da furosemida com a HSA é alta, fazendo com que a maioria das moléculas permaneçam ligadas à proteína. Com a administração do bucolome, a furosemida é liberada, isto porque, o bucolome “desloca” a furosemida do sítio de ligação da HSA. Desta maneira, a coadministração da furosemida e do bucolome aumenta a concentração livre de furosemida, afetando, neste caso, positivamente suas propriedades farmacocinéticas. Pesquisas como estas somente são possíveis se anteriormente os sítios de ligação e a constante de afinidade dos fármacos forem determinados (YAMASAKI, KEISHI et al., 2013).

Em um estudo relatou-se que o alívio da dor em pacientes com artrite reumatoide utilizando diclofenaco foi aumentado pela administração concomitante de nabumetona. O metabolito ativo do nabumetona, ácido 6-metoxi-2-nafilacético (6-MNA), liga-se no mesmo local que o diclofenaco, o sítio II da HSA. Assim, a administração concomitante dos dois compostos aumenta a concentração livre de diclofenaco devido ao “deslocamento” provocado pelo 6-MNA (SETOGUCHI et al., 2013). Assim, a mudança da concentração livre da droga pode influenciar na sua atividade farmacológica em alguns casos (YAMASAKI, KEISHI et al., 2013).

Estados patológicos também podem afetar a concentração de HSA livre, alterando as propriedades farmacocinéticas dos fármacos. Esse efeito ocorre devido a mudanças estruturais na molécula de HSA e/ou “deslocamento” dos fármacos ligados a proteína por moléculas endógenas acumuladas durante o estado patológico (FANALI et al., 2012). Neste contexto,

pode-se mencionar exemplos como doenças renais e hepáticas. Em doenças renais, a concentração dos fármacos ligados à HSA é pequena devido a acumulação de inibidores endógenos (toxinas acumuladas devido a falência renal), que são os responsáveis pela deficiência na ligação fármaco-HSA (FERLIZZA et al., 2017). Nas doenças hepáticas, a diminuição da concentração de fármacos ligados a HSA ocorre devido a mudanças na estrutura da proteína, além da presença dos inibidores endógenos (VALERIO et al., 2016). Neste caso em particular, a diálise extracorpórea está sendo utilizada para a remoção desses inibidores endógenos, uma vez que podem afetar diretamente a afinidade da ligação fármaco-HSA (MITZNER, 2011).

A capacidade de deslocamento de uma droga por outra pode, também, ser aplicada em diagnósticos radiofarmacêuticos. Por exemplo, a mercaptoacetilglicilglicina marcada com tecnécio-99m é utilizada na cintilografia renal, e é deslocada da albumina quando é coadministrada com bucolome, resultando em uma acumulação mais rápida no rim, seguido de uma remoção mais acelerada (NISHI et al., 2013). Desta maneira, o deslocamento do produto radio farmacêutico pode contribuir para menores doses de radiação para os pacientes e tempos de imagem mais curtos (YAMASAKI, KEISHI et al., 2013). Estes exemplos destacam a importância dos estudos da interação entre os fármacos e a HSA para melhor compreensão dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos deles, levando à otimização de tratamentos.

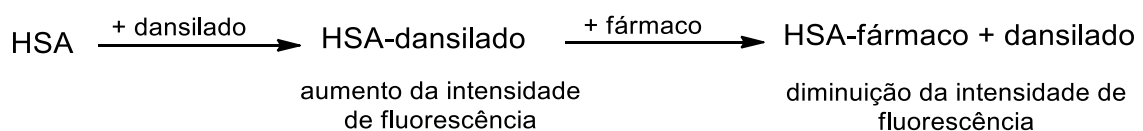
2.2 – Determinação do sítio de ligação dos fármacos na albumina

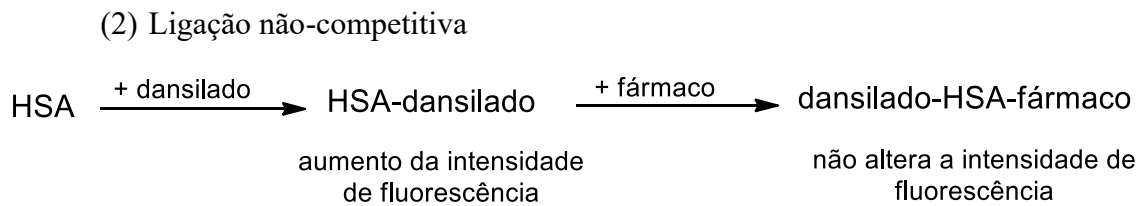
A determinação do local de ligação (sítio I ou sítio II) dos fármacos na HSA pode contribuir para compreensão da afinidade da ligação, além de auxiliar nos estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos (DEMORO et al., 2013; KUNWAR et al., 2006; POÓR et al., 2015). A seção anterior mostrou diversos exemplos que utilizam a capacidade de “deslocamento” de um fármaco por outro aplicadas em diferentes terapias, sendo que, este fenômeno só é possível uma vez que se determine o local de ligação da droga na proteína. Assim, quando um novo fármaco é produzido, uma das etapas de seu desenvolvimento é definir seu sítio de ligação na HSA. Existem diversas metodologias que são utilizadas para a determinação do sítio de ligação na proteína, como por exemplo, diálise de equilíbrio, estudos espectroscópicos, calorimetria de titulação isotérmica e estudos teóricos de *docking* molecular (CHENG, 2012; LI et al., 2007; LIU, PEI et al., 2015; WANG, YANLI et al., 2011). No que

diz respeito a identificação dos sítios de ligação, a utilização de aminoácidos dansilados é bastante disseminada na literatura (ABUIN; CALDERÓN; LISSI, 2008; CHEN, YAN-MIN; GUO, 2009; DE; KAUR; DATTA, 2013; RODRIGUEZ et al., 2016; TAGUCHI et al., 2015; WU et al., 2011). Sudlow et al. (1975) foi um dos pioneiros no estudo dos aminoácidos dansilados como possíveis sondas fluorescentes na elucidação dos sítios de ligação da albumina. O método baseia-se no aumento do rendimento quântico de fluorescência dos aminoácidos dansilados, além do deslocamento do espectro de emissão para o azul, fenômeno este associado a mudança do microambiente da sonda, de um meio hidrofílico para um meio mais hidrofóbico (interior da proteína). Atualmente é aceito que as propriedades físico-químicas das cadeias laterais dos aminoácidos dansilados determinam o local de ligação na HSA, ou seja, aminoácidos dansilados que possuem cadeias laterais carregadas ou polares preferencialmente se ligam ao sítio I, enquanto que os aminoácidos que possuem cadeias laterais hidrofóbicas se ligam preferencialmente ao sítio II da proteína (RYAN et al., 2011). Assim, vários desses aminoácidos dansilados são utilizados como sonda específicas para o sítio I ou sítio II da HSA em estudos em que é necessário determinar o local de ligação de uma nova molécula (JISHA et al., 2006; SUDLOW; BIRKETT; WADE, 1975; ZHANG, YUANWEI et al., 2013). Eles podem ser divididos em aqueles que preferencialmente se ligam ao sítio I, como por exemplo a dansilamida e a dansilasparagina e aqueles que se ligam preferencialmente ao sítio II da HSA, como por exemplo, dansilprolina e a dansilsarcosina (RYAN et al., 2011).

Quando os aminoácidos dansilados são utilizados como sondas na determinação do sítio de ligação de um novo fármaco, os ensaios de “deslocamento” são utilizados. Como mencionado anteriormente, ao se ligar a proteína, ocorre o aumento do rendimento quântico de fluorescência dos aminoácidos dansilados, além do deslocamento do espectro de emissão para o azul. Assim, se outro composto se liga no mesmo sítio que a sonda dansilada, a diminuição do rendimento quântico de fluorescência indica que o dansilado foi “deslocado” do seu local de ligação. Assim duas situações podem ocorrer quando um novo composto é adicionado ao complexo HSA-dansilado (HE et al., 2016):

(1) Ligação competitiva





Desta maneira, a alteração da intensidade de fluorescência do complexo HSA-dansilado indica o possível local de ligação do novo fármaco. Como veremos na próxima seção, os estudos de “deslocamento” utilizando os aminoácidos dansilados está bastante difundido na literatura, auxiliando na elucidação do sítio de ligação na HSA de novos compostos.

2.3 – Controvérsias sobre o uso de aminoácidos dansilados

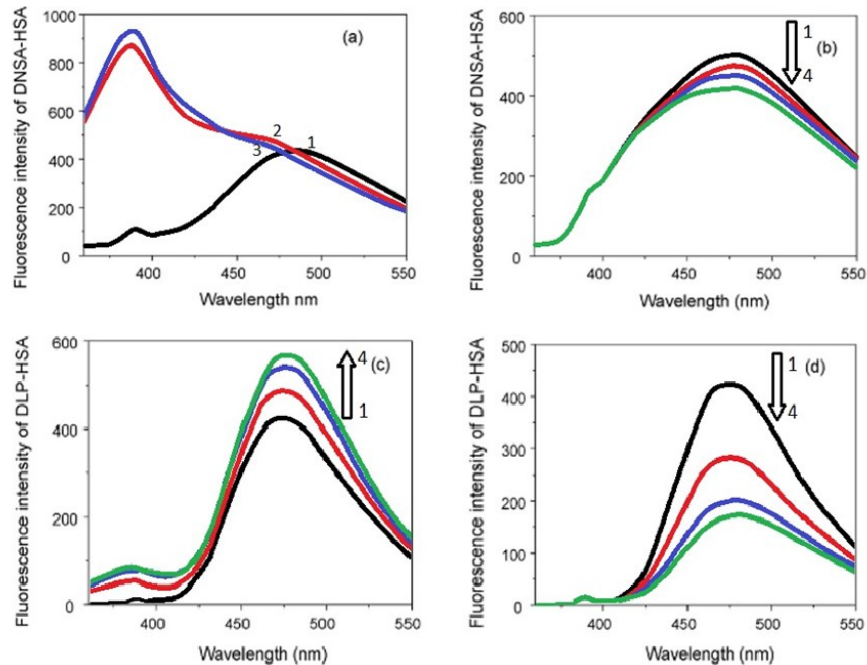
Como mostrado na seção anterior, o uso de aminoácidos dansilados para elucidação de sítios de ligação na albumina é bastante disseminado na literatura científica. Nosso próprio grupo de pesquisa tem aplicado tais metodologias (GRACIANI; XIMENES, 2013; VASCONCELOS; XIMENES, 2015; VENTURINI et al., 2015, 2017). Porém ao realizar tais estudos e, também, em função dos resultados disponíveis na literatura, identificamos dificuldades e controvérsias sobre a aplicação dos mesmos. Em particular o uso dos dansilados que são atribuídos ao sítio I não respondem da mesma maneira que aqueles de sítio II. Este fato pode ser observado, por exemplo, por meio do trabalho de Chen e seus colaboradores que explica que a sua droga não consegue deslocar a dansilamida (ligante específico de sítio I), devido a um efeito modulador (CHEN, YAN-MIN; GUO, 2009). Já o estudo de Yamasaki e seus colaboradores afirmam que a varfarina, que é um ligante de sítio I, não é capaz de deslocar com eficiência a dansilamida, pois neste caso não ocorre um mecanismo de competição, apesar de ambas se ligarem em um mesmo sítio da HSA. Os autores explicam que o pequeno deslocamento apresentado é resultado de interações anti-cooperativas devido a inibição de uma ligação alostérica (YAMASAKI, K et al., 1996). Este é outro exemplo que ilustra a particularidade na interpretação dos resultados quando é utilizado um aminoácido dansilado de sítio I, fato que não é observado com tanta frequência para os aminoácidos dansilados de sítio II.

O trabalho de Zhong e seus colaboradores buscou desenvolver um novo fármaco para a diabetes e utilizou os aminoácidos dansilados, dansilamina (ligante específico de sítio I) e dansilsarcosina (ligante específico de sítio II), em ensaios de competição para a determinação do local de ligação do fármaco na albumina. Porém, neste estudo, o novo composto foi capaz de deslocar ambos os dansilados, não indicando uma especificidade por um dos sítios da proteína. Este estudo apresentou, também, uma dificuldade que pode ser encontrada quando se utilizam os aminoácidos dansilados para a identificação do local de ligação de novos compostos (ZHONG et al., 2004).

A pesquisa realizada por Liu et al. (2009) é mais um exemplo da dificuldade encontrada por alguns pesquisadores na interpretação dos resultados quando utilizam um aminoácido dansilado específico para o sítio I. Neste trabalho utilizou-se a dansilamina (DNSA) para o sítio I e a dansilprolina (DLP) para o sítio II, além dos fármacos varfarina e ibuprofeno que se ligam ao sítio I e ao sítio II da HSA, respectivamente. Em um primeiro momento, a varfarina foi adicionada a mistura DNSA-HSA, e como ela também é um ligante de sítio I o esperado é a diminuição da intensidade de fluorescência como resultado do deslocamento da DNSA. A Figura 2A mostra que ocorre uma pequena diminuição da intensidade de fluorescência, porém esta alteração não foi muito expressiva. Em um segundo experimento, o ibuprofeno foi adicionado a mistura DNSA-HSA e como pode ser observado na Figura 2B, também ocorreu a diminuição da intensidade da fluorescência, fato que não era esperado, pois por ser um ligante de sítio II, o ibuprofeno não deveria ser capaz de deslocar a DNSA. Os experimentos realizados utilizando a DLP mostraram um comportamento totalmente distinto. Ao adicionar a varfarina a mistura DLP-HSA não se observa a supressão da fluorescência, pelo contrário, a intensidade de fluorescência aumenta devido a varfarina ser uma molécula fluorescente, ou seja, a varfarina não foi capaz de deslocar a DLP, já que se liga a um sítio distinto na HSA (Figura 2C). Logo quando o ibuprofeno foi adicionado a mistura DLP-HSA observa-se a diminuição expressiva da intensidade da fluorescência devido o deslocamento da DLP pelo ibuprofeno (Figura 2D) (LIU, XIANGPING et al., 2009). Desta forma, os estudos de Liu et al. (2009) somente apresentaram resultados satisfatórios para a sonda específica para o sítio II da HSA.

Figura 2 - Os efeitos da varfarina e do ibuprofeno na fluorescência de DNSA-HSA e/ou DLP-HSA.

(a) adição da varfarina (2 e 3) em DNSA-HSA (1). (b) adição do ibuprofeno (2-4) em DNSA-HSA (1). (c) adição da varfarina (2-4) em DLP-HSA (1). (d) adição do ibuprofeno (2-4) em DLP-HSA (1).



Adaptado de LIU et al. (2009).

Maliszewska e seus colaboradores em seu trabalho, para avaliar a coadministração de duas drogas para o tratamento de câncer de mama, utilizou a DNSA e a varfarina como sondas para a caracterização do sítio I e a dansilprolina (DP) como um marcador do sítio II da HSA. A utilização de duas sondas distintas para o sítio I pode ser interpretada como outro exemplo que mostra a desconfiança na interpretação dos resultados quando se utiliza aminoácidos dansilados específicos para o sítio I (MALISZEWSKA et al., 2016). Dufour e Dangles realizaram um estudo utilizando a albumina sérica bovina, BSA, na determinação do sítio de ligação da quercetina. Como marcadores para o sítio I foram empregados a dansil-L-asparagina, DNSA e a varfarina e para o sítio II foram utilizados o ibuprofeno e o diazepam. Os resultados mostraram que apesar da varfarina e a DNSA serem ligantes específicos para o sítio I, apenas a primeira alterou a afinidade da ligação entre a BSA e a quercetina, reforçando a possível controvérsia na interpretação dos resultados que poderia ocorrer se somente a espécie dansilada fosse utilizada na caracterização do local de ligação (DUFOUR; DANGLES, 2005).

Analisando o trabalho de Sudlow et al. (1975), em que foram medidos os valores das constantes de dissociação para os aminoácidos dansilados, observamos que aqueles, hoje atribuídos ao sítio I, apresentam afinidade cerca de dez vezes menor comparado aos de sítio II. Yamasaki et al. (1996) ao caracterizar o sítio I da HSA sugeriu que essa cavidade pode ser dividida em três regiões onde se ligariam moléculas distintas, questionando ainda mais a especificidade de ligantes para este sítio, assim como o fenômeno de competição. Em resumo, nos parece que a menor afinidade dos dansilados de sítio I deve ser a raiz dos problemas das interpretações controversas sobre o uso deles.

2.4 – Técnicas para o estudo da interação entre ligantes e proteína

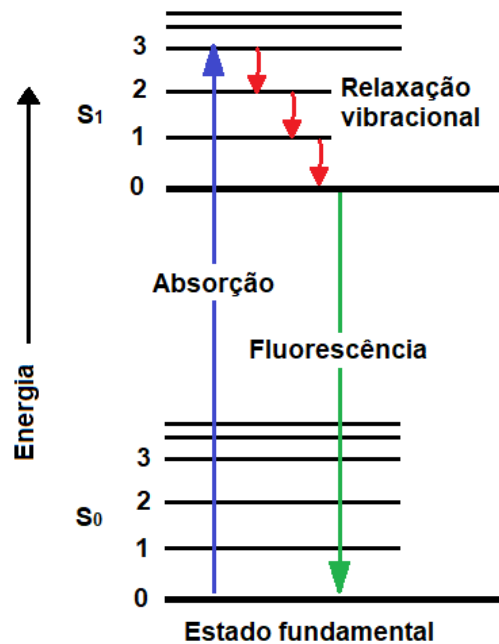
O estudo da interação entre ligante e proteínas pode ser realizado utilizando diferentes técnicas. São aplicadas metodologias tradicionais, como diálise de equilíbrio e ultrafiltração (REINARD; JACOBSEN, 1989; ZHIVKOVA, ZVETANKA D, 2015), metodologias espectroscópicas, tais como espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (ORAVCOVA'; BOHS; LINDNER, 1996) e espectroscopia de fluorescência, além de outros tipos de metodologias, como por exemplo, cromatografia de afinidade líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Affinity Chromatography*, HPLAC) (MATSUDA et al., 2015) e dinâmica molecular (ZHIVKOVA, ZVETANKA D, 2015). Neste capítulo vamos abordar com mais detalhes as técnicas que foram utilizadas neste estudo: espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de dicroísmo circular, calorimetria de titulação isotérmica e *docking* molecular. A aplicação de diferentes técnicas em conjunto auxilia na interpretação dos processos envolvidos na interação entre os ligantes e a proteína.

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas mais utilizadas para se estudar as interações entre a proteína e o ligante. Os processos de absorção e emissão de luz são ilustrados pelo diagrama de Jablonski (LAKOWICZ, 2006). Neste diagrama simplificado, ilustrado na Figura 3, S_0 e S_1 representam o estado fundamental e o primeiro estado excitado, respectivamente, e os níveis de energia vibracionais estão apresentados pela numeração de 0 a 5. As transições entre os estados fundamental e excitado são representadas por linhas verticais. Após a absorção da luz, uma vez que o fluoróforo é quase sempre excitado para algum nível vibracional do S_1 e considerando que a emissão só ocorre do nível vibracional de menor energia do estado excitado, primeiramente ocorre a relaxação vibracional, como está

ilustrado na Figura 3. A emissão radioativa ocasionada a partir da relaxação $S_1 \rightarrow S_0$ é chamada de fluorescência (LAKOWICZ, 2006; VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012).

Figura 3 - Diagrama de Jablonski simplificado.

A seta em azul representa o processo de absorção do fóton, a seta vermelha representa o processo de relaxação vibracional (processo não radioativo) e a seta em verde representa o processo de fluorescência (decaimento radioativo).



A HSA exibe fluorescência intrínseca devido ao seu único resíduo de triptofano, sendo que a contribuição de outros fluoróforos, tirosina e fenilalanina são considerados negligenciáveis. O espectro de fluorescência da HSA é sensível a mudança no microambiente do fluoróforo (triptofano). Neste contexto, a supressão da fluorescência da HSA pode ser provocada pela desativação ocasionada por colisões entre a proteína e o ligante (*quenching* dinâmico) ou pela formação de um complexo HSA-ligante (*quenching* estático) (LAKOWICZ, 2006). Ao ser caracterizado um *quenching* estático, a partir do monitoramento da fluorescência da proteína é possível obter os parâmetros que envolvem a complexação, tais como a constante de associação.

A espectroscopia de fluorescência também é empregada na caracterização de sítios de ligação na HSA por meio da utilização de sondas fluorescentes, que são pequenas moléculas que podem ter a sua fluorescência alterada a partir de interações covalentes ou não covalentes com outras moléculas (LAKOWICZ, 2006; ORAVCOVA'; BO'HS; LINDNER, 1996;

ZHIVKOVA, ZVETANKA D, 2015). Em geral, as sondas fluorescentes quando são utilizadas no estudo de interação com a HSA apresentam aumento no rendimento quântico de fluorescência devido à restrição do movimento provocada pela associação com a proteína, além do deslocamento do máximo de fluorescência devido a alteração do microambiente da sonda para a cavidade hidrofóbica da albumina (ERCELEN et al., 2005; LAKOWICZ, 2006; MALLICK; PAL; KONER, 2016).

Comparada a outras metodologias, a espectroscopia de fluorescência apresenta diversas vantagens, como, por exemplo, ser uma técnica de baixo custo, não invasiva e não destrutiva. Além disso, para se realizar uma análise de fluorescência não é necessário altas concentrações dos compostos, evidenciando a alta sensibilidade desta metodologia. A seletividade desta técnica ocorre, uma vez que a substância exibe um sinal de fluorescência característico, sendo que variações neste sinal somente serão observadas se alguma transformação acontecer na molécula, alterando o seu decaimento para o estado fundamental (LAKOWICZ, 2006; LUYKX; VAN RUTH, 2008).

A espectroscopia de dicroísmo circular é outra técnica utilizada para se estudar a interação entre proteínas e ligantes. Esta técnica se baseia na irradiação de luz circularmente polarizada. A diferença na absorção da luz circularmente polarizada para a direita com a absorvida para a esquerda, que ocorre em moléculas quirais, produz o sinal de dicroísmo circular. A HSA, um composto quiral, apresenta um espectro característico de dicroísmo, assim, interações com ligantes podem provocar mudanças no espectro de dicroísmo da proteína. Este método é muito sensível a pequenas mudanças no ambiente, revelando informações sobre alterações na estrutura da HSA (PISTOLOZZI; BERTUCCI, 2008; ZHIVKOVA, ZVETANKA D, 2015). Além disso, a espectroscopia de dicroísmo circular permite obter informações sobre processos de dobramento/desdobramento de proteínas em função de alterações de temperatura ou pH, por exemplo (MA; ZHANG; ZENG, 2018; VASCONCELOS; XIMENES, 2015).

Moléculas não quirais também podem ser estudadas por dicroísmo circular desde que elas tenham a capacidade de adquirir quiralidade em um ambiente assimétrico, por exemplo. A esta variação da técnica damos o nome de dicroísmo circular induzido (ICD). Sinais de ICD podem ser definidos como o efeito de uma perturbação ocasionado na simetria de uma molécula não quiral e que resultou na geração de uma força de rotação diferente de zero (ALLENMARK, 2003). Essa perturbação pode ter origem em diferentes sistemas, como por exemplo, na interação com um meio anisotrópico, na restrição da liberdade conformacional

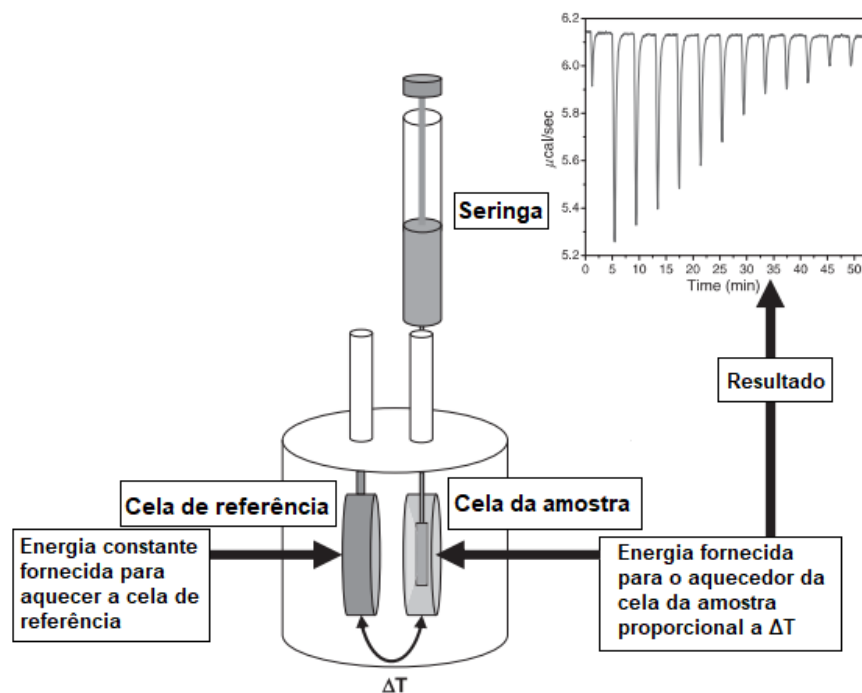
provocada por interações intermoleculares ou ainda no acoplamento dos momentos de transição dos dipolos dos cromóforos a partir da interação com uma molécula (TEDESCO; BERTUCCI, 2015).

O método de ICD é amplamente utilizado para estudar a interação entre diferentes compostos com a albumina. A dansil-glicina, por exemplo, um dansilado utilizado neste trabalho, já foi estudada utilizando a técnica de ICD. A dansil-glicina não é um composto quiral, porém ao interagir com a HSA, um novo sinal de ICD é obtido. Este sinal foi utilizado na determinação da constante de associação entre a dansil-glicina e a HSA e na elucidação do sítio preferencial deste composto na proteína (GRACIANI; XIMENES, 2013). O espectro de ICD da interação entre a dansil-glicina e a HSA também foi estudado pela teoria do funcional da densidade (DFT) em que foi possível determinar que o grupo $-N(CH_3)_2$ da estrutura da dansil-glicina tem grande contribuição para o surgimento do sinal de ICD após a complexação (DE SOUZA et al., 2019), evidenciando a importância da técnica de dicroísmo circular neste contexto. De fato, comparada as outras técnicas utilizadas para o estudo da interação entre ligantes e proteína, a espectroscopia de dicroísmo circular apresenta vantagens já que em uma única metodologia é possível estudar características estruturais, tais como alterações na estrutura secundária de proteínas, além de ser possível determinar parâmetros envolvidos na complexação como, por exemplo, a constante de associação (TRAMARIN et al., 2019).

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) também é uma técnica utilizada no estudo entre a interação de ligantes e proteínas, e, diferentemente das técnicas de fluorescência e dicroísmo circular que são espectroscópicas, o ITC é uma metodologia analítica calorimétrica. Comparado aos métodos espectroscópicos, as medidas calorimétricas podem ser realizadas utilizando reagentes que não possuem propriedades espectroscópicas, por exemplo, não é necessário que exista um cromóforo durante a análise. Além disso, a metodologia pode ser aplicada em meios que são opacos, heterogêneos ou que apresentam turbidez. Diversos sistemas podem ser estudados a partir do ITC, como por exemplo, reações ácido-base, complexação envolvendo íons metálicos e interações ligante-proteína, porém a técnica possui um limite de detecção em que a constante de equilíbrio deve compreender a faixa de $10^4 - 10^5$ M^{-1} . A determinação de constantes de associação fora desta faixa requer que as soluções envolvidas sejam diluídas, contudo, neste caso, os calorímetros não são suficientemente sensíveis (FRAZIER; PAPADOPOULOU; GREEN, 2006; FREYER; LEWIS, 2008; HANSEN; TRANSTRUM; QUINN, 2018).

O instrumento de ITC pode ser baseado na metodologia de compensação de energia. Este sistema possui vantagens tais como a elevada sensibilidade e a necessidade de pouca quantidade de amostra (SALIM; FEIG, 2009). A Figura 4 apresenta um esquema de um equipamento de ITC por compensação de energia. Este equipamento possui uma seringa, onde é colocada a solução contendo o titulante, e duas celas, uma em que é colocado a solução de referência e na outra a solução do titulado, por exemplo, a proteína. Neste equipamento a temperatura do sistema é mantida constante, assim, quando uma reação química acontece, qualquer variação de temperatura é detectada e então ocorre a compensação de energia de forma a manter a temperatura constante. A temperatura de cada cela é monitorada individualmente, de forma que, se a cela da amostra apresentar aumento de temperatura devido a um processo exotérmico, o sistema irá realizar a compensação da energia de forma a igualar novamente a temperatura. O sinal obtido pelo equipamento ($\mu\text{J/s}$ ou $\mu\text{cal/s}$) nada mais é que a energia aplicada que é necessária para impedir que a temperatura do sistema seja alterada em função do tempo. A alteração do calor envolvido na reação é então calculada a partir da integral do gráfico obtido pelo equipamento (FREYER; LEWIS, 2008; HANSEN; TRANSTRUM; QUINN, 2018; SALIM; FEIG, 2009).

Figura 4 - Esquema do equipamento de ITC.



Adaptada de (FREYER; LEWIS, 2008)

A utilização da técnica de ITC para o estudo da interação entre proteínas e ligantes é bastante completa, uma vez que uma única análise permite obter os parâmetros da interação, tais como a constante de associação e a estequiometria, além dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na associação, como a variação de entalpia (FRAZIER; PAPADOPOULOU; GREEN, 2006). A partir da variação de entalpia, os demais parâmetros termodinâmicos, tais como energia livre de Gibbs e entropia podem ser facilmente determinados.

As técnicas experimentais podem ser aliadas aos estudos de *docking* molecular. O *docking* molecular é uma técnica computacional capaz de verificar a interação entre ligantes e macromoléculas. Em geral, ao se utilizar o *docking* molecular é possível obter a estrutura tridimensional mais estável do ligante ao se complexar com a proteína, a energia envolvida na interação e os tipos de interação que ocorrem entre os átomos dos ligantes e os resíduos de aminoácidos da biomolécula (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017; ZHIVKOVA, ZVETANKA D, 2015). Nas análises de *docking* são escolhidas estratégias de maneira que enquadre o objetivo e os recursos computacionais disponíveis, pois se a flexibilidade total do ligante e da biomolécula fosse considerado, além do alto tempo gasto, o custo computacional tornaria a técnica inadequada para muitas aplicações. Por outro lado, recentemente a aprimoração de algoritmos e a maior disponibilidade de energia computacional tem permitido várias melhorias na técnica e o aumento do número de aplicações (BARTUZI *et al.*, 2017).

As técnicas apresentadas desta seção foram aplicadas concomitantemente neste trabalho a fim de auxiliar na interpretação dos processos que estão envolvidos na interação entre a albumina e os diferentes ligantes e, desta forma, compreender a distinção que existe entre os compostos que se ligam nos determinados sítios da proteína.

3 – Objetivos

Neste trabalho pretendemos estudar e compreender os fenômenos que estão envolvidos na interação de aminoácidos dansilados com os sítios de ligação da HSA. Para isso serão utilizados os seguintes compostos: dansilarginina (DA), dansilisina (DL) e dansilcadaverina (DC) para o sítio I (Figura 5) e dansilprolina (DP), dansilnorleucina (DN), dansilglicina (DG) e dansilserina (DS) para o sítio II (Figura 6).

3.1 – Objetivos específicos

- Compreender as alterações na fluorescência dos aminoácidos dansilados quando ligados a HSA.
- Verificar as diferentes afinidades entre os dansilados com o sítio I ou sítio II da HSA utilizando a fluorescência, dicroísmo circular, calorimetria de titulação isotérmica e *docking* molecular.
- Aplicar os aminoácidos dansilados em estudos de competição com fármacos específicos para o sítio I ou sítio II da HSA utilizando as técnicas de fluorescência e dicroísmo circular.
- Determinar os parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre os aminoácidos dansilados e a HSA utilizando a calorimetria de titulação isotérmica.
- Estudar a interação de ligantes com diferentes hidrofobicidades com a HSA.
- Verificar a afinidade entre a HSA e uma nova sonda dansilada de sítio I que possui ausência de carga sobre a sua cadeia lateral.
- Estudar a interação entre os aminoácidos dansilados e a HSA utilizando a técnica de *docking* molecular.
- Verificar se a diferença de hidrofobicidade de uma sonda pode afetar a sua afinidade com a albumina sérica bovina (BSA).

Figura 5 - Estrutura dos aminoácidos dansilados que possuem preferência em se ligar ao sítio I da HSA.

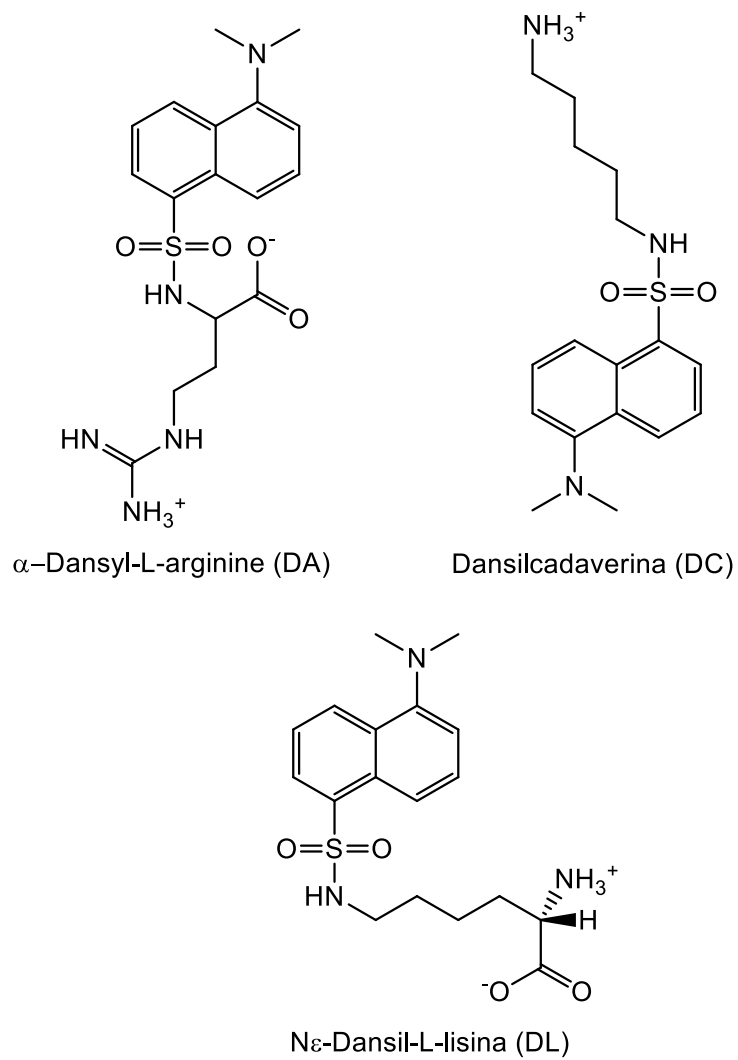
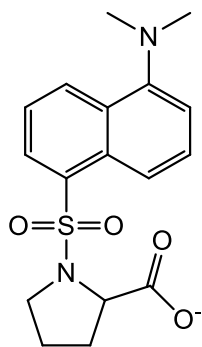
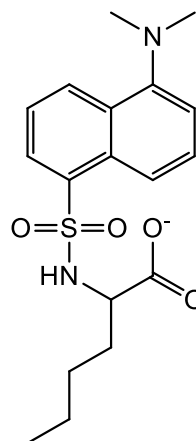


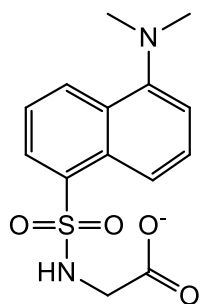
Figura 6 - Estrutura dos aminoácidos dansilados que possuem preferência em se ligar ao sítio II da HSA.



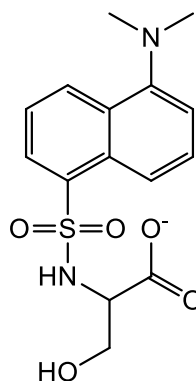
Dansyl-L-proline (DP)



Dansil-DL-norleucina (DN)



Dansilglicina (DG)



N-Dansil-L-serina (DS)

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Materiais

4.1.1 – Reagentes

Os reagentes albumina do soro humano livre de ácidos graxos, N ϵ -dansil-L-lisina, dansilcadaverina, hidrocloreto de α -dansil-L-arginina, 5-(dimetilamino)-1-naftalenosulfonamida, dansilglicina, sal ciclo-hexamônio de dansil-DL-norleucina, sal ciclohexilamonio de N-dansil-L-serina, dansil-L-glutamina, ibuprofeno, fenilbutazona, biliverdina, varfarina, naproxeno, ácido gálico, galato de octila, ácido ascórbico, palmitato de ascorbila, fosfato dibásico de sódio, fosfato monobásico de sódio 99%, sulfato de quinina, ácido 4- (2-hidroxi-*etil*) piperazina-1- ácido etanossulfônico (HEPES) e sal para o preparo de solução salina tamponada com fosfato (PBS) foram obtidos da Sigma-Aldrich. A dansil-L-prolina foi obtida da Santa Cruz Biotecnology.

4.1.2 – Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: medidor de pH (Analyser modelo 300 Digital - São Paulo, Brasil); balança analítica AG245 (Mettler Toledo, Ohio, EUA); refratometro ABBE 2WAJ (Biobrix); espectrofotômetro UV-Vis Lambda 35 (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA); espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Shelton, CT, USA), espectropolarímetro Jasco, J-815 (Jasco, Japão); espectrômetro de tempo de vida de fluorescência mini- τ (Edinburgh instruments, Livingston Escócia) e Nano-ITC, TA – instruments (New Castle, DE, EUA).

4.1.3 – Preparo das soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e foram utilizados tal como fornecidos, sem purificação adicional. A água foi duplamente deionizada utilizando um sistema de osmose reversa (Quimis Aparelhos Científicos, São Paulo, Brasil) e um sistema de purificação Milli-Q (Simplicity Millipore, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

4.1.3.1 – Solução fisiológica salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline, PBS*)

Para o preparo de 200 mL de solução fisiológica salina tamponada com fosfato, um comprimido foi dissolvido em 200 mL de água produzindo uma solução tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹, cloreto de potássio 0,0027 mol L⁻¹ e cloreto de sódio 0,137 mol L⁻¹, pH 7,4. A aferição do pH foi realizada utilizando um medidor de pH. A solução foi mantida na geladeira.

4.1.3.2 – Tampão Fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0

Para o preparo da solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ em pH 7,0 foram preparadas soluções de fosfato dibásico de sódio 0,05 mol L⁻¹ e de fosfato monobásico de sódio 0,05 mol L⁻¹. Em um béquer foram adicionados 250 mL da solução de fosfato monobásico de sódio 0,05 mol L⁻¹. O ajuste do pH foi realizado com a adição de cerca de 320 mL da solução de fosfato dibásico de sódio 0,05 mol L⁻¹.

4.1.3.3 – Tampão HEPES 0,01 mol L⁻¹, pH 7,0

Para o preparo de 50 mL de solução tampão HEPES 0,01 mol L⁻¹, pH 7,0 foram pesados 0,1192 g de HEPES e diluído em água deionizada. Após o ajuste do pH, o volume foi completado para 50 mL.

4.1.3.4 – Albumina do soro humano (HSA) 0,001 mol L⁻¹

Para o preparo de 250 µL de solução de HSA 0,001 mol L⁻¹ foram pesados 0,01663 g de HSA e diluído em solução tampão PBS. A solução foi mantida na geladeira.

4.1.3.5 – Albumina do soro bovino (BSA) 0,001 mol L⁻¹

Para o preparo de 250 µL de solução de BSA 0,001 mol L⁻¹ foram pesados 0,01663 g de BSA e diluído em solução tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH=7,0. A solução foi mantida na geladeira.

4.1.3.6 – *N ϵ -dansil-L-lisina (DL) 0,01 mol L⁻¹*

Para o preparo de 1 mL de solução de DL 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,00379 g de DL e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias em solução tampão PBS, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.7 – *Dansilcadaverina (DC) 0,01 mol L⁻¹*

Para o preparo de 1 mL de solução de DC 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,00335 g de DC e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias em solução tampão PBS, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.8 – *Hidrocloreto de α -dansil-L-arginina (DA) 0,01 mol L⁻¹*

Para o preparo de 1 mL de solução de DA 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,00444 g de DA e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias em solução tampão PBS, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.9 – *Dansilglicina (DG) 0,01 mol L⁻¹*

Para o preparo de 1 mL de solução de DG 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,00383 g de DG e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias em solução tampão PBS, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.10 – *Sal ciclohexamônio de dansil-DL-norleucina (DN) 0,01 mol L⁻¹*

Para o preparo de 1 mL de solução de DN 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,00464 g de DN e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias em solução tampão PBS, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.11 – Sal ciclohexilamônio de *N*-dansil-*L*-serina (DS) 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo de 1 mL de solução de DS 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,00437 g de DS e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias em solução tampão PBS, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.12 – Dansil-*L*-prolina (DP) 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo de 1 mL de solução de DP 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,00348 g de DP e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias em solução tampão PBS, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.13 – Dansil-*L*-glutamina (DGlu) 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo de 1 mL de solução de DGlu 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,00379 g de DGlu e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias em solução tampão PBS, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.14 – Ácido Gálico (G0) 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo de 1 mL de solução de ácido gálico 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,0017 g de ácido gálico e diluído em etanol. A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias em solução tampão, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.15 – Galato de octila (G8) 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo de 1 mL de solução de galato de octila 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,0028 g de galato de octila e diluído em etanol. A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias em solução tampão, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.16 – Ácido ascórbico 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo de 1 mL de solução de ácido ascórbico 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,0017 g de ácido ascórbico e diluído em etanol. A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias em solução tampão PBS, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.17 – Palmitato de ascorbila 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo de 1 mL de solução de ácido ascórbico 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,0041 g de palmitato de ascorbila e diluído em etanol. A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias em solução tampão PBS, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.18 – Sulfato de quinina 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo de 1 mL de solução de sulfato de quinina 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,00391 g de sulfato de quinina e diluído em ácido sulfúrico 0,05 mol L⁻¹. A solução foi mantida na geladeira.

4.1.3.19 – Varfarina (VAR) 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo da solução estoque de varfarina 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,0031 g de varfarina e diluído em 1 mL de etanol. A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.20 – Ibuprofeno (IBU) 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo da solução estoque de ibuprofeno 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,0021g de ibuprofeno e diluído em 1 mL de etanol. A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.21 – Fenilbutazona (FBZ) 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo da solução estoque de fenilbutazona 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,0031 g de fenilbutazona e diluído em 1 mL de etanol. A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.22 – Naproxeno (NPX) 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo da solução estoque de naproxeno 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,0023 g de naproxeno e diluído em 1 mL de etanol. A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.1.3.23 – Biliverdina (BLV) 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo da solução estoque de biliverdina 0,01 mol L⁻¹ foram pesados 0,0062 g de hidrocloreto de biliverdina e diluído em 1 mL de etanol. A partir desta solução fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada todos os dias.

4.2 – Métodos

4.2.1 – Determinação do espectro de fluorescência dos aminoácidos dansilados em solução tampão PBS, álcool etílico ou HSA.

Os espectros de fluorescência dos aminoácidos dansilados foram obtidos utilizando o espectrofluorímetro, utilizando o comprimento de excitação em 340 nm e o comprimento de emissão de 400 – 600 nm. A fotomultiplicadora foi ajustada em 800 V, as aberturas de fenda em 10 nm, velocidade de varredura em 200 nm/min e um filtro em 390 nm. Os espectros foram obtidos para os dansilados 2,5 µmol L⁻¹ em solução tampão PBS, álcool etílico ou HSA 30 µmol L⁻¹.

4.2.2 – Determinação do rendimento quântico de fluorescência dos aminoácidos dansilados em solução tampão PBS, álcool etílico ou HSA.

Os espectros de fluorescência obtidos na seção anterior (seção 4.2.1) foram utilizados para o cálculo do rendimento quântico de fluorescência das sondas dansiladas. Além disso, foi obtido o espectro de fluorescência para a quinina $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ utilizada como padrão (BROUWER, 2011). Para o cálculo do rendimento quântico, determinamos o valor da absorbância das sondas dansiladas e quinina em 340 nm e o índice de refração para todas as soluções.

O valor do rendimento quântico (ϕ) foi calculado utilizando a Equação 1.

$$\phi_i = \frac{F_i \cdot f_q \cdot n_i^2}{F_q \cdot f_i \cdot n_q^2} \times 0,546 \quad (1)$$

Na Equação 1, o rendimento quântico de uma amostra (ϕ_i) é determinado a partir da área do espectro de fluorescência da amostra (F_i), da área do espectro de fluorescência da quinina (F_q), do fator de absorção da amostra (f_i) e da quinina (f_q) que foram calculados considerando que $f_x = 1 - 10^{Ax}$ (a fração da luz que incide na amostra que é absorvida), em que A é a absorbância da amostra no comprimento de onda semelhante ao comprimento de onda de excitação na fluorescência. Além disso são considerados os índices de refração da amostra (n_i) e da quinina (n_q). O valor de 0,546 encontrado na Equação 1 representa o valor do rendimento quântico da quinina em uma solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

4.2.3 – Tempo de vida de fluorescência para os aminoácidos dansilados

As medidas de tempo de vida de fluorescência foram realizadas a partir do espectrômetro Mini-tau acoplado ao sistema Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) (Edinburgh Instruments, Livingston, UK). Os experimentos foram efetuados utilizando os aminoácidos dansilados na concentração fixa de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em álcool etílico ou na presença de HSA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS. A excitação foi realizada a partir de um pulso de pico-segundo de um LED 340 nm e a emissão utilizando um filtro de interferência $375 \pm 25 \text{ nm}$. Os perfis de decaimento foram analisados a partir da equação multi-exponencial (método *tail fitting*, Equação 2). As qualidades das regressões foram analisadas considerando os valores de χ^2 , e os valores dos resíduos e da média do tempo de vida $\langle\tau\rangle$ foram calculados utilizando a Equação 3. Nesta equação τ_i é o tempo de vida de

cada componente e f_i é a contribuição de cada componente para o tempo de vida total de fluorescência (LAKOWICZ, 2006).

$$I_T = \sum_{i=1}^n f_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2)$$

$$\langle \tau \rangle = \sum_{i=1}^n f_i \tau_i \quad (3)$$

4.2.4 – Espectros de fluorescência a partir da adição de HSA: determinação da constante de associação (K_a).

Os espectros de fluorescência a partir da adição de HSA foram obtidos utilizando o espectrofluorímetro, a partir do comprimento de excitação em 340 nm e do comprimento de emissão de 400 – 600 nm. A fotomultiplicadora foi ajustada em 700 V, as aberturas de fenda em 10 nm, velocidade de varredura em 100 nm/min e um filtro em 390 nm. Em cada ensaio, foi adicionado HSA em intervalos de 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto a concentração dos dansilados foi fixada em 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os espectros de fluorescência obtidos foram utilizados para o cálculo da constante de dissociação (K_a).

4.2.5 – Espectros de fluorescência a partir da adição dos aminoácidos dansilados: determinação da constante de associação (K_a).

Os espectros de fluorescência a partir da adição dos aminoácidos dansilados foram obtidos utilizando o espectrofluorímetro, a partir do comprimento de excitação em 340 nm e do comprimento de emissão de 400 – 600 nm. A fotomultiplicadora foi ajustada em 700 V, as aberturas de fenda em 10 nm, velocidade de varredura em 100 nm/min, e um filtro em 390 nm. Em cada ensaio, foram adicionadas as sondas dansiladas em intervalos de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto a concentração de HSA foi fixada em 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, foram obtidos os espectros de fluorescência para os aminoácidos dansilados na ausência de proteína, para que eles fossem “descontados” e verificado somente o aumento de fluorescência relativo ao complexo dansilados-HSA. Esses valores foram utilizados para o cálculo da constante de associação (K_a) considerando que $1/K_d = K_a$, em que K_d é a constante de dissociação.

4.2.6 – Espectros de supressão de fluorescência a partir da adição dos aminoácidos dansilados: Determinação da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e da constante de associação (K_a).

Os espectros de supressão de fluorescência da HSA a partir da adição dos aminoácidos dansilados foram obtidos utilizando o espectrofluorímetro, utilizando o comprimento de excitação em 295 nm e o comprimento de emissão de 310 – 410 nm. A fotomultiplicadora foi ajustada em 700, as aberturas de fenda em 10 nm e velocidade de varredura em 100 nm/min. Em cada ensaio, foram adicionadas as sondas dansiladas em intervalos de 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto a concentração de HSA foi fixada em 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os valores das fluorescências foram corrigidos devido ao efeito do filtro interno, utilizando a Equação 4, em que F_{corr} corresponde a fluorescência corrigida, F_{obs} a fluorescência observada, A_{ex} a absorvância no comprimento de onda de excitação da fluorescência e A_{em} a absorvância no comprimento de onda de emissão de fluorescência. Para que o valor de F_{corr} fosse obtido, determinou-se os valores da absorvância em 295 nm e em 340 nm (LAKOWICZ, 2006).

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times 10^{\frac{(A_{\text{ex}} - A_{\text{em}})}{2}} \quad (4)$$

Os espectros de supressão de fluorescência de cada sonda dansilada foram utilizados para calcular a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) a partir da Equação 5, em que F_0 é a fluorescência na ausência do supressor, F é a fluorescência após a adição do supressor, $[Q]$ é a concentração do supressor, k_q é a constante bimolecular e τ_0 é tempo de vida médio do triptofano na albumina.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \times [Q] = 1 + k_q + \tau_0 \times [Q] \quad (5)$$

Os espectros de supressão de fluorescência também foram utilizados para o cálculo de K_a , lembrando que K_a é numericamente igual ao inverso de K_d .

4.2.7 – Aplicação da metodologia de Job's plot para a determinação da estequiometria do complexo dansilados-HSA

A metodologia de Job's plot foi utilizada para a determinação da estequiometria envolvida entre as sondas dansiladas e a HSA. Foram preparadas diferentes soluções de DP na presença de HSA, sendo que a soma das concentrações molares das soluções não variou, mas a fração molar de DP foi variada. Essas soluções foram utilizadas na determinação do valor de fluorescência utilizando o espectrofluorímetro, com excitação em 340 nm e emissão em 485 nm. A fotomultiplicadora foi ajustada em 900 V, as aberturas de fenda em 10 nm, além de um

filtro em de corte em 390 nm. Com os resultados obteve-se um gráfico de fração molar de DP em função da fluorescência. Duas retas foram traçadas envolvendo os pontos e onde elas se interceptam é feito uma projeção até o eixo x. Este valor de x é relativo à fração molar de DP e é utilizado para o cálculo da estequiometria.

4.2.8 – Estudo do sítio de ligação dos aminoácidos dansilados utilizando o experimento de deslocamento a partir de adição de ligantes conhecidos.

O ensaio de deslocamento utilizando ligantes específicos para os sítios I e II da HSA foram realizados para todos os aminoácidos dansilados. Neste caso, realizamos medidas de fluorescência a partir do espectrofluorímetro, com excitação em 340 nm e emissão 400-600 nm, dos dansilados $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, após a adição de HSA $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e depois com a adição de fenilbutazona (FBZ) ou ibuprofeno (IBU) $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para a construção do gráfico de porcentagem de deslocamento foram utilizados os valores de fluorescência em 485 nm.

4.2.9 – Elucidação do sítio de ligação a partir do deslocamento da varfarina no sítio de ligação da HSA.

A determinação do local de ligação para a DL e a DP foi analisada utilizando o espectrofluorímetro utilizando o comprimento de excitação em 310 nm e o comprimento de emissão de 330 – 450 nm. A fotomultiplicadora foi ajustada em 800 e as aberturas de fenda em 10 nm. O ensaio foi constituído de uma solução de HSA $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, de varfarina $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e da adição de DL, DP, fenilbutazona ou ibuprofeno até a concentração final de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$.

4.2.10 – Interação entre os aminoácidos dansilados e a HSA utilizando dicroísmo circular.

Os espectros de dicroísmo circular foram adquiridos na faixa de 250 – 450 nm para a HSA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, para as sondas dansiladas $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e para a solução formada pela HSA e os aminoácidos dansilados, utilizando o espectropolarímetro em atmosfera de nitrogênio. Também foram obtidos espectros de dicroísmo circular na faixa de 200 – 250 nm para observar a estrutura secundária da proteína. Neste último caso, a concentração de HSA foi $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e dos aminoácidos dansilados $3 \mu\text{mol L}^{-1}$.

4.2.11 – Elucidação do local de ligação de ligação utilizando o dicroísmo circular.

Esta metodologia foi realizada para o DP, DN, DG e DS utilizando o dicroísmo circular a partir do espectro obtido no intervalo de 250 – 450 nm. O ensaio foi constituído de uma solução de HSA 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, dos dansilados 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e da adição de varfarina ou naproxeno até a concentração final de 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Em outro ensaio, em uma solução constituída de HSA 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a biliverdina 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram adicionados DA ou DP até a concentração final de 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$. E em uma outra alternativa, em uma solução de HSA 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e fenilbutazona 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram adicionados DA, DGlu ou DP até a concentração final de 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.2.12 – Anisotropia na fluorescência para os aminoácidos dansilados.

Na determinação da anisotropia foi utilizado o espectrofluorímetro com o comprimento de excitação em 340 nm e o comprimento de emissão em 550 nm quando apenas as sondas dansiladas estavam em solução ou em 485 nm quando as sondas dansiladas estavam complexadas com a HSA. A fotomultiplicadora foi ajustada em 700 V e as aberturas de fenda em 10 nm. A concentração dos aminoácidos dansilados foi de 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a concentração de HSA foi de 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (condição não saturante) ou 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (condição saturante).

4.2.13 – Interação entre os aminoácidos dansilados e a HSA utilizando calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

A interação entre os aminoácidos dansilados e a HSA foi estudada por calorimetria de titulação isotérmica utilizando o Nano ITC, *TA instruments* em 20°C. A solução tampão, utilizada para preparar as amostras, foi desgaseificada para remover bolhas de ar. A célula de referência foi preenchida com solução tampão PBS e a célula da amostra foi preenchida com a solução de HSA 0,1 mmol L⁻¹. Foram realizadas 25 injeções sucessivas de 10 μL dos aminoácidos dansilados. Os dados coletados foram analisados no *software Nanoanalyze* sendo que a análise em branco responsável apenas pelo calor de diluição das soluções foi descontada do calor obtido na reação. Por meio do *software* foi possível a partir da regressão não-linear utilizando o modo independente obter os valores da constante de associação (K_a), estequiometria (n) e a variação de entalpia (ΔH°). A variação de entropia (ΔS°) e a variação da energia livre de Gibbs (ΔG°) podem ser calculadas utilizando Equação 6 e Equação 7.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (6)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (7)$$

4.2.14 – Aplicação da técnica de transferência de energia ressonante de fluorescência (FRET) para os aminoácidos dansilados em associação com a HSA.

A determinação da distância entre o resíduo de triptofano e as sondas dansiladas (r) foi realizada por meio de FRET, utilizando o espectrofluorímetro a partir do comprimento de excitação em 285 nm e do comprimento de emissão de 310 – 450 nm. A fotomultiplicadora foi ajustada em 800 e as aberturas de fenda em 10 nm. Os espectros de fluorescência foram obtidos para a HSA 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (F_0) e para a HSA na presença dos dansilados 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (F). Também foram obtidos os espectros de absorvância para os aminoácidos dansilados 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na faixa de 310 – 600 nm. Os valores de intensidade de absorvância foram convertidos em valores de ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). O espectro de fluorescência foi normalizado de forma que possuísse a mesma altura que o espectro de absorvância. Utilizando Equação 8 e Equação 9 foi possível determinar a área de sobreposição entre os espectros de absorção e de fluorescência (J), a distância de Forster (R_0), a eficiência da transferência de energia (E) e a distância entre o doador e o aceitador (r).

$$R_0 = 0,211 \times (K^2 \times n^{-4} \times Q_D \times J)^{1/6} \quad (8)$$

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (9)$$

Na Equação 8, K^2 é fator que descreve a orientação relativa no espaço dos dipolos de transição do doador e do aceitador e é numericamente igual a $2/3$, n é o índice de refração e equivale a 1,33, Q_D é o rendimento quântico de fluorescência do doador que é numericamente igual a 0,13.

4.2.15 – Estudos de *docking* molecular para os aminoácidos dansilados associados a HSA

A interação entre a HSA e os aminoácidos dansilados foi estudada a partir da *docking* molecular utilizando o *Autodock 4.0* (MORRIS *et al.*, 2009). A estrutura cristalina da HSA (PDB ID: 1ao6, 2,5 Å) (SUGIO *et al.*, 1999) foi obtida no *Protein Data Bank* em arquivo

PDB. As estruturas dos aminoácidos dansilados foram confeccionadas utilizando o *GaussView 5.0* (DENNINGTON; KEITH; MILLAM, 2008).

Antes de realizar a *docking* molecular, moléculas de água foram removidas da estrutura da HSA utilizando o *Discovery Studio 2019 (D.S. 2019)* (BIOVIA, 2018). A adição dos átomos de hidrogênio polar na HSA, assim como, as torções permitidas para cada dansilado, foram realizadas utilizando as ferramentas do *Autodock 4.0* (MORRIS *et al.*, 2009).

As regiões relativas ao sítio I e ao sítio II foram estudadas separadamente. Além disso, os estudos de *docking* molecular foram realizados na entrada do sítio I, a fim de verificar a influência dos resíduos dos aminoácidos polares, disponíveis neste sítio, na interação com os dansilados. O espaçamento dos mapas de rede (*grid spacing*) foi de 0,375 Å, centrado em 35,152 (x), 36,375 (y) e 30,277 (z) para o sítio I, 31,668 (x), 36,879 (y) e 30,277 (z) para a entrada do sítio I e 13,73 (x), 26,0 (y) e 19,0 (z) para o sítio II. O tamanho dessas regiões (*box sizes*) nas direções x, y e z foram 36, 40 e 40 pontos para o sítio I, 24, 40 e 36 pontos para a entrada do sítio I, e 40, 40 e 40 pontos para o sítio II, respectivamente.

Os parâmetros utilizados durante a *docking* molecular foram: algoritmo genérico Lamarckiano (Lamarckian Genetic Algorithm, LGA), com tamanho da população de 150. Os demais parâmetros não foram alterados. Durante os estudos de *docking* molecular a estrutura da proteína é mantida fixa, enquanto as estruturas dos dansilados são flexíveis. Com resultados foram obtidos para cada análise de *docking* molecular apresentando diferentes conformações. Cada conformação foi analisada utilizando o *Discovery Studio 2019 (D.S. 2019)* (BIOVIA, 2018) e as interações entre ligante-proteína foram determinadas a partir do LigPlot + v. 1.4.5 (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 2009).

Análise computacional realizada em parceria com o prof. Sergey:

A estrutura de DA complexada com HSA foi obtida do PDB (PDB ID: 2xvw, 2,65 Å) (RYAN *et al.*, 2011). Os complexos com DL, DGlu, DP, DG e DN ligados ao sítio I foram obtidos com base nesta estrutura. Para isso, foi utilizado o programa *Leap* do AMBER 16 (CASE *et al.*, 2016). Da mesma forma, os complexos da HSA com DA, DL, DGlu, DP, DG e DN ligados ao sítio II foram obtidos utilizando a estrutura de raio-X de dansil-fenilalanina (DPhe) ligada a HSA do PDB (PDB ID: 2xw0, 2,40 Å) (RYAN *et al.*, 2011). Nesta estrutura há uma segunda conformação de DPhe, em que o dansilado está ligado ao sítio I, mas em comparação com os outros complexos dos aminoácidos dansilados polares, a posição da

ligação é diferente: o grupo dansil e as porções de aminoácidos estão trocados no espaço. Para todos os aminoácidos dansilados hidrofóbicos, também foram modelados complexos de HSA com esta posição de ligação. Essa ligação é abreviada como sítio I'. Essas estruturas modeladas e de raio-X dos aminoácidos dansilados com a HSA (15 sistemas no total) foram utilizadas como estruturas iniciais para simulações de dinâmica molecular e análises posteriores.

As simulações de dinâmica molecular (MD) foram realizadas em AMBER16 (CASE *et al.*, 2016) e FF14SB (HORNAK *et al.*, 2006) para a proteína e o campo de força GAFF (WANG, JUNMEI *et al.*, 2004) para o grupo dansil, respectivamente. As cargas atômicas parciais do grupo dansil compatíveis com os campos de força AMBER foram obtidas pelo procedimento RESP (BAYLY *et al.*, 1993). Para isso, o grupo NH₂ foi adicionado ao grupo dansil, a molécula obtida foi otimizada por B3LYP (6-31G*) em Gaussian 09 (FRISCH *et al.*, 2016). Então, quando conectado ao aminoácido covalentemente, a carga parcial no átomo de nitrogênio foi ajustada de modo que a carga líquida do aminoácido dansilado fosse inteira. DA, DL, DGlu, DP, DG e DN foram parametrizados. Para o resíduo DN, os parâmetros compatíveis com AMBER foram obtidos na literatura (KHOURY *et al.*, 2014). Foram utilizadas condições de contorno periódicas em uma caixa TIP3P de octaedro truncado a 8 Å de distância do soluto à borda da caixa. Na⁺ foram utilizados como contra-íons. Duas etapas de minimização de energia foram realizadas: primeiro 500 descidas mais íngremes e depois 1000 ciclos de gradiente conjugado com restrições harmônicas de 10 kcal/mol/Å² no soluto e equilibrado por 100 ps a 300 K e 10⁵ Pa em conjunto isotérmico isobárico (NTP). Finalmente, uma produção de MD 20 ns foi realizada no mesmo conjunto NTP com algoritmo SHAKE, etapa de integração de tempo de 2 fs, corte de 8 Å para interações não ligadas e o método *Particle Mesh Ewald* para tratar a eletrostática. As trajetórias foram analisadas pelo módulo do AMBER Tools 17 (CASE *et al.*, 2016).

Os cálculos de energia livre de ligação e decomposição de energia por resíduo foram realizados usando as trajetórias MD obtidas de complexos de proteínas com aminoácidos dansilados pelo método *Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area* (MM-GBSA) com igb=2 (ONUFRIEV; BASHFORD; CASE, 2004). Os valores de energia obtidos contêm a entalpia explícita e a entropia do solvente implícita, portanto, devem ser interpretados.

As simulações de *Umbrella Sampling* (US) (TORRIE; VALLEAU, 1977) foram realizadas para DA no sítio I e DP no sítio II. Foram utilizadas as mesmas conformações iniciais dos complexos nas execuções convencionais de MD. A coordenada da reação foi

definida como a distância entre os centros de massa dos aminoácidos dansilados e os átomos do esqueleto de His242 e Leu453 para o sítio I e o sítio II, respectivamente. Os valores iniciais das coordenadas de reação foram 9,9 Å e 5,6 Å e aumentados para 40 Å. As restrições harmônicas com a constante de força de 10 kcal/mol/Å² foram impostas na coordenada de reação em 40 janelas com largura de 1 Å cada. Antes da execução de MD de 10 ns, um equilíbrio foi realizado para 100 ps para cada janela. A sobreposição entre as distribuições de probabilidade em janelas adjacentes foi analisada visualmente e usando a análise de erro de *bootstrap*. O método *Weighted Histogram Analysis* (WHAM) (KUMAR *et al.*, 1995) foi realizado no programa WHAM desenvolvido por Grossfield (GROSSFIELD, [S.d.]). O parâmetro de convergência de força de 0,001 kcal/mol/Å e teste de Monte Carlo de 1000 especificando o número de conjuntos de dados falsos para análise de erro de *bootstrap* foram usados.

Os dados computacionais foram analisados e os respectivos gráficos foram elaborados em R (R CORE TEAM, 2013). Estruturas e trajetórias foram analisadas no VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

4.2.16 – Espectros de UV-Vis para o ácido gálico e o galato de octila

Os espectros de UV-Vis para o ácido gálico e o galato de octila foram obtidos utilizando o espectrômetro a partir da variação do comprimento de onda de 200-500 nm.

4.2.17 – Estudos de *quenching* de fluorescência e determinação da constante de associação para o ácido gálico, galato de octila, ácido ascórbico e palmitato de ascorbila.

Os espectros supressão de fluorescência a partir da adição de ácido gálico, galato de octila, ácido ascórbico e palmitato de ascorbila foram obtidos utilizando o espectrofluorímetro, a partir do comprimento de excitação em 295 nm e do comprimento de emissão de 310 – 410 nm. A fotomultiplicadora foi ajustada em 700, as aberturas de fenda em 10 nm e velocidade de varredura em 100 nm/min. Em cada ensaio, foram adicionados os compostos em diferentes intervalos de concentração, enquanto a concentração de proteína foi fixada em 2,5 µmol L⁻¹. Os resultados foram obtidos em diferentes temperaturas. Os dados obtidos também foram utilizados para a determinação da constante de Stern-Volmer (Equação 4) e de associação (Equação 16).

4.2.18 – Tempo de vida de fluorescência para a interação entre a albumina e o G8.

Medidas de tempo de vida de fluorescência foram realizadas utilizando o espectrômetro Mini-tau acoplado ao sistema *Time-Correlated Single Photon Counting* (TCSPC) (Edinburgh Instruments, Livingston, UK). Os experimentos foram realizados utilizando a BSA na concentração fixa de 5 μM em tampão fosfato ou na presença de G8 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS. A excitação foi realizada a partir de um pulso de pico-segundo de um LED 280 nm e a emissão a partir de um filtro de interferência 340 ± 25 nm. Os perfis de decaimento foram analisados a partir da equação multi-exponencial (método *tail fitting*, Equação 2). As qualidades das regressões foram analisadas a partir dos valores de χ^2 e os valores dos resíduos e da média do tempo de vida $\langle\tau\rangle$ foram calculados utilizando a Equação 3. Nesta equação τ_i é o tempo de vida de cada componente e f_i é a contribuição de cada componente para o tempo de vida total de fluorescência (LAKOWICZ, 2006). Os valores de tempo de vida também foram utilizados para o cálculo da constante de Stern-Volmer, K_{SV} , utilizando a Equação 10, em que τ_0 é o tempo de vida na ausência do *quencher*, Q , τ é o tempo de vida em cada adição do *quencher*.

$$\frac{\tau_0}{\tau} = K_{sv} \times Q + 1 \quad (10)$$

4.2.19 – Estudos de calorimetria de titulação isotérmica envolvendo o G8 e a BSA.

A interação entre o G8 e a BSA foi estudada por calorimetria de titulação isotérmica utilizando o Nano ITC, TA instruments em 25°C. A solução tampão utilizada para preparar as amostras foi degaseificada para remover bolhas de ar. A célula de referência foi preenchida com solução tampão fosfato e a célula da amostra foi preenchida com a solução de BSA 0,075 mol L^{-1} . Foram realizadas 25 injeções sucessivas de 10 μL do G8 1,35 mmol L^{-1} . Os dados coletados foram analisados no *software Nanoanalyze* sendo que a análise em branco responsável apenas pelo calor de diluição das soluções foi descontada do calor obtido na reação. Os valores de n , K_a e ΔS° foram obtidos a partir da regressão não linear utilizando o modo independente e realizada diretamente no *software* do equipamento. Os valores de ΔG° e ΔS° foram determinados a partir da Equação 6 e Equação 7.

4.2.20 – Elucidação do local de ligação do G8 na BSA utilizando dicroísmo circular.

Para a determinação do local de ligação do G8 foi aplicada a técnica de dicroísmo circular analisados na região de 250 – 400 nm. A fenilbutazona (FBZ) e a dansilprolina (DP) são ligantes específicos para o sítio I e o II da BSA, respectivamente, e possuem um sinal de dicroísmo circular induzido após a complexação. O ensaio foi realizado utilizando FBZ ou DP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, BSA 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e adições de G8 até a concentração final de 180 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.2.21 – Estudos de *docking* molecular para o G0 e G8 em associação com a BSA

A estrutura da BSA complexada com naproxeno (PDB: 4OR0, resolução: 2.58 Å) foi utilizada nos estudos de *docking* molecular (BUJACZ; ZIELINSKI; SEKULA, 2014). As simulações foram feitas utilizando o *GOLD 5.2 (Genetic Optimization for Ligand Docking)*, um *software* baseado em um algoritmo genético para explorar a conformação espacial de um ligante e em uma função *GoldScore* (JONES *et al.*, 1997; JONES; WILLETT; GLEN, 1995). Estudos feitos independente em cada sítio de ligação para o G0 e G8. Os sítios de ligação I, II, III e VI da BSA foram investigados. As simulações resultaram as dez melhores poses em cada sítio. A estrutura escolhida como melhor resultado foi a que apresentou melhor sobreposição e valor de energia de ligação mais próximo da média total. BSA foi preparada para os estudos de *docking* a partir da adição dos hidrogênios, remoção da água e inibidores co-cristalizados. No sítio I, a cavidade com raio de 6 Å foi localizada no centro da molécula de naproxeno (-3,74; -11,85; -0,17). Para o G0 no sítio II, o raio foi 6 Å da cavidade centrada na molécula de naproxeno deste sítio (-20,58; -9,03; -0,25). No sítio III, a cavidade foi estabelecida em 7 Å para o G0 e 8 Å para o G8 a partir da Arg185 (-0,27; 7,29; 10,75). Para o sítio VI, o raio da cavidade foi de 5 Å para o G0 e 7 Å para o G8 a partir do centro da molécula de naproxeno (-2.46; -18.94; 7.75) presente neste sítio. As interações proteína-ligante foram obtidas pelos *softwares Discovery Studio 2019 (D.S. 2019)* (BIOVIA, 2018) e *LigPlot+ v. 1.4.5* (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 2009).

4.2.22 – Análises gráficas

As análises gráficas foram realizadas utilizando os *softwares GraphPad Prism 7* (version 7.04, GraphPad Software, Inc.) e *OriginPro 2016* (OriginLab Corporation).

5 – Resultados e Discussão

Capítulo 1: Aplicação dos aminoácidos dansilados como sondas para a determinação de sítios de ligação em albumina: estudo das diferentes afinidades entre os dansilados de sítio I e os dansilados de sítio II com a albumina sérica humana

Os aminoácidos dansilados são aplicados como sondas específicas para o sítio I e/ou sítio II da HSA (JIN *et al.*, 2019; MACIĄŻEK-JURCZYK *et al.*, 2020; PATEL, SUNITA; SHARMA; DATTA, 2015; RYAN *et al.*, 2011). Porém uma análise detalhada da literatura mostrou que há diferentes afinidades entre os dansilados de sítio I e os de sítio II com a proteína, e, este fato, contribui para que as sondas de sítio I sejam menos específicas e, por isso, menos utilizadas em ensaios de deslocamento para a determinação do local de ligação de novos compostos na albumina. Desta forma, nesta primeira etapa estudamos a complexação entre os aminoácidos dansilados e HSA aplicando diferentes técnicas, tais como fluorescência no estado estacionário, fluorescência resolvida no tempo, dicroísmo circular e calorimetria de titulação isotérmica.

5.1.1 – Efeito solvatocrômico: determinação do rendimento quântico de fluorescência.

A emissão de fluorescência de um fluoróforo, devido à perda de energia por diferentes processos dinâmicos que acontecem após a absorção, ocorre em comprimentos de onda maiores. Um fluoróforo no estado excitado apresenta um momento de dipolo maior do que no estado fundamental, o que o torna mais susceptível à polaridade do solvente. As moléculas do solvente se reorientam em torno do fluoróforo no estado excitado, diminuindo a energia do estado excitado e, conseqüentemente, deslocando o espectro de emissão para comprimentos de onda maiores. A medida que a polaridade do solvente aumenta, esse efeito, conhecido como solvatocromismo, fica mais evidenciado, e o espectro de emissão desloca para comprimentos de onda ainda maiores (LAKOWICZ, 2006; LOVING; SAINLOS; IMPERIALI, 2010; MARINI *et al.*, 2010). Além disso, a estabilização é ainda maior para moléculas que apresentam o fenômeno de transferência de carga intramolecular (ICT, *intramolecular charge transfer*), causando deslocamentos ainda maiores nos comprimentos de

onda de emissão (LAKOWICZ, 2006). Nem todos os fluoróforos exibem o fenômeno de ICT, pois, para que isso ocorra o composto deve possuir em sua estrutura um grupo eletro-doador e um grupo eletro-aceitador conectados por um sistema conjugado (BHOI *et al.*, 2015; MALLICK; PAL; KONER, 2016; VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2013). Portanto, compostos que possuem ICT são ainda mais sensíveis a polaridade do meio, alterando o comprimento de onda de emissão e a intensidade da fluorescência de acordo com a polaridade do solvente (SINGH, RUPASHREE BALIA *et al.*, 2009).

Os aminoácidos dansilados são utilizados como sondas para a determinação de sítios de ligação na HSA justamente porque quando se ligam a proteína, deslocam o máximo do comprimento de onda de seu espectro de emissão para o azul e aumentam a intensidade da fluorescência (KOIKE *et al.*, 1996; SUDLOW; BIRKETT; WADE, 1975). A Figura 7 mostra os espectros de fluorescência para o DL (Fig. 7A) e para o DP (Fig. 7B). O DL é um dansilado que possui preferência pelo sítio I da HSA, ao passo que, o DP possui preferência pelo sítio II da proteína. Nos dois casos é nítida a diferença do máximo de fluorescência, sendo que ocorre um deslocamento hipsocrômico à medida que a polaridade do microambiente da sonda diminui. Os valores dos comprimentos de onda máximos de fluorescência para todos os aminoácidos dansilados estão listados na Tabela 1 e os espectros de fluorescência são mostrados na Figura A 1 do anexo A.

O aumento da polaridade do meio impulsiona o aumento da taxa de decaimento não radioativa (K_{nr}), tais como a relaxação pelo solvente, ocasionando a emissão de fluorescência em comprimentos de onda maiores e de menor energia (MALLICK; PAL; KONER, 2016; SRIVASTAVA; SHAHID; MISRA, 2011; VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2013). Quando os dansilados estão complexados a HSA, os que possuem preferência pelo sítio I da proteína apresentaram valores de comprimento de onda de emissão máximos maiores dos que os de sítio II, evidenciando a diferença que há entre os dansilados nos diferentes sítios de ligação.

Figura 7 - Espectros de fluorescência dos aminoácidos dansilados obtidos em solução tampão PBS, álcool etílico e HSA 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Sítio I versus Sítio II.

(A) DL (sítio I); (B) DP (sítio II). $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 400\text{-}650 \text{ nm}$.

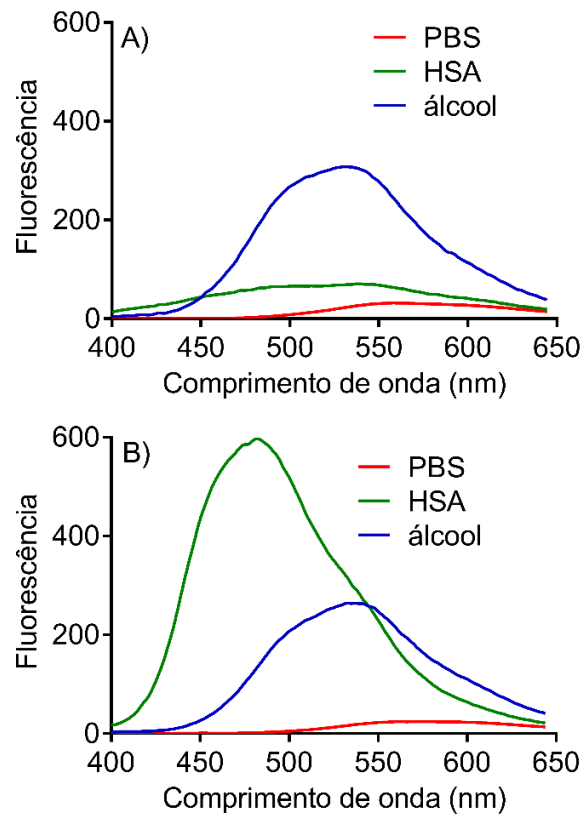


Tabela 1 - Valores máximos de comprimento de onda de emissão em PBS, complexados com a HSA e em álcool etílico.

| | | Comprimento de onda máximo de emissão | | |
|----------|----|---------------------------------------|--------------------|-----------|
| | | Em PBS | Complexado com HSA | Em álcool |
| Sítio I | DL | 558 nm | 538 nm | 530 nm |
| | DA | 555 nm | 533 nm | 532 nm |
| | DC | 567 nm | 541 nm | 530 nm |
| Sítio II | DP | 571 nm | 483 nm | 537 nm |
| | DN | 558 nm | 486 nm | 528 nm |
| | DG | 581 nm | 484 nm | 534 nm |
| | DS | 577 nm | 487 nm | 535 nm |

Além do efeito no deslocamento do espectro de emissão dos dansilados, ao alterar a polaridade do meio, a intensidade de fluorescência também foi modificada (Figura 7). Em um meio mais hidrofóbico, os dansilados apresentaram aumento na intensidade de fluorescência. Em PBS e em álcool etílico, os espectros de fluorescência dos dansilados foram semelhantes, porém ao avaliar o espectro de emissão obtido com a complexação com a HSA, o dansilado de sítio I, DL, apresenta intensidade de fluorescência menor do que o de sítio II, DP. Essas diferenças de intensidade de fluorescência podem ser analisadas a partir do rendimento quântico de fluorescência dos dansilados (Tabela 2).

Tabela 2 – Rendimento quântico para os aminoácidos dansilados de sítio I e II em solução tampão PBS, complexados com HSA e em álcool etílico.

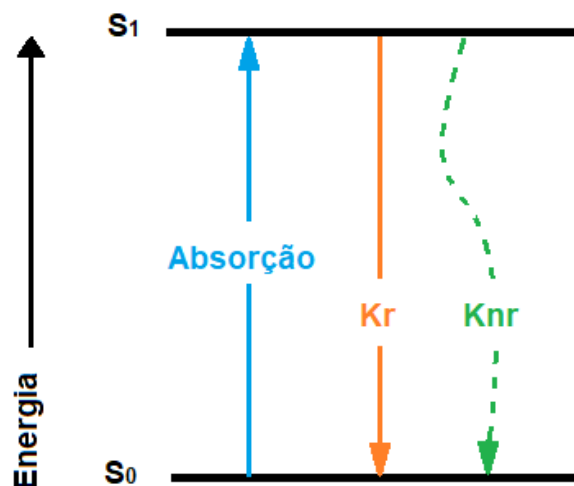
| | | Rendimento quântico | | |
|----------|----|---------------------|----------------------|---------------|
| | | Em PBS | Complexado com HSA | Em álcool |
| Sítio I | DL | 0,028 ± 0,011 | 0,095 ± 0,004 | 0,322 ± 0,009 |
| | DA | 0,037 ± 0,015 | 0,081 ± 0,009 | 0,139 ± 0,001 |
| | DC | 0,043 ± 0,005 | 0,076 ± 0,003 | 0,234 ± 0,001 |
| Sítio II | DP | 0,021 ± 0,009 | 0,415 ± 0,008 | 0,120 ± 0,006 |
| | DN | 0,031 ± 0,012 | 0,356 ± 0,015 | 0,189 ± 0,024 |
| | DG | 0,020 ± 0,008 | 0,480 ± 0,015 | 0,290 ± 0,063 |
| | DS | 0,022 ± 0,009 | 0,106 ± 0,015 | 0,238 ± 0,066 |

O aumento do rendimento quântico de sondas em ambientes hidrofóbicos ocorre, geralmente, devido a diminuição da taxa não-radiativa (K_{nr}). A determinação do rendimento quântico (Φ) está relacionada a K_{nr} e a taxa de decaimento radioativa (K_r) de acordo com a Equação 11. Uma vez que ocorra a absorção, a despopulação do estado excitado poderá ocorrer por meio de K_r ou K_{nr} (LAKOWICZ, 2006), conforme ilustra o diagrama simplificado apresentado na Figura 8.

$$\Phi = \frac{K_r}{K_r + K_{nr}} \quad (11)$$

Figura 8 - Diagrama simplificado mostrando a relação entre a taxa de decaimento radioativa (K_r) e a taxa de decaimento não-radioativa (K_{nr}).

A seta em azul representa o processo de absorção do fóton. Os processos de decaimento estão representados pela seta em laranja (processo radioativo, K_r) e pela seta em verde (processo não-radioativo, K_{nr}).



Existem na literatura diversos estudos que correlacionam fluoróforos, alguns que apresentam o fenômeno ICT, com o aumento do rendimento quântico, além do deslocamento do comprimento de onda máximo do espectro de emissão (BHOI *et al.*, 2015; KOIKE *et al.*, 1996; MALLICK; PAL; KONER, 2016). Por exemplo, em um trabalho utilizando derivados dansilados em ciclo-hexano e em acetonitrila verificou-se que ao aumentar a polaridade do solvente provocou um deslocamento para o vermelho no máximo de emissão (~ 69 nm), devido ao efeito de ICT presente nas moléculas (BHOI *et al.*, 2015). O trabalho de Mallick, Pal e Koner (2016) mostrou que sua sonda DMNDC, que possui o fenômeno de ICT, ao interagir com a cavidade hidrofóbica da albumina sérica bovina (BSA) possui um aumento de dez vezes no rendimento quântico de fluorescência comparado ao meio aquoso, devido à restrição do movimento da molécula, levando a diminuição das taxas de decaimento não-radiativas e provocando o aumento do tempo de vida de fluorescência da sonda. Em outro trabalho, a dansilamida, que também apresenta o fenômeno de ICT, teve o rendimento quântico de fluorescência maior quando complexada com a anidrase carbônica ($\phi = 0,84$) ao compará-la em água ($\phi = 0,06$), além do deslocamento do espectro de fluorescência para o azul (KOIKE *et al.*, 1996).

A diminuição da taxa de decaimento não-radioativa (K_{nr}) é relacionada ao aumento do rendimento quântico, como mencionado anteriormente. Essa diminuição pode ser provocada a

partir da restrição do movimento da sonda (MALLICK; PAL; KONER, 2016). Assim, uma vez que a sonda esteja ligada na cavidade da proteína, ocorrerá a restrição do seu movimento provocando o aumento do rendimento quântico. De fato, o aumento do rendimento quântico foi observado para os aminoácidos dansilados quando complexados ao sítio II da HSA. Porém os aminoácidos dansilados de sítio I não apresentaram o aumento de rendimento quântico semelhante aos de sítio II quando ligados a proteína (Tabela 2). O sítio I é maior e mais flexível do que o sítio II da HSA (GHUMAN *et al.*, 2005; ZHIVKOVA, ZVETANKA D, 2015) e esta característica pode estar relacionada aos valores obtidos para os rendimentos quânticos, uma vez que, a restrição do movimento das sondas deve ser distinta nos dois sítios de ligação.

5.1.2 – Fluorescência resolvida no tempo: estudo da interação dansilados-HSA e determinação da taxa de decaimento radioativa (Kr) e não-radioativa (Knr).

O tempo de vida de fluorescência também é uma importante ferramenta para se investigar o microambiente de um fluoróforo (PATTANAYAK *et al.*, 2017). O tempo de vida é o tempo médio que o fluoróforo gasta no estado excitado antes de retornar para o estado fundamental (LAKOWICZ, 2006). Essa metodologia foi aplicada para os compostos dansilados em álcool etílico ou complexados com HSA a fim de investigar a diferença entre os aminoácidos dansilados que se ligam ao sítio I (DA, DL e DC) e aqueles que se ligam no sítio II (DP, DN e DG) da proteína. HSA foi utilizada em excesso ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$) para garantir que todas as moléculas dos dansilados estejam complexadas com a proteína. Figura 9 compara o tempo de vida entre um composto dansilado de sítio I (DL) e outro de sítio II (DP) em álcool e complexados com HSA. A Tabela 3 apresenta os valores de tempo de vida para todos os compostos dansilados em álcool etílico ou complexados com HSA. O aumento no tempo de vida de fluorescência foi observado para todos os compostos dansilados quando complexados a proteína. Novamente os dansilados de sítio I, DL, DA e DC apresentaram valores menores de tempo de vida quando comparado com os outros compostos dansilados, reforçando a menor interação destes compostos com a proteína. O tempo de vida apresentado para os dansilados é ocasionado por uma contribuição das moléculas livres somadas as moléculas que estão interagindo com a HSA, e, portanto, o valor apresentado para os dansilados de sítio I reflete a menor interação desses compostos com a proteína quando comparado aos dansilados de sítio II.

Figura 9 - Comparação do tempo de vida de fluorescência do DL e DP em álcool etílico e na presença de HSA.

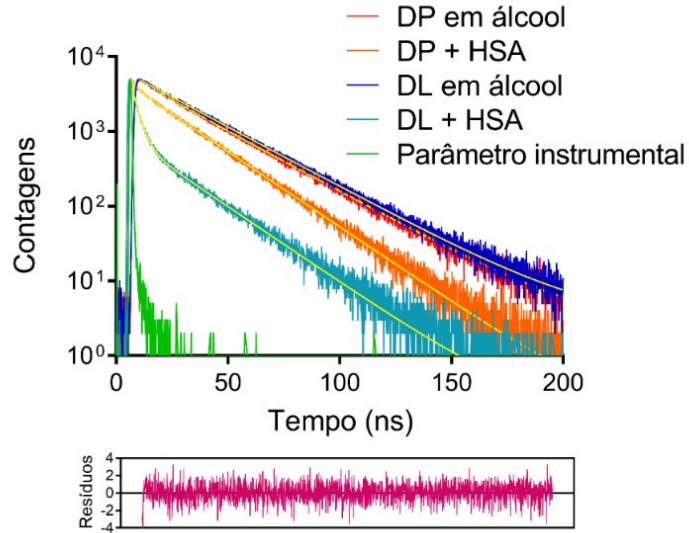


Tabela 3 - Tempo de vida de fluorescência para os aminoácidos dansilados de sítio I e II.

| | | Tempo de vida de fluorescência (τ) | | | | | | | |
|----------|-----|---|----------|----------|-------|-------|-------|----------------------|----------|
| | | Em álcool etílico | | | | | | | |
| | | τ_1 | τ_2 | τ_3 | f_1 | f_2 | f_3 | $\langle\tau\rangle$ | χ^2 |
| Sítio I | DA | 13,9 | - | - | 1,00 | - | - | 13,9 | 1,07 |
| | DL | 13,6 | - | - | 1,00 | - | - | 13,6 | 1,07 |
| | DC | 13,6 | - | - | 1,00 | - | - | 13,6 | 1,06 |
| Sítio II | DP | 5,05 | 13,5 | - | 0,06 | 0,94 | - | 13,1 | 0,99 |
| | DN | 13,9 | - | - | 1,00 | - | - | 13,9 | 1,05 |
| | DG | 13,8 | - | - | 1,00 | - | - | 13,8 | 1,06 |
| | | Complexado com a HSA | | | | | | | |
| | | τ_1 | τ_2 | τ_3 | f_1 | f_2 | f_3 | $\langle\tau\rangle$ | χ^2 |
| | | Sítio I | DA | 3,7 | 21,7 | - | 0,24 | 0,76 | - |
| DL | 3,0 | | 21,8 | - | 0,26 | 0,74 | - | 16,8 | 1,05 |
| DC | 3,1 | | 21,1 | - | 0,41 | 0,59 | - | 13,7 | 0,99 |
| Sítio II | DP | 5,9 | 21,7 | - | 0,03 | 0,97 | - | 21,3 | 1,00 |
| | DN | 5,6 | 22,8 | - | 0,05 | 0,95 | - | 21,9 | 1,04 |
| | DG | 2,3 | 9,5 | 23,5 | 0,03 | 0,03 | 0,94 | 22,4 | 1,09 |

Tanto as alterações no rendimento quântico de fluorescência quando as alterações no tempo de vida de fluorescência são provocadas por mudança na taxa de decaimento radioativa (K_r) e/ou na taxa de decaimento não radioativa (K_{nr}) (LAKOWICZ, 2006). A Tabela 4 apresenta os valores de K_r e K_{nr} para os aminoácidos dansilados em álcool etílico ou complexados com a HSA. Considerando que os resultados de DP e DG apresentaram maior interação quando estão em associação com a HSA, essas sondas ilustram muito bem o comportamento de K_r e K_{nr} e as alterações que são provocadas no rendimento quântico e no tempo de vida de fluorescência. A associação de DP ou DG com a HSA provoca o aumento do rendimento quântico e o aumento do tempo de vida, acompanhado com o aumento de K_r e a diminuição de K_{nr} (Tabela 4). De fato, é bem estabelecido que compostos que apresentam aumento no rendimento quântico quando em associação com proteínas diminuem K_{nr} devido à restrição do movimento provocada pela ligação das sondas com a biomolécula (LAKOWICZ, 2006; MALLICK; PAL; KONER, 2016). A ligação na cavidade da HSA para DP ou DG levou a restrição do movimento dessas sondas o que permitiu a diminuição de K_{nr} e consequentemente o aumento de K_r .

Tabela 4 - Taxa de decaimento radioativa (K_r) e taxa de decaimento não radioativa (K_{nr}) para os aminoácidos dansilados.

| | | Em álcool | | Complexado com HSA | |
|----------|----|---------------------|------------------------|---------------------|------------------------|
| | | K_r (ns^{-1}) | K_{nr} (ns^{-1}) | K_r (ns^{-1}) | K_{nr} (ns^{-1}) |
| Sítio I | DA | 0,010 | 0,062 | 0,005 | 0,052 |
| | DL | 0,024 | 0,049 | 0,006 | 0,053 |
| | DC | 0,017 | 0,056 | 0,006 | 0,067 |
| Sítio II | DP | 0,009 | 0,068 | 0,020 | 0,028 |
| | DN | 0,013 | 0,059 | 0,016 | 0,030 |
| | DG | 0,021 | 0,051 | 0,021 | 0,024 |

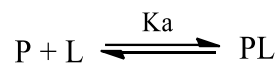
$$K_r = \frac{\Phi}{\tau} \text{ e } K_{nr} = \frac{1-\Phi}{\tau}$$

O aumento do rendimento quântico e do tempo de vida relatado para DP e DG em associação com a HSA também foi observado para outra sonda com características ICT

(DMNDC) em associação com a BSA (albumina sérica bovina), uma proteína estruturalmente semelhante a HSA. Neste trabalho, o rendimento quântico aumentou cerca de dez vezes quando a sonda se complexou a proteína. O autor atribuiu o aumento do rendimento quântico e do tempo de vida à diminuição das taxas de decaimento não-radioativas (MALLICK; PAL; KONER, 2016). Este resultado foi semelhante ao encontrado para os dansilados, uma vez que, foi observado uma diminuição de cerca de duas vezes nos valores de K_{nr} quando DP ou DG estão complexados a proteína.

5.1.3 – Determinação da constante de associação (K_a) a partir do aumento de fluorescência com a adição de HSA.

Os aminoácidos dansilados já são utilizados como sondas fluorescentes para a determinação de sítios de ligação na HSA (DUFOUR; DANGLES, 2005; LIU, XIANGPING *et al.*, 2009; MALISZEWSKA *et al.*, 2016). Quando os dansilados (L) se ligam a proteína (P) ocorre a formação de um complexo, estabelecendo o equilíbrio apresentado na Equação 12 (LAKOWICZ, 2006; ZSILA; BIKÁDI; SIMONYI, 2003).

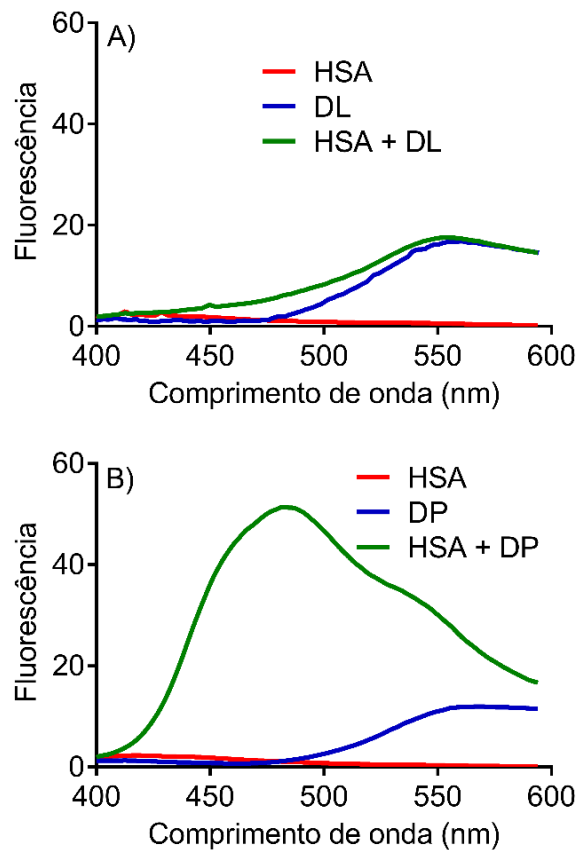


$$K_a = \frac{[PL]}{[P] \cdot [L]}$$

A formação do complexo é acompanhada do aumento da intensidade de fluorescência das sondas e o deslocamento do máximo de emissão para o azul, como discutimos na seção anterior (Figura 10).

Figura 10 - Espectros de fluorescência para a HSA, dansilados e HSA com os dansilados.

(A) DL; (B) DP. HSA $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 310\text{-}600 \text{ nm}$); dansilados $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 400\text{-}600 \text{ nm}$).



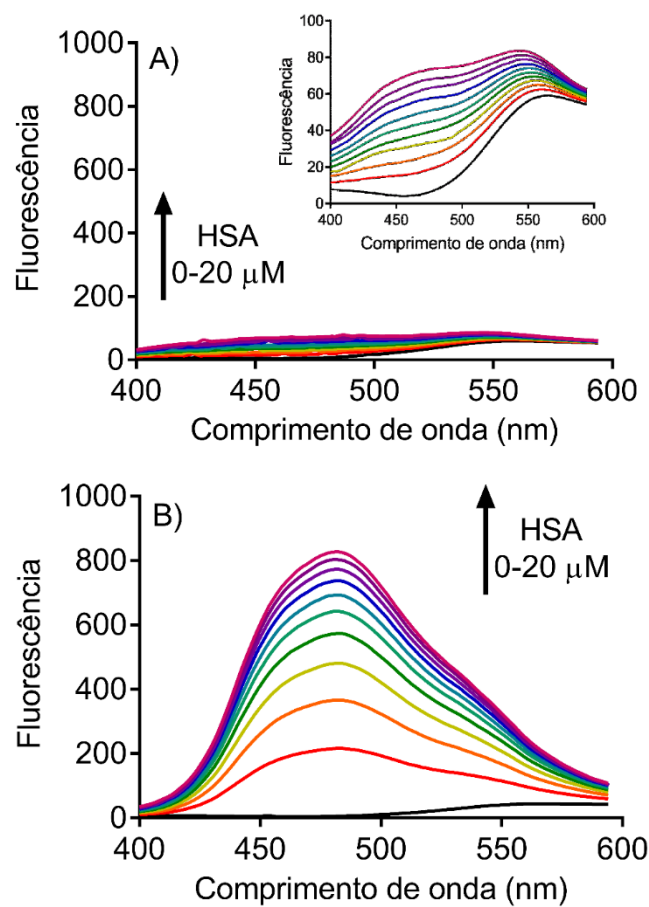
A alteração no espectro de fluorescência das sondas é um indicativo de ligação (MALLICK; PAL; KONER, 2016; SRIVASTAVA; SHAHID; MISRA, 2011). A intensidade do espectro de fluorescência da HSA complexada com os dansilados é proporcional a concentração da proteína, ou seja, ela aumenta à medida que uma concentração maior de proteína é adicionada, até atingir o equilíbrio entre as espécies ligadas e as espécies não ligadas à proteína.

A Figura 11 apresenta o espectro de fluorescência obtido para um dansilado que prefere se ligar ao sítio I da HSA, DL, e para um dansilado que possui a preferência em se ligar ao sítio II da proteína, DP, com adições sucessivas de HSA. O aumento da concentração de HSA provoca o aumento na intensidade do espectro de fluorescência em ambos os casos, reforçando que ocorre a interação entre os dansilados e a proteína. É possível verificar também por meio da Figura 11, que os dansilados apresentaram comportamentos distintos

quando se considera o aumento da intensidade de fluorescência provocado a partir da adição da HSA. Essa distinção entre os dansilados de sítio I e de sítio II foi observada para todos os compostos (não mostrado).

Figura 11 - Espectros de fluorescência com a adição de HSA.

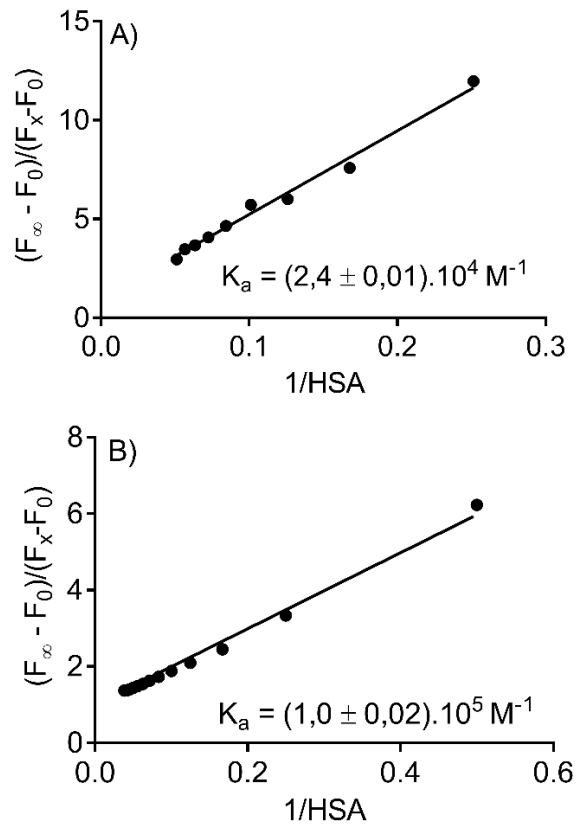
(A) DL e (B) DP. Dansilados $2 \mu\text{mol L}^{-1}$; HSA $0\text{-}20 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 400\text{-}600 \text{ nm}$. *Insert:* zoom da região mostrando com maior detalhe o aumento da intensidade de fluorescência com a adição de HSA.



Essa diferença entre a interação entre os dansilados de sítio I e os de sítio II com a HSA pode ser verificada por meio dos valores da constante de afinidade (K_a). A determinação da K_a utilizando os valores de fluorescência obtidos a partir do aumento de concentração de HSA foi realizada utilizando a Equação 13. A Figura 12 apresenta a regressão linear para um dansilado de sítio I, DL e outro de sítio II, DP, obtidas a partir desta equação, e os valores de

K_a estão listados na Tabela 5. As demais regressões lineares estão apresentadas na Figura A 3 no Anexo A.

Figura 12 - Regressão linear utilizando a Equação 13. (A) DL e (B) DP.



$$\frac{F_\infty - F_0}{F - F_0} = 1 + \frac{1}{K_d} \cdot \frac{1}{L} \quad (13)$$

Na Equação 13, F_0 , F e F_∞ são, respectivamente, a fluorescência na ausência de HSA, a fluorescência em uma concentração intermediária de proteína e a fluorescência na concentração de proteína de completa interação e L é a concentração de HSA (BENESI; HILDEBRAND, 1949).

Tabela 5 - Constantes de associação obtidas pelo experimento de aumento de fluorescência com a adição de HSA.

| | | K_a (x 10^4) mol ⁻¹ L |
|-----------------|-----------|---------------------------------------|
| Sítio I | DL | 2,4 ± 0,01 |
| | DA | 1,3 ± 0,01 |
| | DC | 2,7 ± 0,01 |
| Sítio II | DP | 10 ± 0,02 |
| | DN | 39 ± 0,03 |
| | DG | 8,7 ± 0,01 |
| | DS | 6,1 ± 0,03 |

As constantes de associação mostram que os dansilados que preferem se ligar no sítio I da HSA apresentam valores inferiores quando comparados ao dansilados que se ligam preferencialmente ao sítio II da proteína. Esses valores refletem os resultados observados na Figura 11, em que é possível verificar um aumento expressivo na intensidade de fluorescência da HSA quando presente a sonda de sítio II, diferentemente do observado para o aminoácido dansilado de sítio I, em que ocorre a alteração do comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência para menores valores, mas não se observa o aumento expressivo da intensidade de fluorescência.

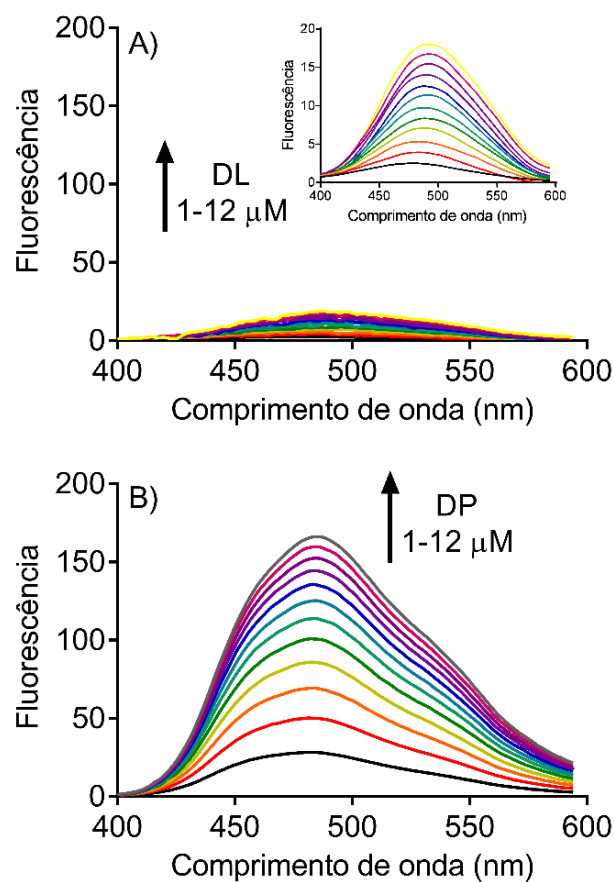
5.1.4 – Determinação da constante de associação (K_a) a partir do aumento da fluorescência com a adição dos aminoácidos dansilados.

A K_a também foi determinada a partir do aumento da concentração dos aminoácidos dansilados, isto porque, de maneira semelhante a adição de HSA, a intensidade de fluorescência do complexo HSA-dansilado é proporcional a concentração das sondas dansiladas, ou seja, a intensidade de fluorescência aumenta com a adição dos dansilados até que o equilíbrio entre as formas ligadas e as não-ligadas seja atingido. A Figura 13 mostra os gráficos obtidos para crescentes adições dos dansilados em uma concentração fixa de HSA. Nesta figura, a alteração de fluorescência provocada apenas pelo aumento da concentração da

sonda foi desconsiderada, ou seja, é possível verificar somente a contribuição na fluorescência do complexo HSA-dansilado.

Figura 13 - Espectros de fluorescência obtidos com o aumento da concentração dos aminoácidos dansilados.

(A) DL; (B) DP. HSA $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, Dansilados $1-12 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 400-650 \text{ nm}$. *Insert:* zoom da região mostrando com maior detalhe o aumento da intensidade de fluorescência com a adição de DL.



Para a determinação de K_a , utilizando os dados obtidos na Figura 13, foi aplicada a Equação 14 que considera o valor da fluorescência na saturação (F_C), ou seja, o máximo de fluorescência que se pode obter adicionando concentrações crescentes dos dansilados. Este valor foi estimado a partir da extrapolação dos valores de fluorescência obtidos no comprimento de onda máximo de emissão. Na equação, P é a concentração de proteína, L é a concentração do ligante (aminoácidos dansilados), F_0 é a fluorescência da proteína sem a

adição do ligante, F é a fluorescência da amostra após cada adição de ligante, F_c é a fluorescência na saturação de ligante (VAN DE WEERT; STELLA, 2011).

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} = \frac{[P] + [L] + K_d - \sqrt{([P] + [L] + K_d)^2 - 4[P][L]}}{2[P]} \quad (14)$$

A Figura A 5 no anexo A apresenta os gráficos obtidos utilizando a Equação 14. Os valores das K_a obtidas a partir da Equação 14 estão listadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Constantes de associação obtidas pelo experimento de aumento de fluorescência com a adição dos aminoácidos dansilados.

| | | K_a (x 10^4) mol ⁻¹ L | R^2 |
|----------|----|---------------------------------------|--------|
| Sítio I | DL | 2,3 ± 0,02 | 0,9950 |
| | DA | 3,5 ± 0,04 | 0,9983 |
| | DC | 2,7 ± 0,02 | 0,9881 |
| Sítio II | DP | 10,6 ± 0,2 | 0,9995 |
| | DN | 16,1 ± 0,1 | 0,9976 |
| | DG | 11,7 ± 0,2 | 0,9994 |
| | DS | 8,0 ± 0,03 | 0,9998 |

Novamente os dansilados de sítio II apresentam maior afinidade com a HSA do que os aminoácidos dansilados de sítio I.

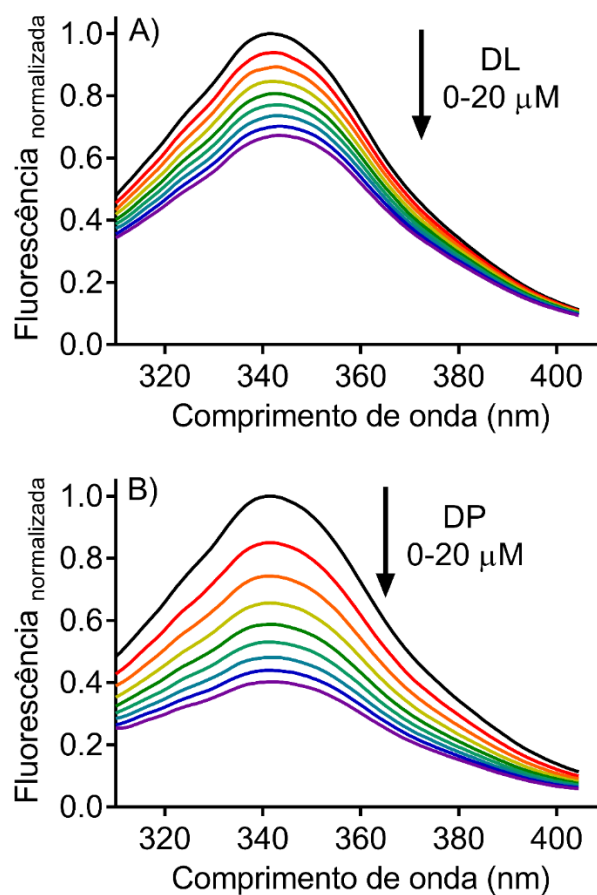
5.1.5 – Determinação da constante de Stern-Volmer (K_{sv}) e da constante de associação (K_a) utilizando a supressão de fluorescência da proteína a partir da adição dos aminoácidos dansilados.

A K_a também foi calculada utilizando os ensaios de *quenching* ou supressão de fluorescência. Diferentes fatores podem causar a perda de intensidade de fluorescência de um composto, ou seja, a supressão da fluorescência. Dentre eles podemos citar reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de um complexo no estado fundamental e colisões durante o estado excitado (ABDOLLAHPOUR et al., 2016;

LAKOWICZ, 2006). A HSA possui fluorescência intrínseca ligada ao seu único resíduo de triptofano. A medida que as sondas se associam a proteína, ela perde a sua fluorescência intrínseca, uma vez que ocorre a formação do complexo no estado fundamental, um fenômeno de supressão de fluorescência (LAKOWICZ, 2006). Assim, os aminoácidos dansilados atuam como supressores ou *quencher* da fluorescência intrínseca da proteína devido a formação de um complexo. A supressão da intensidade de fluorescência da HSA com a adição das sondas pode ser analisada na Figura 14.

Figura 14 - *Quenching* ou supressão de fluorescência da HSA pelos aminoácidos dansilados.

(A) DL; (B) DP. HSA $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e dansilados $0-20 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 310-410 \text{ nm}$.



A constante de Stern-Volmer (K_{SV}) é utilizada em estudos de supressão de fluorescência para a determinação do tipo de *quenching* que está envolvido entre o fluoróforo e o *quencher* e, além disso, indica a sensibilidade do fluoróforo ao supressor (LAKOWICZ, 2006). K_{SV} é outro indicativo da interação entre os dansilados e a HSA, ou seja, por meio dos

dados de supressão de fluorescência é possível obter K_{SV} e K_a que correlacionam a afinidade da ligação entre os aminoácidos dansilados e a HSA.

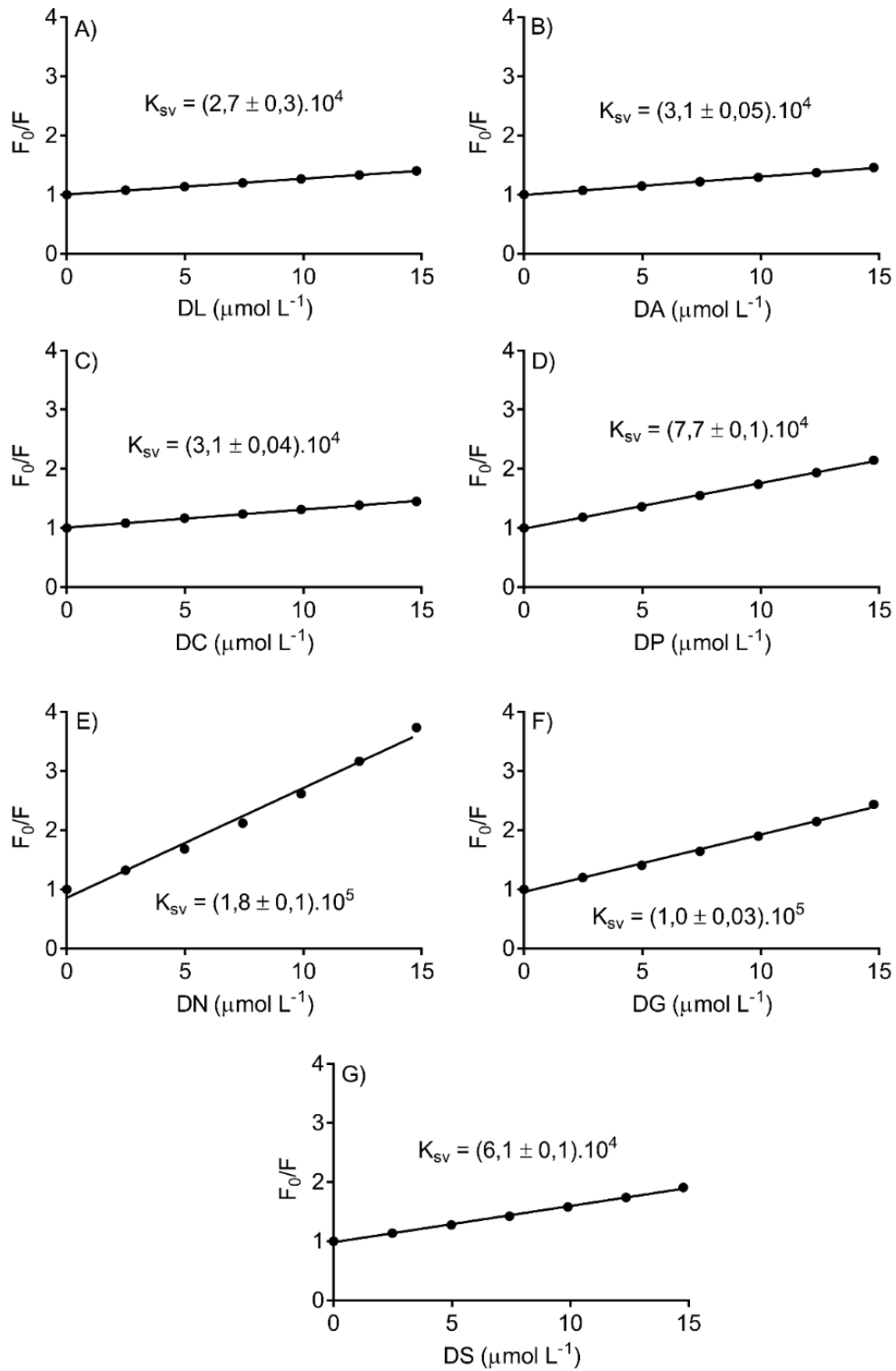
A Figura 15 apresenta os gráficos de Stern-Volmer para os dansilados em associação com a HSA. A determinação da K_{SV} é realizada considerando a Equação 5 apresentada na seção 4.2.6. Os valores de K_{SV} estão listados na Tabela 7.

Tabela 7 - Constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e Coeficiente de correlação (R^2).

| | | $K_{SV} (x 10^4)$ | R^2 |
|-----------------|-----------|-------------------|--------|
| Sítio I | DL | $2,7 \pm 0,3$ | 0,9997 |
| | DA | $3,1 \pm 0,1$ | 0,9992 |
| | DC | $3,1 \pm 0,04$ | 0,9995 |
| Sítio II | DP | $7,7 \pm 0,1$ | 0,9995 |
| | DN | $18 \pm 0,1$ | 0,9941 |
| | DG | $10 \pm 0,03$ | 0,9979 |
| | DS | $6,1 \pm 0,1$ | 0,9999 |

Figura 15 - Gráfico de Stern-Volmer para os aminoácidos dansilados com HSA.

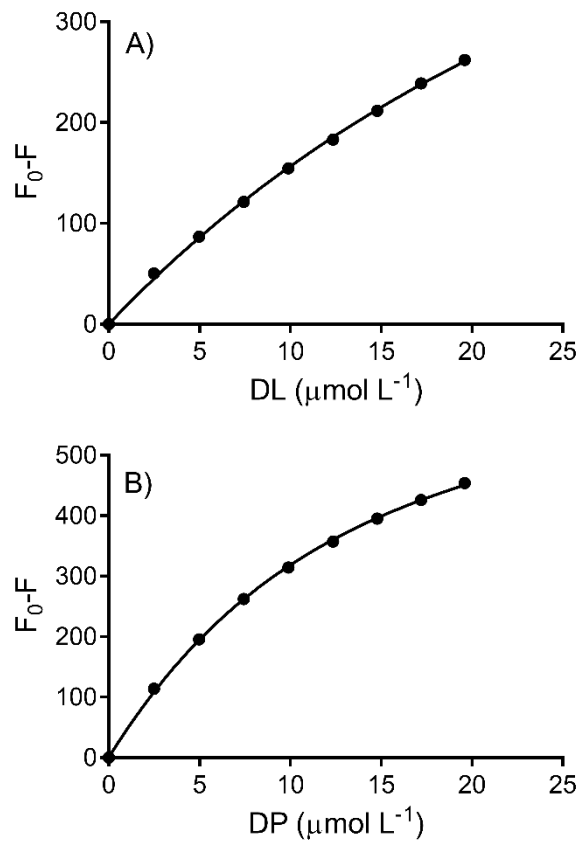
Descrições experimentais estão na Figura 13. (A) DL; (B) DA; (C) DC; (D) DP; (E) DN; (F) DG; (G) DS.



Os valores de coeficiente de correlação (R^2) próximos de 1 indicam o comportamento linear da reta nos gráficos de Stern-Volmer reforçando que somente um processo é responsável pela supressão da fluorescência da HSA (CHEN, YI-CUN et al., 2016). Os aminoácidos dansilados que se ligam preferencialmente no sítio I da HSA apresentam K_{SV} de duas à seis vezes menores quando comparados com os dansilados que se ligam preferencialmente ao sítio II da proteína. Os valores mais baixos da K_{SV} indicam que o fluoróforo, neste caso o triptofano presente na HSA, é mais inacessível aos supressores, ou seja, a sensibilidade da fluorescência do triptofano é menor para os dansilados de sítio I do que para os de sítio II (LAKOWICZ, 2006). Essa evidência fica ainda mais clara ao se observar os gráficos da Figura 14, em que se verifica que concentrações semelhantes dos dansilados causam efeitos distintos na diminuição da intensidade de fluorescência da HSA. Enquanto para o dansilado que se liga no sítio II a intensidade de fluorescência é suprimida cerca de 70%, o dansilado de sítio I apresenta cerca de 40% de supressão da fluorescência intrínseca da HSA, considerando concentrações semelhantes.

A determinação de K_a foi realizada utilizando os dados de fluorescência obtidos no experimento de supressão apresentados na Figura 14 e a Equação 14 (VAN DE WEERT; STELLA, 2011).

Os gráficos da Figura 16 mostram as curvas obtidas ao utilizar a Equação 14, e a Tabela 8 apresenta os valores de K_a obtidos para cada aminoácido dansilado. Os demais gráficos para a determinação do K_a a partir do *quenching* estão apresentados na Figura A 7, no Anexo A.

Figura 16 - Determinação de K_a a partir do *quenching* de fluorescência. (A) DL e (B) DP.Tabela 8 - Constantes de associação obtidas pelo experimento de *quenching* de fluorescência.

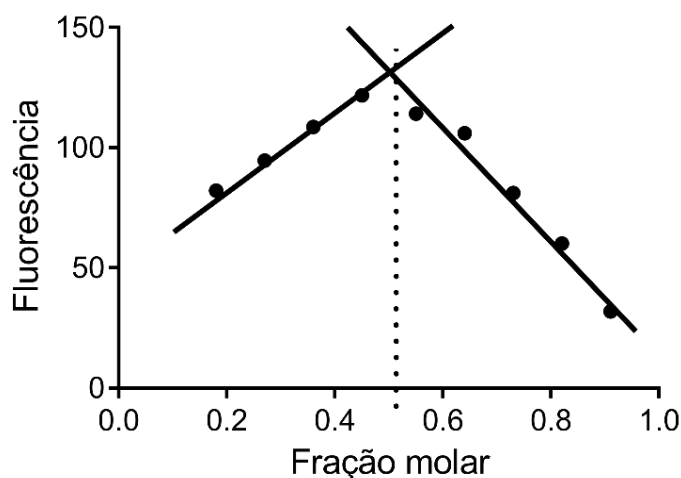
| | | K_a ($\times 10^4$) ($\text{mol}^{-1} \text{L}$) | R^2 |
|----------|----|--|--------|
| Sítio I | DL | $5,3 \pm 0,2$ | 0,9942 |
| | DA | $4,9 \pm 0,2$ | 0,9941 |
| | DC | $9,5 \pm 0,3$ | 0,9908 |
| Sítio II | DP | $20,5 \pm 3,5$ | 0,9883 |
| | DN | $42,0 \pm 5,4$ | 0,9890 |
| | DG | $21,0 \pm 0,5$ | 0,9873 |
| | DS | $13,0 \pm 2,8$ | 0,9892 |

Novamente, as sondas dansiladas que se ligam preferencialmente ao sítio I da proteína apresentaram valores de K_a menores quando comparadas as que se ligam preferencialmente ao sítio II, este comportamento reforça o observado para as K_{SV} .

O valor de K_a de alguns aminoácidos dansilados já foi determinado anteriormente. Sudlow et al. (1975) foi o pioneiro no estudo dos aminoácidos dansilados como sondas na HSA e na determinação da constante de dissociação ($K_D = 1/K_a$) de alguns deles utilizando a fluorescência. Dentre os dansilados estudados em seu trabalho, destacamos a dansilarginina (DA) e a dansilprolina (DP) que também foram utilizadas em nosso estudo. Para esses aminoácidos dansilados, o autor obteve os valores de K_D de $23,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($K_a = 4,2 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) e de $7,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($K_a = 1,4 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), respectivamente (SUDLOW; BIRKETT; WADE, 1975). Esses resultados reforçam os obtidos em nosso estudo, que apresentou valores de K_a na ordem de 10^4 , sendo que os dansilados de sítio I exibiram valores menores do que os de sítio II. Além disso, foram obtidos comportamentos semelhantes para outros dansilados utilizados por Sudlow et al. (1975), que não foram empregados em nosso estudo, mas que já foram rotulados em um determinado sítio da HSA.

As equações utilizadas para a determinação de K_a por todos os métodos aplicando a fluorescência consideram que a estequiometria entre a interação dansilado:HSA é igual a 1. A confirmação de que a estequiometria possuía este valor e que, portanto, a utilização das equações estava adequada foi realizada a partir do Job's plot. O Job's plot é um método capaz de determinar a estequiometria de uma reação. Neste caso, as variações de fluorescência foram utilizadas neste método e confirmou a estequiometria igual a 1 para a interação dansilado:HSA (Figura 17).

Figura 17 – Diagrama de Job's plot para o DP em associação com a HSA obtido a partir de medidas de fluorescência.



5.1.6 – Elucidação do local de ligação de aminoácidos dansilados utilizando a fluorescência

5.1.6.1 – Ensaio de competição utilizando os aminoácidos dansilados e ligantes específicos de sítio I ou de sítio II da HSA.

A HSA possui dois principais sítios de ligação: sítio I e o sítio II. Atualmente é aceito que as propriedades físico-químicas das cadeias laterais dos aminoácidos dansilados determinam o local de ligação na HSA, ou seja, aminoácidos dansilados que possuem cadeias laterais carregadas ou polares preferencialmente se ligam ao sítio I, enquanto que os aminoácidos que possuem cadeias laterais hidrofóbicas se ligam preferencialmente ao sítio II da proteína (RYAN *et al.*, 2011). Por isso, vários desses aminoácidos dansilados são utilizados como sonda específicas para o sítio I ou sítio II da HSA em estudos em que é necessário determinar o local de ligação de uma nova molécula (JISHA *et al.*, 2006, 2010; ZHANG, YUANWEI *et al.*, 2013). Porém, como discutido anteriormente, apesar dos dansilados serem designados como ligantes específicos de um determinado sítio da HSA, ainda pode ocorrer equívocos na interpretação dos resultados (CHEN, YAN-MIN; GUO, 2009; LIU, XIANGPING *et al.*, 2009; MALISZEWSKA *et al.*, 2016).

Sondas que se ligam preferencialmente em algum dos sítios da HSA são utilizadas na elucidação dos locais de ligação de novos compostos por meio de estudos de deslocamento. Assim, por exemplo, um novo composto que se ligue no mesmo local na proteína que um dansilado irá provocar a diminuição da intensidade de fluorescência do complexo dansilado-HSA, uma vez que irá deslocar o dansilado do seu sítio de ligação. Sudlow *et al.* (1975) também realizaram estudos de deslocamentos para diversos aminoácidos dansilados utilizando a fluorescência. Dentre os dansilados utilizados neste estudo, destaca-se a DNSA e o DP. Os autores utilizaram a fenilbutazona, que é um ligante específico de sítio I na HSA e observaram que ela diminui a intensidade de fluorescência do complexo DNSA-HSA em 54%, enquanto não altera a intensidade de fluorescência do complexo DP-HSA. Assim, os autores concluíram que a DNSA se liga no mesmo local que a fenilbutazona, o sítio I da HSA (SUDLOW; BIRKETT; WADE, 1975).

Empregando este raciocínio, escolhemos um ligante específico para o sítio I da albumina, fenilbutazona (FBZ), e um ligante que possui o sítio II como preferencial, ibuprofeno (IBU), e verificamos se a adição destes ligantes é capaz de deslocar o dansilado de

seu sítio de ligação. Em outras palavras, buscamos elucidar o local de ligação dos aminoácidos dansilados. A Figura 18 apresenta os espectros de fluorescência para um dansilado de sítio I, DL, e um de sítio II, DP, na presença e na ausência de FBZ ou IBU. A Figura 19 apresenta um gráfico de barras com a porcentagem de deslocamento observada para todos os dansilados em estudo com a adição dos ligantes específicos (FBZ ou IBU).

Figura 18 - Ensaio de competição utilizando o DL e o DP.

(A) DL com FBZ; (B) DL com IBU; (C) DP com FBZ e (D) DP com IBU. DL ou DP $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, HSA $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e FBZ ou IBU $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 450\text{-}600 \text{ nm}$.

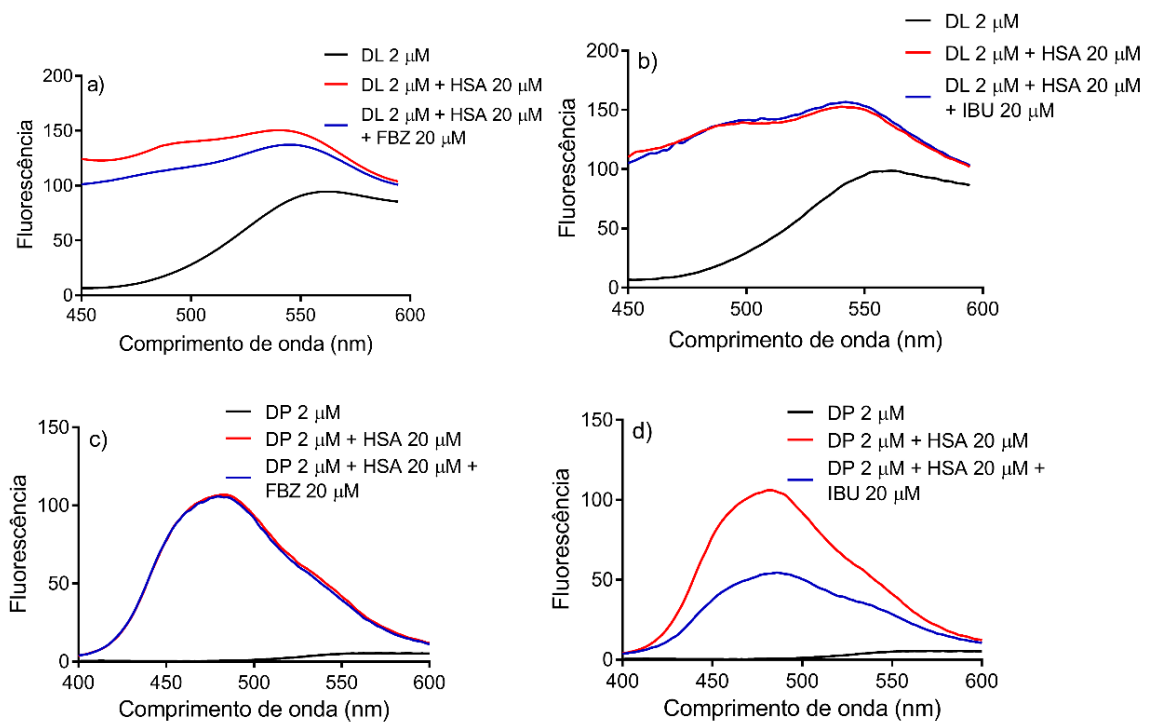
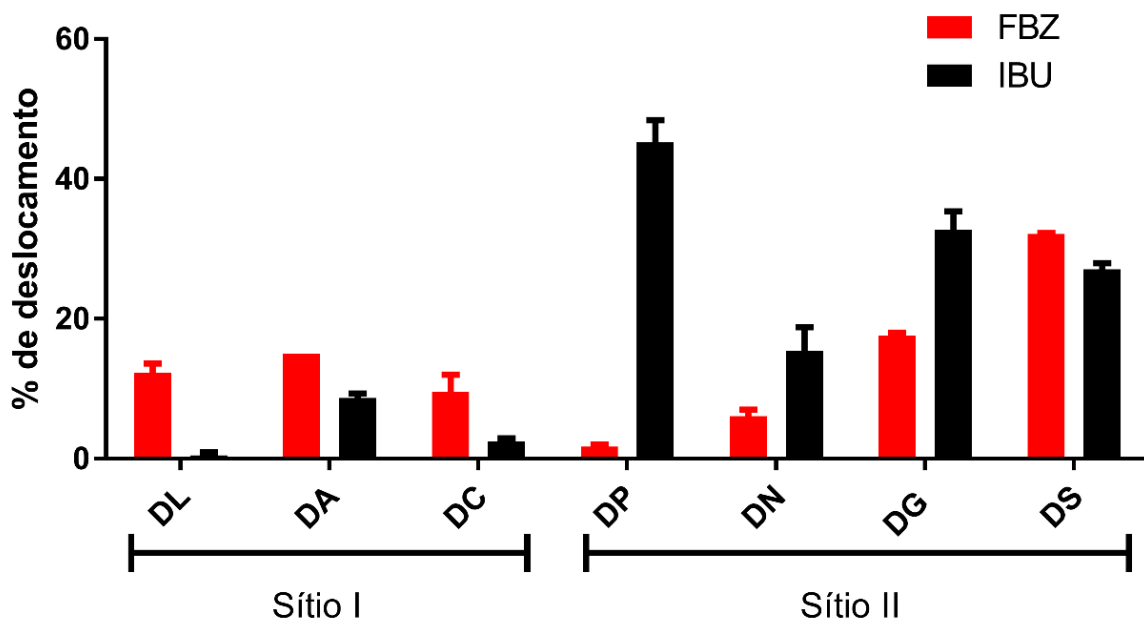


Figura 19 - Porcentagem de deslocamento dos aminoácidos dansilados a partir da adição de fenilbutazona (FBZ) e ibuprofeno (IBU).



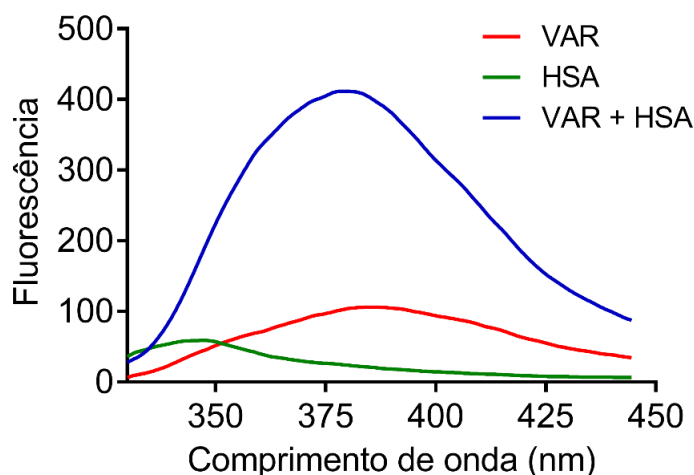
Observando os espectros obtidos para a DL na Figura 18a, a diminuição da intensidade de fluorescência com a adição do ligante competitivo (FBZ) é muito inferior ao observado para o DP (Figura 18) com a adição de IBU, seu ligante competitivo. Isto também pode ser visualizado a partir da Figura 19, em que o ligante FBZ desloca no máximo cerca de 20% os dansilados de sítio I (DL, DA e DC), ao passo que, o IBU chega a deslocar cerca de 50% de um dansilado de sítio II, DP. Além disso, é importante considerar que neste experimento as concentrações dos ligantes competitivos foram dez vezes maiores ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) quando comparadas com as dos dansilados ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$). O excesso da concentração dos ligantes competitivos deveria garantir que a maioria dos dansilados fossem deslocados de sítio de ligação, porém isto não foi o observado. Acreditamos que este comportamento observado para ao sítio I se dê pelo fato de que esta cavidade pode acomodar mais de um ligante, o que dificulta os estudos de deslocamentos de sondas. De fato, Yamasaki et al. (1996) em seu trabalho destaca que mais de uma molécula pode se ligar ao sítio I da HSA (YAMASAKI, KEISHI *et al.*, 1996), e se isto estiver ocorrendo os experimentos de competição não serão capazes de indicar com confiança o local da sonda na proteína.

5.1.6.2 – Verificação do local de ligação do DL e do DP a partir do decréscimo da intensidade de fluorescência do complexo varfarina-HSA.

A associação entre a varfarina e a HSA também provoca um aumento no rendimento quântico de fluorescência, além do deslocamento do espectro para o azul da varfarina, uma vez que ela também é fluorescente (Figura 20). Desta forma, sabendo-se que a varfarina é um ligante específico de sítio I na HSA, utilizamos essa sonda em ensaios de deslocamento com o DL e DP.

Figura 20 - Espectro de fluorescência da HSA e da varfarina (VAR) na ausência e na presença de HSA.

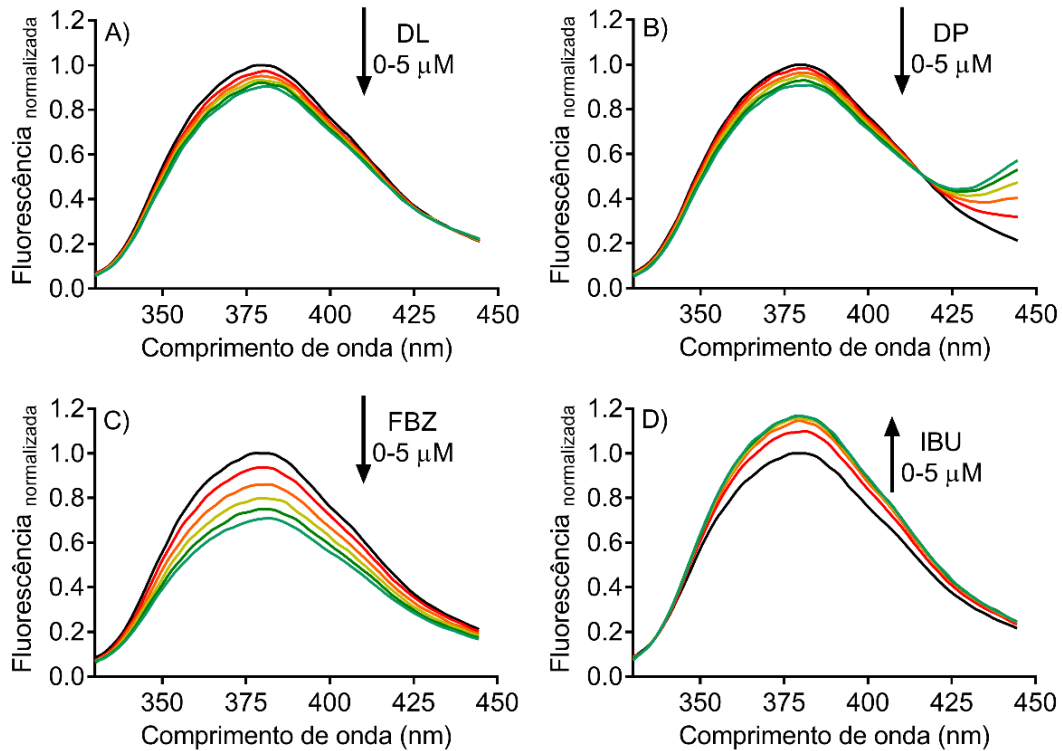
VAR $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e HSA $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{ex}} = 310 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 330\text{-}450 \text{ nm}$.



Neste estudo, a diminuição da intensidade de fluorescência do complexo VAR-HSA indica que a varfarina foi deslocada de seu sítio de ligação pelo ligante adicionado, em outras palavras, o ligante possui o mesmo local de ligação da varfarina. A Figura 21 apresenta o estudo de deslocamento utilizando a DL e a DP além de ligantes específicos de sítio I, fenilbutazona, e de sítio II, ibuprofeno.

Figura 21 - Estudo do deslocamento de fluorescência da varfarina-HSA utilizando DL, DP, fenilbutazona (FBZ) e ibuprofeno (IBU).

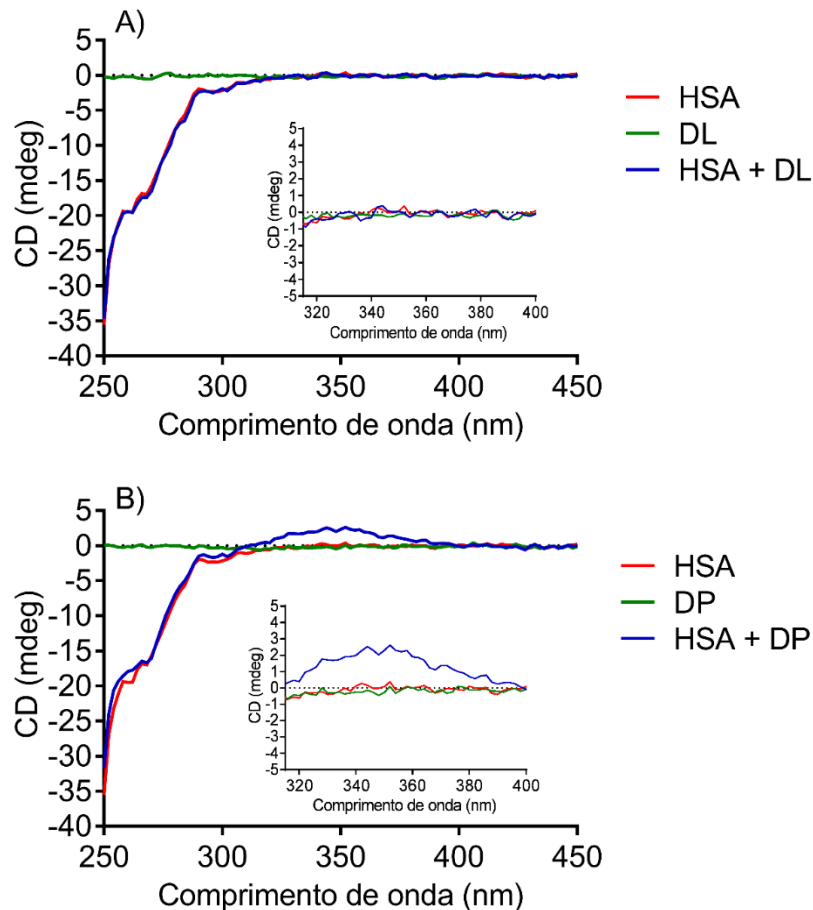
(A) DL; (B) DP; (C) FBZ; (D) IBU. HSA $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, varfarina $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, DL, DP, FBZ e IBU $0-5 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{ex}} = 310 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 330-450 \text{ nm}$.



A Figura 21 C representa o deslocamento de cerca de 30% da varfarina pela fenilbutazona, o que evidencia que elas possuem o mesmo local de ligação. A sonda DL, não foi capaz de deslocar a varfarina ($\sim 9\%$), mesmo possuindo um local de ligação semelhante. O DP e o ibuprofeno não deslocam a varfarina de seu local de ligação e, por isso, a diminuição da intensidade da fluorescência não é observada, uma vez que eles se ligam ao sítio II da HSA. Esse resultado reforça a menor especificidade encontrada para os dansilados de sítio I, evidenciando que eles não seriam os mais indicados para serem utilizados na técnica de competição para a determinação do local de ligação de uma nova molécula na HSA.

5.1.7 – Estudo da interação entre a HSA e os aminoácidos dansilados utilizando dicroísmo circular induzido (ICD).

Os estudos utilizando a fluorescência reforçaram que, seja com maior ou menor interação, os dansilados se ligam à HSA. Outra forma de verificar a ligação entre as sondas dansiladas e a HSA é por meio de estudos de dicroísmo circular. A HSA possui um sinal de dicroísmo característico, enquanto as sondas dansiladas, por não serem quirais, não possuem sinal. Com a formação do complexo entre os dansilados e a HSA um novo sinal de dicroísmo induzido é obtido, evidenciando a formação da ligação (Figura 22). Este novo sinal é resultado da quiralidade induzida pelo interior assimétrico da albumina no dansilado. O aparecimento de um novo sinal de dicroísmo, que indica a ligação entre as sondas dansiladas e a HSA, foi evidente apenas para os dansilados que se ligam preferencialmente ao sítio II, sendo que para os de sítio I alterações no sinal não foram provocadas. Os espectros de dicroísmo circular para todos os aminoácidos dansilados estão representados na Figura A 10, no anexo A. Embora a interação entre os aminoácidos dansilados e a HSA esteja bem estabelecida (RYAN et al., 2011; SEKI et al., 1984), esses estudos reforçaram que as sondas se ligam à HSA, provocando um novo sinal de dicroísmo circular induzido, além de evidenciar que por não apresentar um novo sinal após a complexação, os dansilados que preferem se ligar ao sítio I, se associam a proteína de maneira distinta quando comparados aos de sítio II. Em outras palavras, considerando que os dansilados estejam ligados no sítio I da HSA, o interior assimétrico da cavidade não é capaz de induzir quiralidade ao ligante.

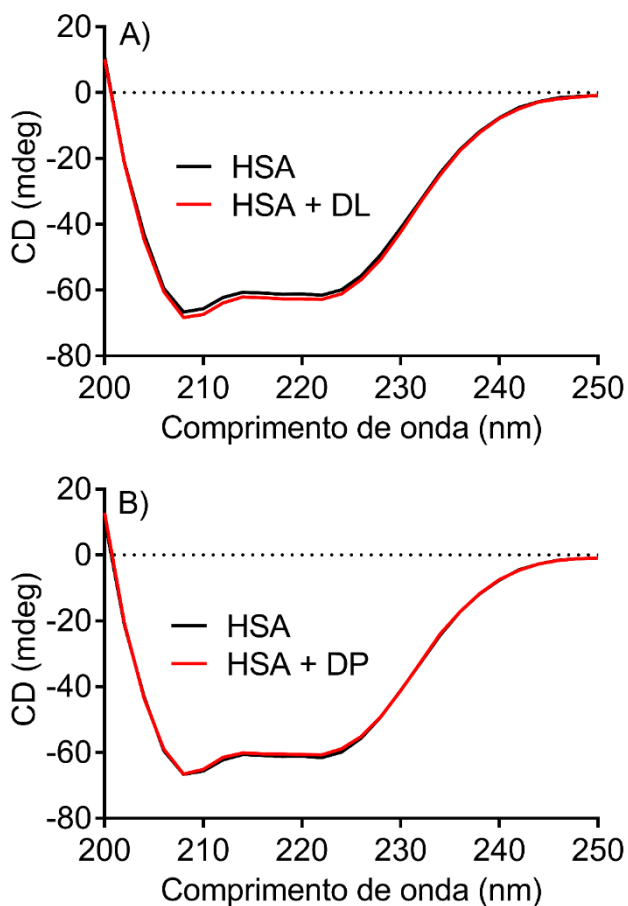
Figura 22 - Espectros de dicroísmo circular para os aminoácidos dansilados na HSA.(A) DL; (B) DP. HSA 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, Dansilados 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS.

Outra maneira de verificar a interação entre os aminoácidos dansilados e a HSA, utilizando o dicroísmo, é observar a estrutura secundária da proteína, uma vez que, a ligação de um composto a HSA pode alterar as forças intermoleculares, modificando sua estrutura secundária (JANA et al., 2012). A Figura 23 mostra os espectros de dicroísmo circular na região de observação da estrutura secundária para a HSA em associação com um dansilado de sítio I, DL, e outro de sítio II, DP. Ao observar somente o espectro de dicroísmo para a HSA (traçado preto), verifica-se uma banda negativa em 209 nm e outra em 220 nm que são características da estrutura α -hélice da proteína, que contribuem para a transferência de elétrons π - π^* e n - π^* da estrutura peptídica, respectivamente (CHEN, YI-CUN et al., 2016). Alterações que afetam esses sinais de dicroísmo indicam mudanças na estrutura secundária ocasionadas pela interação da proteína com o ligante. Porém, ao observar os espectros da Figura 23 (traçado vermelho), verifica-se que a interação dos aminoácidos dansilados com a HSA não provoca alteração em sua estrutura secundária. Os espectros de dicroísmo para

avaliar a estrutura secundária da proteína para os demais dansilados estão listados na Figura A 11 do anexo A.

Figura 23 - Espectros de dicroísmo circular para a avaliação da estrutura secundária.

(A) DL; (B) DP. HSA 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, Dansilados 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS.



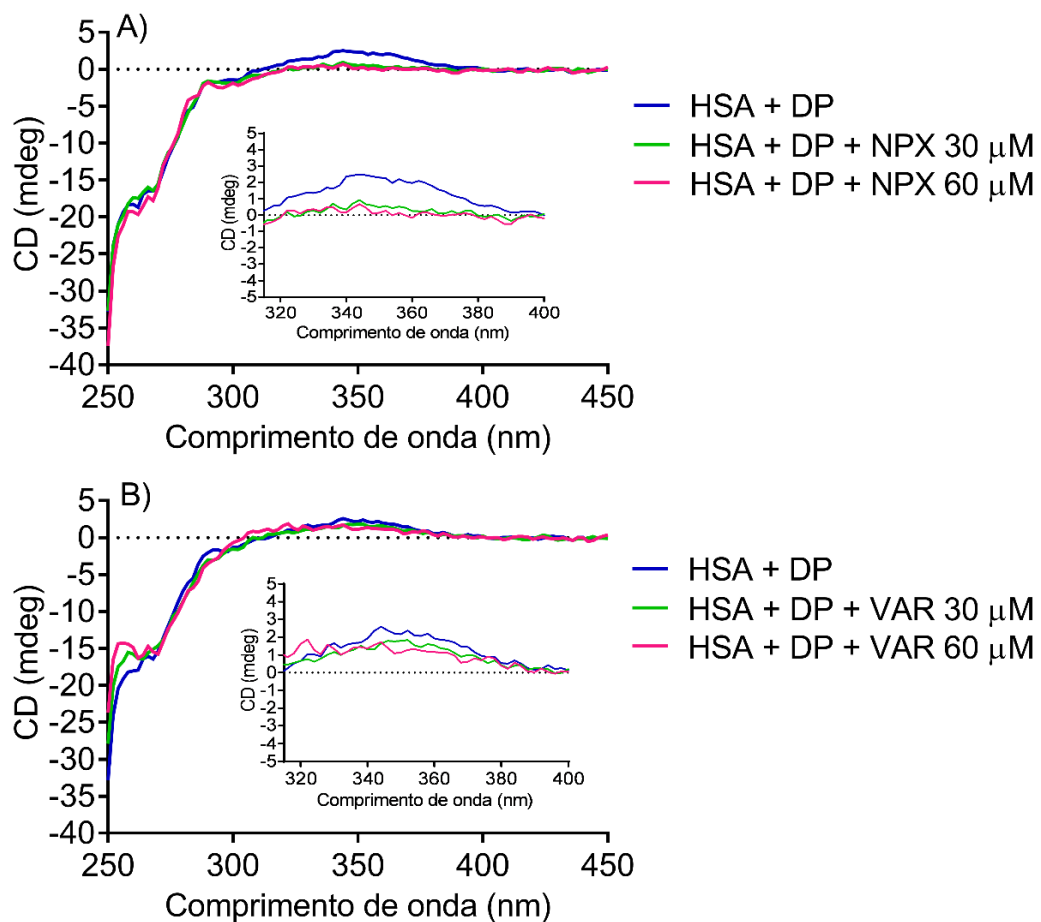
5.1.8 – Verificação do local de ligação dos dansilados utilizando dicroísmo circular.

As sondas dansiladas que se ligam preferencialmente ao sítio II mostraram um novo sinal de dicroísmo circular induzido indicando a ligação na HSA (Figura 22). Assim, utilizamos o dicroísmo circular em estudos de deslocamento para os dansilados de sítio II, com a finalidade de mostrar que esta técnica também pode ser utilizada quando se deseja determinar o local de ligação de um novo composto. Os espectros de dicroísmo circular são apresentados na Figura 24, sendo que, neste estudo foram utilizados os fármacos varfarina e

naproxeno que são específicos para se ligar no sítio I e no sítio II da HSA, respectivamente, e não possuem sinal de dicroísmo circular nesta região do espectro estudado.

Figura 24 - Espectros de dicroísmo circular para o estudo de deslocamento dos aminoácidos dansilados que se ligam preferencialmente ao sítio II da HSA utilizando naproxeno (NPX) e varfarina (VAR).

(A) DP-HSA com NPX; (B) DP-HSA com VAR; HSA 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, DP 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, NPX 0-30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e VAR 0-30 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



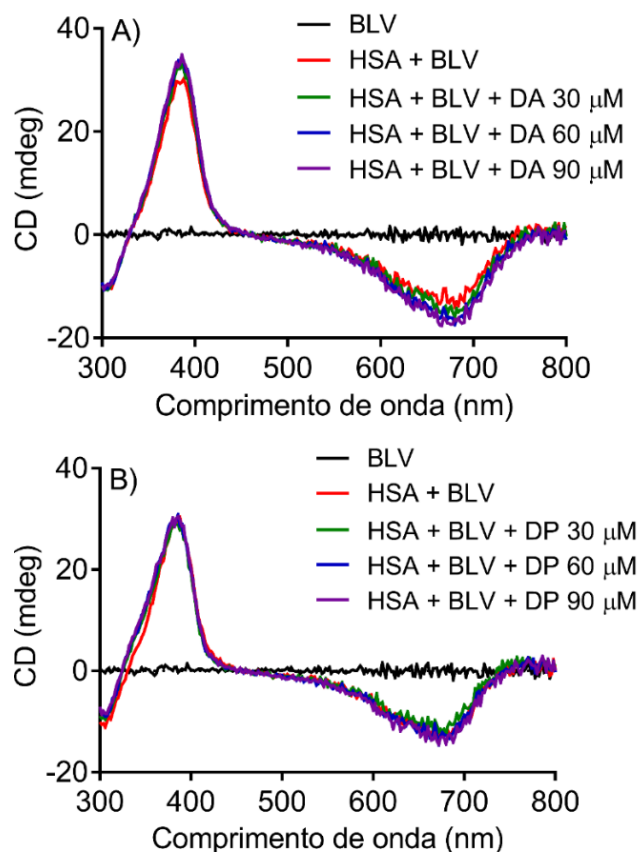
Os resultados apresentados na Figura 24, para o DP, mostram que o sinal de dicroísmo não se altera quando a varfarina é adicionada ao meio reacional, pois ela não se liga no mesmo local que as sondas na proteína. O inverso é observado quando o naproxeno é adicionado ao meio reacional, pois ele se liga no mesmo local que as sondas dansiladas na proteína, provocando a diminuição no sinal de dicroísmo. Os demais dansilados de sítio II

também foram testados neste ensaio de deslocamento e os espectros de dicroísmo circular são mostrados na Figura A 12 no anexo A.

Além do sítio I e II, a HSA possui o sítio III que não é tão explorado igual aos anteriores (ZSILA, 2013). A biliverdina é um composto conhecido por se ligar preferencialmente ao sítio III da HSA e este composto em associação com a HSA apresenta um sinal de dicroísmo característico. Desta forma, utilizamos a biliverdina em ensaios de competição, a fim de verificar se um dos dansilados de sítio I, DA, ou um dos dansilados de sítio II, DP, era capaz de deslocá-la, ou seja, de ser ligar, também, ao sítio III da proteína, provocando alteração no espectro de dicroísmo circular. Os resultados estão listados na Figura 25 e mostram que nenhum dos dansilados foram capazes de alterar o sinal de dicroísmo circular da biliverdina com a HSA, ou seja, eles não deslocaram a sonda, como já era esperado, e por isso não se ligam ao sítio III da HSA.

Figura 25 - Espectros de dicroísmo circular da biliverdina (BLV) com HSA na presença de DA e DP.

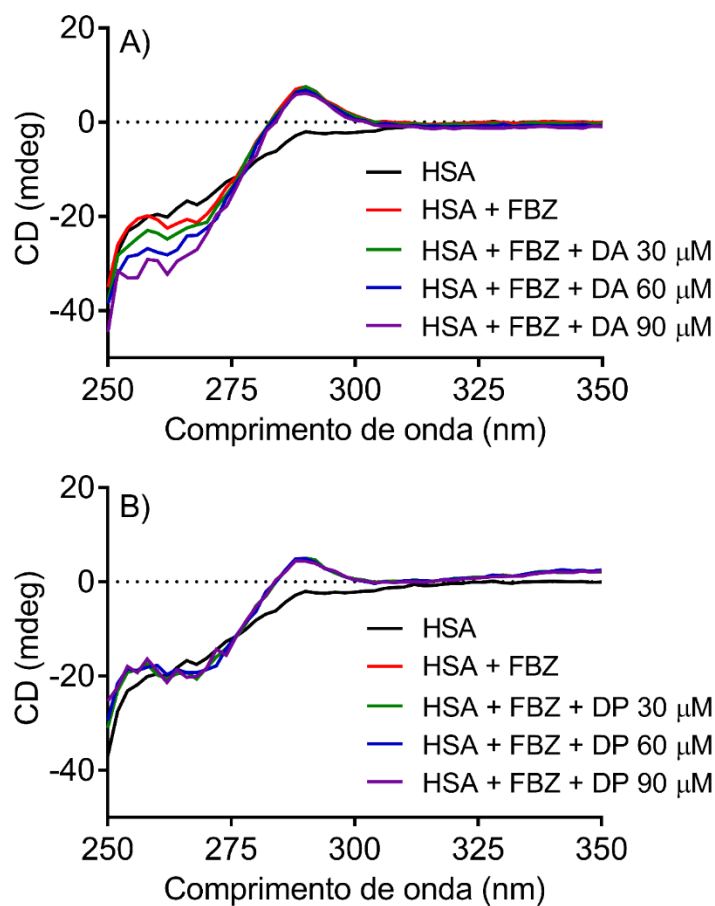
(A) DA; (B) DP. HSA 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, biliverdina 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e dansilados 30-90 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



A fenilbutazona em associação com a HSA também produz um sinal de dicroísmo circular e esta característica pode ser utilizada em ensaios para se determinar o sítio de ligação de outros compostos, uma vez que, sabe-se que a fenilbutazona é um ligante específico para o sítio I da proteína (TEDESCO; BERTUCCI, 2015). Desta maneira, aplicamos essa propriedade da FBZ para analisar o local de ligação de um dansilados de sítio I, DA, e um dansilado de sítio II, DP. Os espectros de dicroísmo circular obtidos neste estudo estão ilustrados na Figura 26.

Figura 26 - Espectros de dicroísmo circular da fenilbutazona (FBZ) com HSA na presença de DA e DP.

(A) DA; (B) DP. HSA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, fenilbutazona $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e dansilados $30\text{-}90 \mu\text{mol L}^{-1}$.



A DA se liga preferencialmente no mesmo local da fenilbutazona na HSA, por isso, era esperado que ocorressem alterações no sinal de dicroísmo da fenilbutazona-HSA com a adição deste dansilado. Porém, não foram observadas alterações no espectro de dicroísmo

circular, ou seja, a DA não foi capaz de deslocar a fenilbutazona do sítio da HSA. A adição de DP também não provocou alterações no espectro de dicroísmo circular, uma vez que ela se liga em um sítio diferente da fenilbutazona. Estes experimentos reforçaram a menor especificidade dos dansilados de sítio I, uma vez que em um estudo de competição, eles não são capazes de provocar alteração no sinal de dicroísmo do complexo fenilbutazona-HSA.

5.1.9 – Estudo da variação da anisotropia de fluorescência dos aminoácidos dansilados a partir da adição de HSA.

Os estudos de fluorescência mostraram a ligação entre os aminoácidos dansilados e a HSA, seja pelo aumento do rendimento quântico de fluorescência ou pelo deslocamento do espectro de emissão. De forma semelhante, o dicroísmo circular mostrou o aparecimento de um novo sinal, indicando a interação entre as sondas e a proteína. Outra maneira de verificar essa interação foi por meio de estudos de anisotropia de fluorescência. A anisotropia pode indicar a ligação das sondas dansiladas à proteína, uma vez que maiores valores de anisotropia indicam uma maior restrição de movimento da sonda, ou seja, uma possível ligação na cavidade da proteína (ABDOLLAHPOUR *et al.*, 2016; JANA *et al.*, 2012; LAKOWICZ, 2006).

Diversos estudos mostraram o aumento da anisotropia associado a ligação na HSA. Abdollahpour *et al.* (2015) associaram o aumento do valor de anisotropia a ligação da aspirina e da amlodipina na HSA. Outro estudo destaca uma sonda fluorescente que possui característica ICT, a 5-(4-dimetilamino-fenil)-penta-2,4-dienitrilo, DMAPPDN, que apresentou um maior valor de anisotropia quando na presença de HSA, comparado com o valor obtido quando estava em solução aquosa (JANA *et al.*, 2012).

Neste experimento avaliamos a anisotropia dos aminoácidos dansilados em três diferentes condições. Em um primeiro momento, o valor de anisotropia foi determinado para os dansilados em solução tampão PBS, depois em um meio com HSA na proporção 1:1 dansilado:HSA, e por último em um meio com HSA em uma concentração saturante (HSA sat.). Os valores de anisotropia e da intensidade de fluorescência estão listados na Tabela 9.

Tabela 9 - Anisotropia para os aminoácidos dansilados.

| | | Anisotropia | | |
|-----------------|-----------|--------------------|----------------|-----------------|
| | | Em PBS | HSA 1:1 | HSA sat. |
| Sítio I | DL | 0,028 | 0,075 | 0,172 |
| | DA | 0,012 | 0,074 | 0,169 |
| | DC | 0,019 | 0,079 | 0,194 |
| Sítio II | DP | 0,015 | 0,175 | 0,192 |
| | DN | 0,014 | 0,169 | 0,171 |
| | DG | 0,013 | 0,168 | 0,180 |
| | DS | 0,021 | 0,163 | 0,181 |

Analisando os valores de anisotropia da Tabela 9, verifica-se que quando os dansilados estão livres em solução, ou seja, em solução tampão PBS, eles apresentam valores baixos de anisotropia, uma vez que, seus movimentos não estão restritos. Por outro lado, quando se utiliza uma concentração saturante de HSA, os valores de anisotropia aumentam cerca de dez vezes, indicando que o movimento das sondas dansiladas foi restringido. Ao interagir com a proteína, os movimentos da sonda ficam limitados, e consequentemente, o valor de anisotropia aumenta.

Quando a proporção entre a concentração de HSA e das sondas foi 1:1, a maior afinidade dos dansilados que se ligam preferencialmente ao sítio II com a HSA ficou ainda mais evidente. Os dansilados que se ligam preferencialmente ao sítio I da HSA apresentaram um valor inferior de anisotropia quando comparados com os de sítio II. Isto indica que na proporção 1:1, por ter uma maior afinidade com a HSA, os dansilados de sítio II podem se encontrar, em maior parte, ligados a proteína, enquanto que os dansilados de sítio I também devem estar ligados a proteína, porém uma maior concentração de espécies livres em solução contribui para o menor valor de anisotropia, ou seja, em condições semelhantes, eles apresentam afinidade menor na interação com a HSA.

Esses resultados complementam as análises obtidas anteriormente considerando o valor de K_a , pois enquanto os aminoácidos dansilados de sítio I apresentam um menor valor de K_a , os de sítio II refletem nos valores de K_a a maior afinidade com a HSA.

5.1.10 – Estudo da interação entre os aminoácidos dansilados e a HSA utilizando a calorimetria de titulação isotérmica.

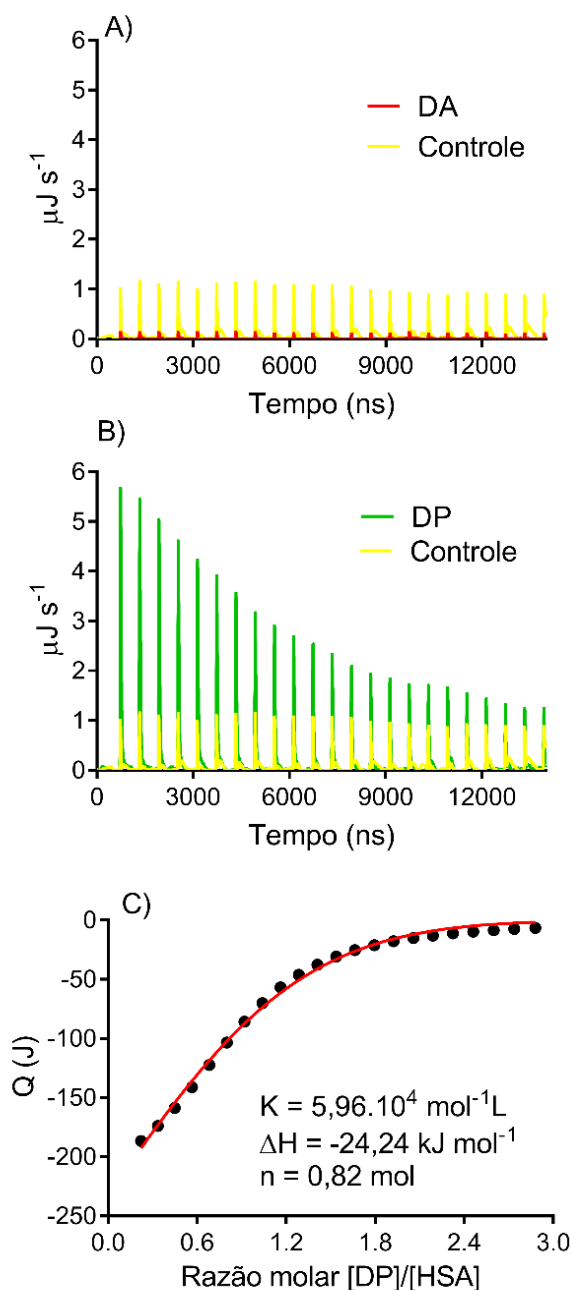
Técnicas espectroscópicas não estão livres de interferências, por exemplo, efeitos de filtro interno. A utilização da calorimetria de titulação isotérmica (ITC), uma técnica não-espectroscópica permitiu confirmar a interação entre os dansilados e a HSA e reforçar a diferença encontrada entre as sondas de sítio I e II.

O DMSO possui um elevado calor de dissolução (COMPANY, 2014) e este fato pode atrapalhar as análises de ITC. Por isso, as sondas dansiladas foram preparadas em HCl 0,1 mol L⁻¹ para que este estudo fosse realizado, uma vez que o HCl possui calor de dissolução inferior ao do DMSO (PARKER, 1965). Como nem todos os aminoácidos dansilados eram solúveis nessas condições, as análises de ITC foram realizadas somente para o DA e DL, dansilados de sítio I, e DP e DG, dansilados de sítio II. Um experimento controle (branco) também foi realizado e descontado destas análises.

A Figura 27 apresenta os resultados obtidos para a análise de ITC para o DA e o DP em comparação com o branco. Os resultados para o DL e DG foram bastante semelhantes e os gráficos obtidos na análise de ITC destes compostos estão na Figura A 13 do anexo A. A Figura 27 mostra que o dansilado de sítio I apresentou um perfil de ITC semelhante a análise relativa ao branco, sendo, desta forma, impossível determinar os parâmetros termodinâmicos e a constante de ligação para este composto utilizando esta técnica. Por outro lado, o DP, dansilado de sítio II, apresentou um perfil de ITC relativo à sua interação com a HSA. Utilizando o modo independente, em que se considera que há um ligante para uma biomolécula, foi realizada a regressão não-linear, resultando nos valores de K_a , n e ΔH relativos a esta interação (Tabela 10). Estes resultados reforçaram que os dansilados de sítio I apresentam menor interação com a HSA, uma vez que utilizando o ITC foi impossível verificar a interação deste composto com a proteína.

Figura 27 - Análise de ITC para a interação dos aminoácidos dansilados com a HSA. (A) Injeções sequenciais de DA na HSA. (B) Injeções sequenciais de DP na HSA (C) Ajuste linear obtido no modo independente.

Injeções sequenciais de 10 μL de DA ou DP 1 mM em HSA 0,1 mmol L^{-1} .



A Figura 27 também apresenta o perfil do gráfico quando utilizado o modelo independente. A Tabela 10 resume os resultados da variação da energia livre de Gibbs (ΔG), variação da entalpia (ΔH), variação de entropia (ΔS), K_a e estequiometria (n) para o DP e o DG obtidos por ITC.

Tabela 10 - Parâmetros termodinâmicos obtidos por ITC.

| | K_a (mol ⁻¹ L) | n (mol) | ΔH (kJ mol ⁻¹) | ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹) | ΔG (kJ mol ⁻¹) |
|-----------|-----------------------------|---------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|
| DP | 5,96 x 10 ⁴ | 0,82 | -24,24 | 8,65 | -26,79 |
| DG | 3,27 x 10 ⁴ | 1,24 | -24,10 | 4,17 | -25,33 |

Os resultados mostram que a interação entre os dansilados de sítio II e a HSA é favorável ($\Delta G < 0$) apresentando um valor de entalpia negativa e de entropia positiva. A entalpia negativa revela que a interação entre os ligantes e a HSA é exotérmica. De acordo com Ross e Subramanian (1981) e Olsson et al. (2008) o tipo de força de interação pode ser determinado por meio dos valores de ΔH e ΔS . Geralmente, um valor de ΔH negativo está relacionado a interações de van der Waals e ligações de hidrogênio, e um valor de ΔS positivo indica que na interação ligante-proteína estão envolvidas atrações eletrostáticas e interações hidrofóbicas (OLSSON *et al.*, 2008; ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). O valor de ΔH foi superior ao valor de $T\Delta S$ em ambos os casos e este fato contribui para afirmar que a interação é impulsionada principalmente pela mudança de entalpia.

Os resultados de ITC reforçaram a diferença que existe entre os dansilados de sítio I e o dansilados de sítio II quando interagem com a HSA. Além disso, contribuíram para a determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação entre os dansilados de sítio II e a HSA, indicando que a associação é impulsionada pela entalpia.

5.1.11 – Determinação da distância entre o resíduo de triptofano na HSA e os aminoácidos dansilados utilizando transferência de energia ressonante de fluorescência (FRET).

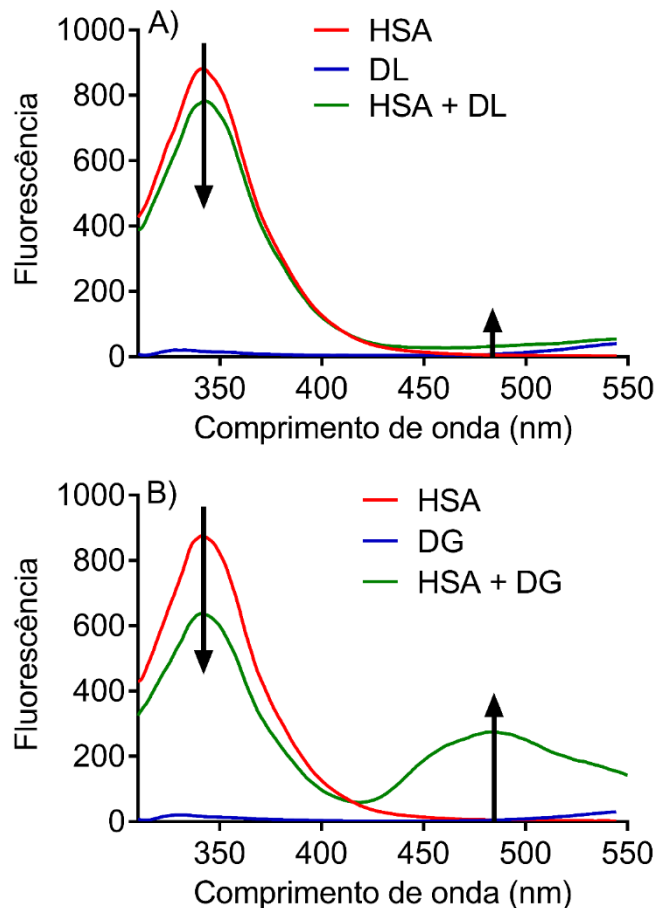
A transferência de energia ressonante de fluorescência (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*) é um método espectroscópico capaz de monitorar a proximidade e a orientação angular relativa de fluoróforos. Um doador no estado excitado pode transferir energia para seu vizinho por meio de um acoplamento dipolo-dipolo não-radiativo. Para que esse processo ocorra existem as seguintes condições: o doador tem que ser fluorescente, o espectro de emissão do doador deve sobrepor o espectro de absorção do aceitador e a

distância entre o doador e o aceitador deve ser menor do que 8 nm. O fenômeno da transferência de energia está associado não apenas a distância entre o doador e o aceitador, mas também a distância crítica de transferência de energia (CHEN, YI-CUN et al., 2016; HU; LIU; XIAO, 2009).

Para a HSA que possui um único resíduo de triptofano que é o responsável pela maior parte da fluorescência emitida, este resíduo de aminoácido é o fluoróforo doador, enquanto os aminoácidos dansilados são os aceitadores. O fenômeno de FRET foi demonstrado para um aminoácido dansilado de sítio I, DL, e outro dansilado de sítio II, DG (Figura 28), em que é possível analisar a supressão da intensidade do espectro da proteína e o aumento da intensidade do espectro da sonda ligada a HSA, principalmente para o dansilado que se liga preferencialmente ao sítio II, DG.

Figura 28 - Fenômeno de FRET para o DL e DG.

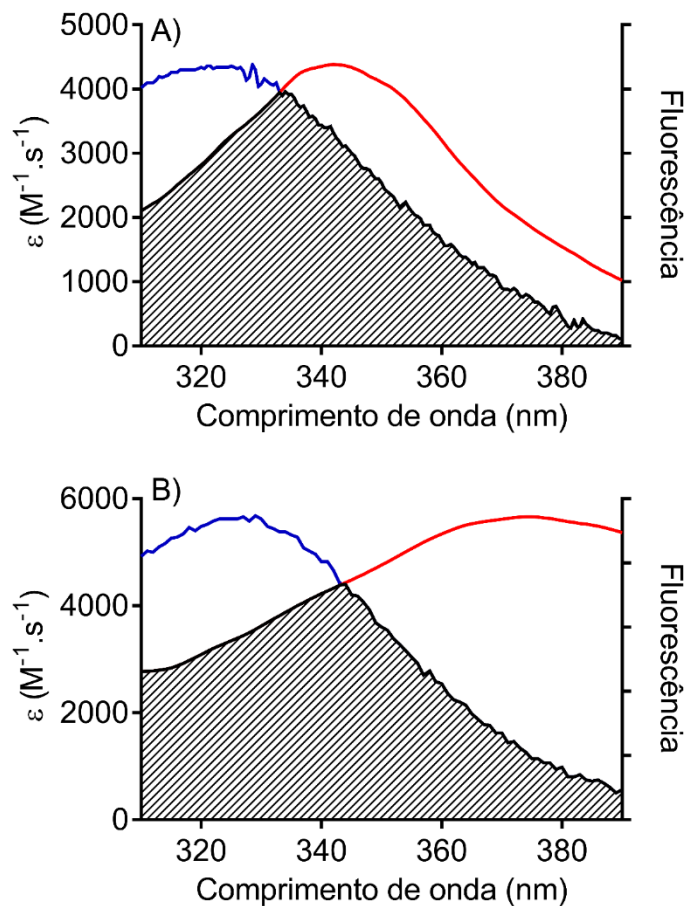
(A) DL; (B) DG. HSA $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e dansilados $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 310\text{-}550 \text{ nm}$.



A FRET foi calculada utilizando a Equação 9, em que é possível obter os valores da eficiência da transferência de energia entre o doador e o aceitador (E), a distância entre o doador e o aceitador (r), e a distância crítica quando a eficiência de transferência é 50%, chamada de distância de Forster (R_0). Os gráficos que mostram a sobreposição espectral estão listados na Figura 29.

Figura 29 - Sobreposição entre o espectro de fluorescência do doador e o espectro de absorvância do aceitador.

(A) DL; (B) DP. HSA $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e dansilados $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Fluorescência: $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 310\text{-}550 \text{ nm}$. Absorvância: $\lambda = 310\text{-}600 \text{ nm}$. Espectros de absorção estão representados pela linha vermelha e os espectros de fluorescência estão representados pela linha em azul.



Os resultados de R_0 , r , E e da área da sobreposição dos espectros de fluorescência do doador e da absorção do aceitador (J) estão listados na Tabela 11. Não é ideal utilizar FRET para medir o valor da distância entre o doador e o aceitador se o valor de r estiver fora da

faixa $r = 0,5 R_0$ à $r = 2R_0$. No caso dos dansilados, todos os valores respeitaram essa faixa, podendo então ser determinado o valor de r (LAKOWICZ, 2006).

Tabela 11 - Valores de J, E, R_0 e r obtidos pelo FRET.

| | | J ($M^{-1}.cm^{-1}.nm^4$) | E (%) | R_0 (Å) | r (Å) |
|-----------------|-----------|---|--------------|-----------------------------|---------------------------|
| Sítio I | DL | 2,6.10 ¹³ | 6,6 | 20,0 | 31,2 |
| | DA | 4,2.10 ¹³ | 9,2 | 21,6 | 31,7 |
| | DC | 4,1.10 ¹³ | 8,8 | 21,5 | 31,7 |
| Sítio II | DP | 1,5.10 ¹³ | 24,0 | 18,2 | 22,0 |
| | DN | 2,6.10 ¹³ | 38,0 | 20,0 | 21,6 |
| | DG | 5,3.10 ¹³ | 27,0 | 22,5 | 26,6 |
| | DS | 4,4.10 ¹³ | 17,0 | 21,8 | 28,9 |

Jana et al. (2012) determinou utilizando o estudo de FRET, que a distância entre a sua sonda, DMAPPDN e o triptofano na HSA foi de $2,70 \pm 0,01$ nm (27,0 Å) e afirmou que esse valor indica que sua sonda está próxima do resíduo do triptofano, no subdomínio IIA da proteína. Porém, utilizando os dados obtidos no *docking* molecular, a distância entre o resíduo de triptofano e a sonda foi de 15,9 Å, estando no subdomínio IIA (JANA et al., 2012). Assim, o valor de r obtido pode discordar do valor da distância da sonda do resíduo de triptofano na proteína obtido pelo *docking* molecular, uma vez que, para que ele seja determinado deve-se considerar a eficiência de transferência de energia.

Em outro estudo, também foi utilizado as análises de FRET para o cálculo da distância entre a sonda, Saikosaponin C e o resíduo de triptofano na HSA. Ensaio de deslocamento utilizando varfarina e ibuprofeno realizados anteriormente mostraram que a Saikosaponin C se liga preferencialmente ao sítio II da HSA. A distância entre o resíduo de triptofano e a sonda determinada por FRET foi de 2,61 nm (26,1 Å). Os estudos de *docking* molecular mostraram que a ligação é mais estável com a proteína, quando a sonda está no sítio II da HSA, confirmando os resultados experimentais (CHEN, YI-CUN et al., 2016).

Utilizando o *software RASMOL* e as estruturas presentes no *Protein Data Bank* (PDB), determinou-se os valores da distância entre o resíduo de triptofano e alguns ligantes

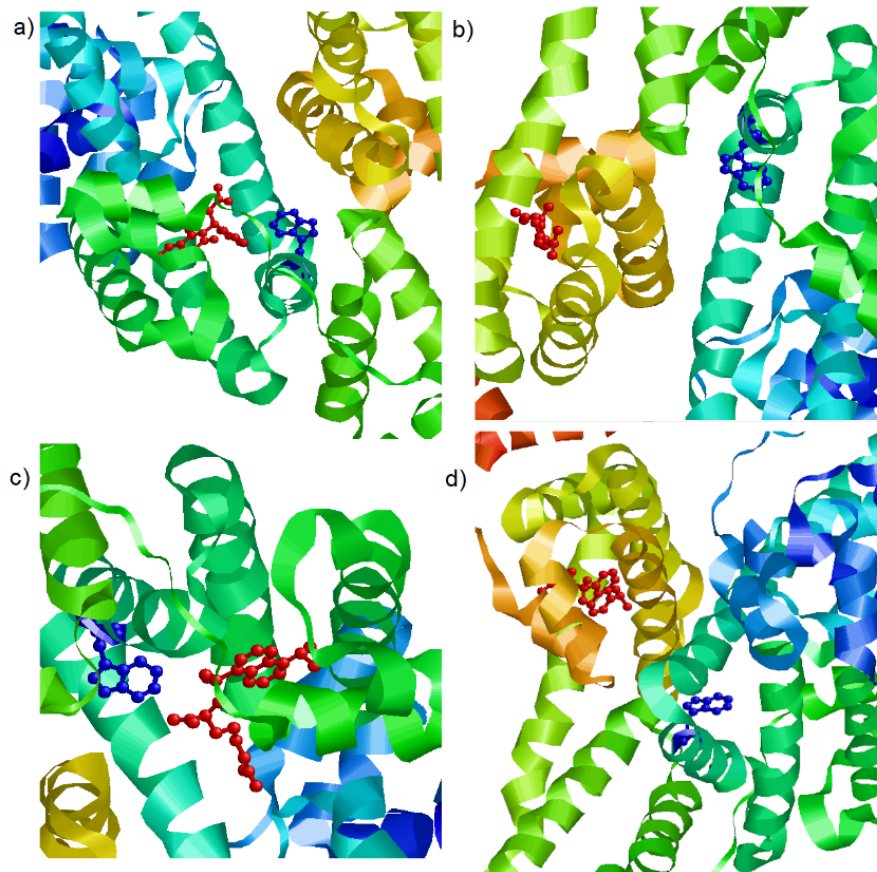
conhecidos (varfarina e ibuprofeno), além de um dansilado específico para o sítio I (dansilarginina) e um para o sítio II (dansilsarcosina) (Figura 30 e Tabela 12).

Tabela 12 - Valores aproximados da distância entre o resíduo de triptofano da HSA e alguns ligantes específicos de sítio I ou II na proteína determinados pelo *software RASMOL*.

| Ligante | Sítio preferencial na HSA | Distância aproximada entre a molécula e o triptofano (Å) |
|--|----------------------------------|---|
| Varfarina (ID PDB: 2bxd) | I | 10,13 |
| Ibuprofeno (ID PDB: 2bxg) | II | 21,23 |
| Dansilarginina (ID PDB: 2xvw) | I | 10,04 |
| Dansilsarcosina (ID PDB: 2xvq) | II | 20,34 |

Figura 30 - Representação realizada pelo *software RASMOL* de moléculas que preferem se ligar ao sítio I ou ao sítio II da HSA juntamente com o resíduo de triptofano da proteína.

(A) varfarina (ID PDB: 2BXD); (B) ibuprofeno (ID PDB: 2BXG); (C) dansilarginina (ID PDB: 2XVW); (D) dansilsarcosina (ID PDB: 2XVQ).



Os valores aproximados das distâncias entre o resíduo de triptofano na HSA e os ligantes de sítio I ou II mostraram que existe uma diferença de aproximadamente 10 Å entre os locais de ligação I e II quando o triptofano é utilizado como referencial. Além disso, esses valores complementam o trabalho de Jana et al. (2012) apresentado anteriormente, que afirmou, por meio de estudos de *docking* molecular, que sua sonda está no subdomínio IIA por apresentar uma distância de 15,9 Å do resíduo de triptofano, ou seja, na região do sítio I da HSA.

Considerando os valores de distância entre o resíduo de triptofano e os ligantes encontrados utilizando o *software RASMOL*, e comparando os obtidos por FRET para os dansilados, não é possível correlacioná-los, uma vez que, os dansilados apresentaram valores de distância próximos, não ocorrendo uma distinção entre os que se ligam preferencialmente

ao sítio I dos que se ligam ao sítio II da HSA. Os aminoácidos dansilados que se ligam preferencialmente ao sítio II da HSA apresentaram valores de distância (r) próximos aos valores obtidos para as sondas de sítio II por meio do *software RASMOL* (Tabela 12). Já os valores de distância obtidos para os dansilados que se ligam ao sítio I da HSA, não estão próximos aos valores observados para os ligantes de sítio I utilizando o *RASMOL* (Tabela 12), isto porque, na determinação de r pelo FRET considera-se a transferência de energia entre o doador e o aceitador, e neste caso em particular, a transferência é relativamente baixa, o que reflete o alto valor de r . Por outro lado, todos os dansilados apresentaram valores de J e R_0 semelhantes, reforçando que a determinação de r depende dos valores de E .

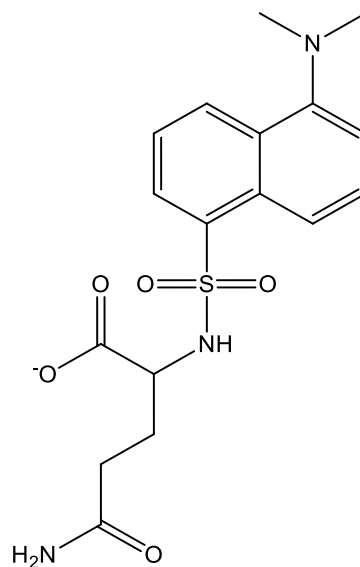
No trabalho de Samari et al. (2012) verifica-se uma situação bem semelhante aos dansilados que preferem se ligar ao sítio I da HSA. Os autores, por meio de estudos de competição utilizando varfarina e ibuprofeno, mostram que seu ligante, amodiaquina, prefere se ligar ao sítio I da HSA. Os estudos de FRET mostraram que a distância entre a amodiaquina e o resíduo de triptofano na proteína foi de 4,58 nm (45,8 Å), apresentando transferência de energia de apenas 3,8%. Quando os estudos de *docking* molecular foram realizados, mostraram que a distância entre o ligante e o resíduo de triptofano foi de apenas 4,6 Å, evidenciando a proximidade entre eles e ressaltando a preferência de ligação no sítio I da HSA (SAMARI et al., 2012). Outros trabalhos também ilustram valores de r superiores a 15 Å para sondas que possuem o sítio I da HSA como preferencial (ARICOV et al., 2019; MANJUSHREE; REVANASIDDAPPA, 2019; PATEL, BHARGAV R.; KERMAN, 2018).

A Equação 9 relaciona os valores da eficiência da transferência de energia (E) com a distância entre o doador e o aceitador (r) e o valor da distância de Foster (r_0). Como para os dansilados os valores de r_0 foram semelhantes independente do sítio preferencial de ligação, observando a equação, quanto menor for o valor de E , maior será o valor de r . Desta maneira, a eficiência da transferência de energia é um fator decisivo na determinação de r . Como para os dansilados de sítio I, os valores de E foram relativamente baixos, os valores de r determinados são muito maiores do que se era esperado para um ligante no sítio I, como discutimos anteriormente. Assim, somente após a realização dos estudos de *docking* molecular para os aminoácidos dansilados poderemos determinar com uma maior eficiência o valor da distância entre o resíduo de triptofano e os dansilados.

5.1.12 – Utilização da dansil-glutamina como sonda específica para o sítio I da HSA.

Os resultados apresentados anteriormente evidenciaram a menor afinidade dos aminoácidos dansilados de sítio I com a HSA quando comparados com os de sítio II. Observando novamente as estruturas dos dansilados de sítio I, nota-se que eles possuem carga positiva ($-\text{NH}_3^+$) sobre as suas cadeias laterais. Acreditamos que esta carga positiva seja a razão pela qual há a menor interação destes dansilados com a HSA, uma vez que, resíduos de lisina, por exemplo, podem provocar a repulsão, dificultando a entrada do dansilado no sítio I da HSA. De fato, é conhecido que a Lys199 tem um papel importante na interação de ligantes com o sítio I da albumina (GHUMAN *et al.*, 2005; RYAN *et al.*, 2011). Assim, uma forma de verificar a influência da carga positiva na afinidade destes compostos com a HSA foi a aplicação de uma nova sonda de sítio I isenta desta carga. A dansil-glutamina (DGlu) é uma sonda dansilada que possui o sítio I da HSA como preferencial (MACIAŹEK-JURCZYK *et al.*, 2020) (Figura 31) e não possui carga positiva sobre a sua cadeia lateral.

Figura 31 - Estrutura molecular da dansil-glutamina (DGlu).



Dansil-L-glutamina (DGlu)

Os estudos realizados para os demais dansilados envolvendo a fluorescência no estado estacionário, o tempo de vida de fluorescência, entre outros, também foram realizados para a DGlu. Inicialmente determinamos o valor do rendimento quântico de fluorescência para a DGlu. Os espectros da DGlu em solução tampão PBS, em álcool etílico e complexado a HSA

estão presentes na Figura 32. A Tabela 13 apresenta o valor do rendimento quântico da DGlu nesses diferentes microambientes, além de apresentar novamente os valores para uma sonda de sítio I, DL, e um para um dansilado de sítio II, DP, a fim de auxiliar na comparação.

Figura 32 - Espectros de fluorescência para a DGlu em solução tampão PBS, álcool etílico e complexado a HSA.

DGlu $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, HSA $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400\text{-}650 \text{ nm}$.

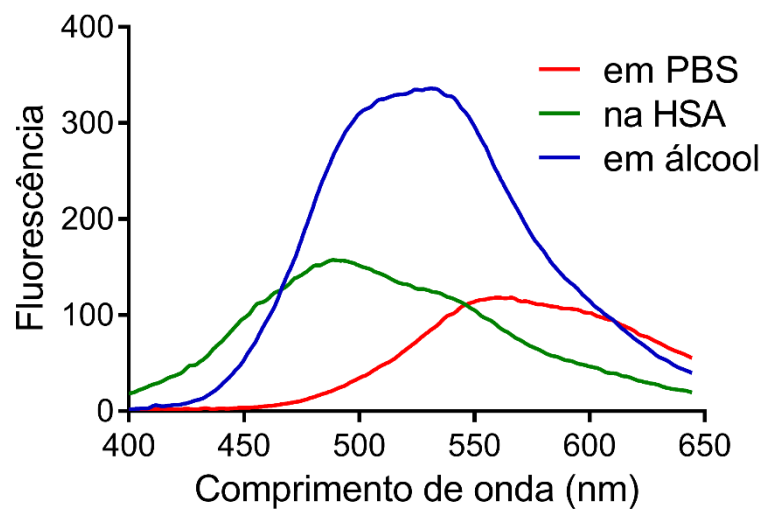


Tabela 13 - Valores de rendimento quântico para DL, DGlu e DP.

| | | Rendimento quântico | | |
|-------------|----------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | | PBS | HSA $30 \mu\text{M}$ | Em álcool |
| DL | Sítio I | $0,028 \pm 0,011$ | $0,095 \pm 0,004$ | $0,322 \pm 0,009$ |
| DGlu | | $0,043 \pm 0,005$ | $0,164 \pm 0,001$ | $0,326 \pm 0,028$ |
| DP | Sítio II | $0,021 \pm 0,009$ | $0,415 \pm 0,008$ | $0,120 \pm 0,006$ |

Os resultados mostraram que a DGlu possui valores de rendimento quântico de fluorescência próximos aos demais dansilados quando em PBS e em álcool etílico. Quando a DGlu está complexada com a HSA, ela apresenta valor de rendimento quântico cerca de duas vezes maior ao comparar os demais dansilados que se ligam preferencialmente ao sítio I da

HSA, evidenciando que a ausência de carga positiva sobre a cadeia lateral auxilia na interação com a proteína.

De forma semelhante, a análise de tempo de vida de fluorescência foi realizada para a DGlu em álcool etílico e complexada com a HSA. Os resultados estão listados na Tabela 14 juntamente com os resultados de DL e DP para a comparação. Nota-se que quando DGlu está complexado a HSA apresenta valor de tempo de vida semelhante ao observado para o DP. Como o tempo de vida obtido é resultado das contribuições das moléculas ligadas e as não-ligadas a HSA, é possível concluir que a contribuição das moléculas de DGlu ligadas é maior do que a observada para os demais dansilados de sítio I, evidenciando que a interação DGlu-HSA foi favorecida.

Tabela 14 - Tempo de vida para DL, DGlu e DP em álcool etílico e complexado a HSA.

| | | Tempo de vida de fluorescência (τ) | | | | | | | |
|----------|------|---|----------|----------|-------|-------|-------|----------------------|----------|
| | | Em álcool etílico | | | | | | | |
| | | τ_1 | τ_2 | τ_3 | f_1 | f_2 | f_3 | $\langle\tau\rangle$ | χ^2 |
| Sítio I | DL | 13,6 | - | - | 1,00 | - | - | 13,6 | 1,07 |
| | DGlu | 13,8 | - | - | 1,00 | - | - | 13,8 | 1,08 |
| Sítio II | DP | 5,05 | 13,5 | - | 0,06 | 0,94 | - | 13,1 | 0,99 |
| | | Complexado com a HSA | | | | | | | |
| | | τ_1 | τ_2 | τ_3 | f_1 | f_2 | f_3 | $\langle\tau\rangle$ | χ^2 |
| | | Sítio I | DL | 3,0 | 21,8 | - | 0,26 | 0,74 | - |
| DGlu | 3,3 | | 22,9 | - | 0,09 | 0,91 | - | 21,1 | 1,05 |
| Sítio II | DP | 5,9 | 21,7 | - | 0,03 | 0,97 | - | 21,3 | 1,00 |

A determinação da constante de associação, K_a , para a interação entre a DGlu e a HSA também foi realizada utilizando as três diferentes metodologias adotadas para os demais aminoácidos dansilados: (1) observando o aumento da fluorescência a partir da adição de HSA; (2) o aumento da fluorescência a partir da adição de DGlu e (3) a partir do *quenching* de fluorescência da HSA com adição de DGlu. A Figura 33 mostra os espectros obtidos para todas as metodologias citadas anteriormente. A Figura A 15 do anexo A apresenta os gráficos obtidos para os cálculos de K_a e K_{SV} em cada caso. Os valores K_a e da constante de *Stern-Volmer* determinada a partir do *quenching* para o DGlu estão listados da Tabela 15. Esta

tabela também apresenta os valores para um dansilado de sítio I, DL, e um de sítio II, DP, a fim de comparação.

Figura 33 - Espectros de fluorescência da DGlu para a determinação de K_a . (A) aumento de fluorescência provocado pela adição de HSA. (B) aumento de fluorescência provocado pela adição de DGlu. (C) *quenching* de fluorescência.

Em (A) DGlu $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, HSA $0-20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}}=340 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 400-600 \text{ nm}$; em (B) DGlu $1-12 \mu\text{mol L}^{-1}$, HSA $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}}=340 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 400-600 \text{ nm}$; em (C) DGlu $0-20 \mu\text{mol L}^{-1}$, HSA $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}}=295 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 310-410 \text{ nm}$.

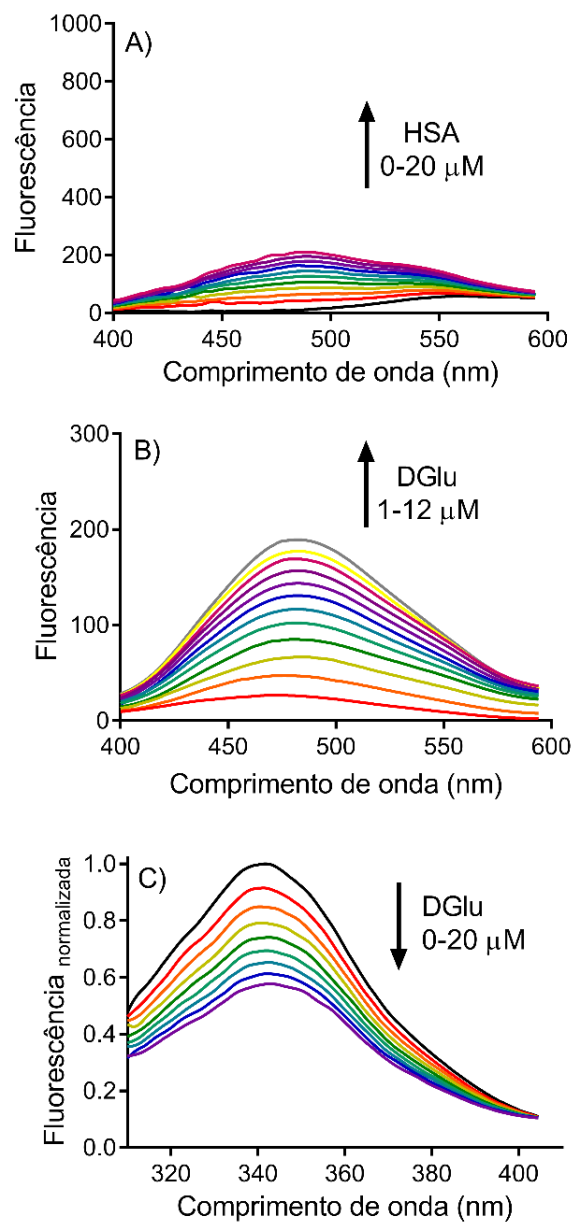


Tabela 15 - Valores de K_a para o DL, DGlu e DP em associação com a HSA.

| | | Constante de associação - K_a | | | |
|-------------|----------|---|---|--|---|
| | | K_a ($\times 10^4$) $\text{mol}^{-1} \text{L}^a$ | K_a ($\times 10^4$) $\text{mol}^{-1} \text{L}^b$ | K_{sv} ($\times 10^4$) $\text{mol}^{-1} \text{L}^c$ | K_a ($\times 10^4$) $\text{mol}^{-1} \text{L}^c$ |
| DL | Sítio I | $2,4 \pm 0,01$ | $2,3 \pm 0,02$ | $2,7 \pm 0,3$ | $5,3 \pm 0,2$ |
| DGlu | | $6,2 \pm 0,04$ | $4,8 \pm 0,04$ | $4,1 \pm 0,03$ | $4,4 \pm 0,06$ |
| DP | Sítio II | $10 \pm 0,02$ | $10,6 \pm 0,2$ | $7,7 \pm 0,1$ | $20,5 \pm 3,5$ |

^a determinada a partir do aumento de fluorescência com a adição de HSA

^b determinada a partir do aumento de fluorescência com a adição do dansilado

^c determinada a partir do *quenching* de fluorescência

Os valores de K_a para a interação entre a DGlu e a HSA foram cerca de duas vezes maiores quando comparamos com os demais compostos que se ligam preferencialmente ao sítio I da albumina. Estes resultados refletem o que pode ser observado nos gráficos dos espectros de fluorescência (Figura 33), em que é possível verificar que o aumento de fluorescência provocado pela adição de HSA ou de DGlu é maior do que o observado para os demais dansilados. Além disso, considerando concentrações semelhantes, enquanto o DL provoca menos de 40% de supressão da fluorescência da HSA (Figura 14), a DGlu consegue suprimir cerca de 50%. Estes resultados reforçam que a ausência da carga positiva sobre a cadeia lateral auxilia no aumento da afinidade entre o dansilado e a proteína. Os valores de K_a obtidos para a DGlu estão próximos ao valor encontrado por M. Maciażek-Jurczyk e seus colaboradores que foi de $4,54 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{L}$ (MACIAŻEK-JURCZYK et al., 2020).

A anisotropia de fluorescência também foi utilizada para estudar a interação entre o DGlu e a HSA. Como mencionado anteriormente o aumento da anisotropia está relacionado a diminuição do movimento da sonda provocado, por exemplo, pela ligação no interior da cavidade da proteína. A Tabela 16 apresenta os valores de anisotropia para o DGlu e para o DL e o DP a fim de comparação.

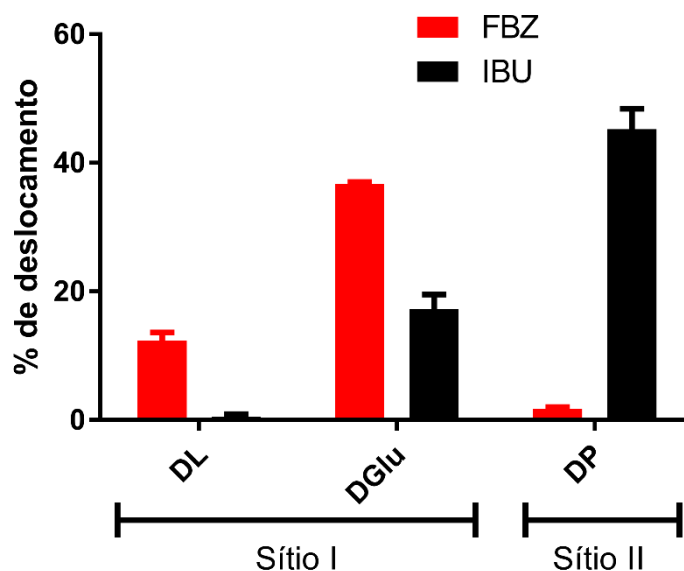
Tabela 16 - Valores de anisotropia de fluorescência para o DL, DGlu e DP na ausência e na presença de HSA.

| | | Anisotropia | | |
|----------|-------------|--------------|--------------------|--------------------|
| | | Em PBS | HSA _{1:1} | HSA _{sat} |
| Sítio I | DL | 0,028 | 0,075 | 0,192 |
| | DGlu | 0,021 | 0,171 | 0,184 |
| Sítio II | DP | 0,015 | 0,175 | 0,192 |

Os resultados mostram que o DGlu se liga a HSA, pois apresenta o aumento no valor de anisotropia devido a limitação do movimento provocada pela ligação com a proteína. Comparando os valores obtidos para o DL e DGlu na proporção 1:1 com HSA, verifica-se que a DGlu apresenta um resultado maior indicando estar mais restrita. De fato, o valor de anisotropia obtido é uma média entre as contribuições das moléculas que estão mais restritas com as que estão livres para a movimentação, revelando, então, que a DGlu apresenta afinidade diferente dos demais dansilados de sítio I, e, neste caso, semelhante aos dansilados de sítio II.

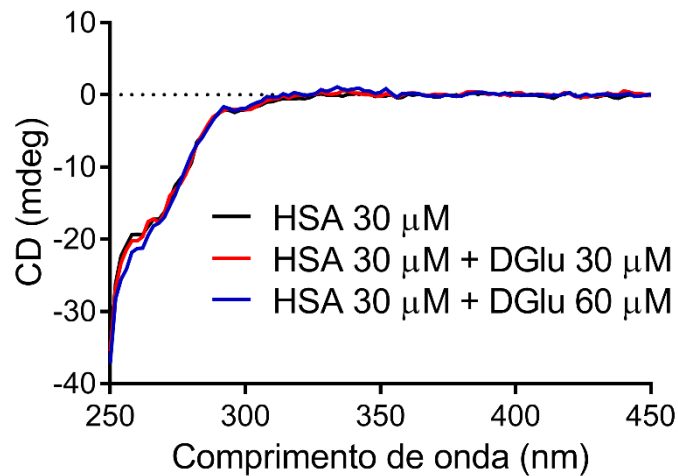
Um dos grandes problemas quando os dansilados de sítio I são aplicados em estudos de competição é não serem capazes de deslocar ligantes específicos deste sítio. Como discutimos anteriormente, isto pode ser explicado de diversas formas, como por exemplo, o fato do sítio I ser grande e capaz de abrigar três moléculas no mesmo instante (AL-HARTHI et al., 2019). Porém ao não ser capaz de deslocar um ligante de seu sítio, a utilização de um dansilado como sonda específica passa a ser ineficiente. Na Figura 34 mostramos que os dansilados de sítio II são capazes de deslocar uma porcentagem maior de compostos de seu sítio quando são comparados com os de sítio I. Assim, a DGlu foi aplicada em estudos de deslocamento a fim de verificar a sua capacidade de deslocar ligantes específicos para o seu sítio. A Figura 34 apresenta um gráfico com a porcentagem de deslocamento para um ligante de sítio I, FBZ, e um ligante de sítio II, IBU, após a adição de DGlu.

Figura 34 - Porcentagem de deslocamento para DL, DGlu e DP após a adição de fenilbutazona (FBZ) e ibuprofeno (IBU).



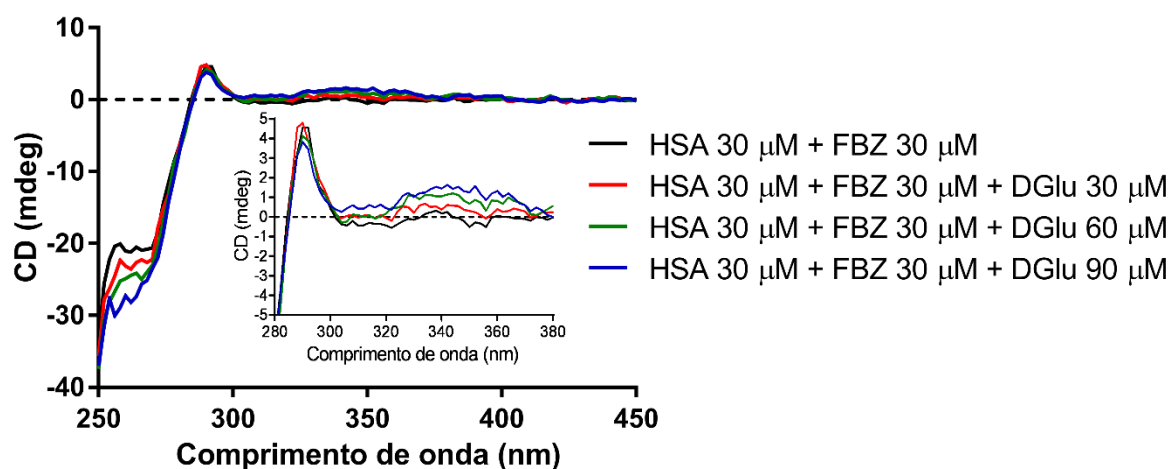
A Figura 34 mostra que a DGlu é capaz de deslocar a FBZ de forma semelhante que o DP quando desloca o IBU de seu local de ligação. Porém a DGlu também foi capaz de deslocar o IBU de seu sítio de ligação, e é importante destacar aqui, que o sítio de ligação do IBU é diferente do sítio da DGlu. Desta forma, podemos concluir que apesar da DGlu deslocar o ligante de seu sítio de ligação, a sua especificidade como sonda ainda não é a ideal quando este tipo de experimento é utilizado.

A interação da DGlu com a HSA também foi analisada utilizando a técnica de dicroísmo circular. Como discutido na seção 5.1.7, os dansilados de sítio II apresentaram um novo sinal de dicroísmo circular induzido devido a indução da quiralidade nos compostos a partir do microambiente assimétrico da cavidade da proteína. Neste caso, a DGlu não apresentou sinal de dicroísmo circular induzido de forma semelhante aos demais dansilados de sítio I (Figura 35).

Figura 35 - Espectro de dicroísmo circular para a DGlu em associação com a HSA.

O dicroísmo circular também foi aplicado em estudos de deslocamento para verificar a especificidade da DGlu pelo sítio I da HSA. Neste contexto, nós utilizamos a fenilbutazona (FBZ) e o sinal de dicroísmo circular que há com a sua associação com HSA. A FBZ, assim como a DGlu, é um ligante de sítio I, desta maneira, neste experimento adicionamos o dansilado ao complexo FBZ-HSA e, como podemos observar na Figura 36, ocorreu o aparecimento de um novo sinal de dicroísmo circular induzido em torno de 340 nm. Este novo sinal é relativo à indução da quiralidade a DGlu quando ligada a HSA. Por outro lado, a existência do sinal da FBZ após a adição de DGlu indica que o fármaco ainda está ligado a proteína. Assim, é possível que ambas estejam ligadas no sítio I da HSA ou que a DGlu esteja ligada em um sítio diferente do seu preferencial.

Figura 36 - Espectro de dicroísmo circular do complexo FBZ-HSA com a adição de DGlu.



Os resultados envolvendo a DGlu mostraram que não possui a carga positiva sobre a cadeia lateral faz com que aumente a afinidade do dansilado pelo sítio I da HSA.

O experimento de transferência de energia ressonante de fluorescência, FRET, também foi realizado para a DGlu. Quando foi utilizado FRET para os demais dansilados (seção 5.1.11), ficou concluído que os valores da distância (r) entre a espécie doadora e a aceitadora é bastante discrepante para as sondas de sítio I quando se compara com os obtidos por *docking* molecular. Esta discrepância ocorre uma vez que eles dependem da eficiência de transferência de energia (E) e, neste caso, o pequeno valor obtido contribui para um valor de r maior do que o esperado.

A Figura 37 apresenta a sobreposição dos espectros de absorbância e fluorescência utilizados para o cálculo de FRET da DGlu. Os resultados de R_0 , E , r e da área da sobreposição dos espectros de fluorescência do doador e da absorção do aceitador (J) estão listados na Tabela 17. Para a DGlu o valor da distância entre o doador e o aceitador pode ser determinado utilizando FRET pois ela obedece ao critério da faixa $r = 0,5 R_0$ à $r = 2R_0$ necessária para aplicar esta técnica (LAKOWICZ, 2006).

Figura 37 - Sobreposição dos espectros de fluorescência e absorbância para a aplicação de FRET para a DGlu.

HSA 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, DGlu 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, fluorescência: $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 310\text{-}550 \text{ nm}$; absorbância: $\lambda = 310\text{-}600 \text{ nm}$.

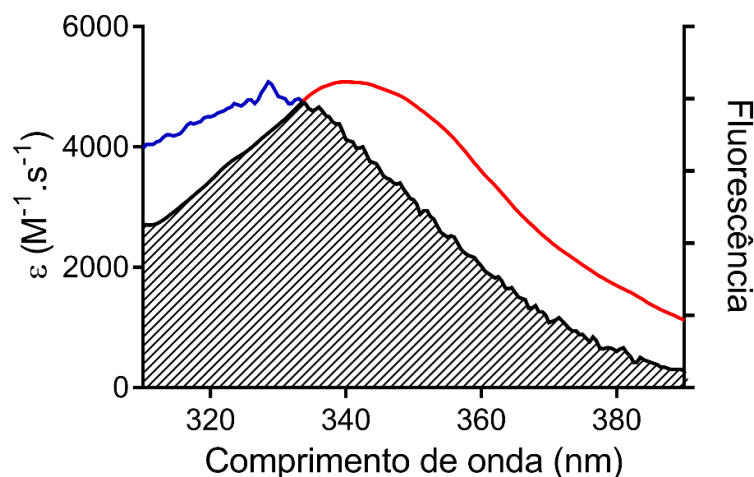


Tabela 17 - Valores de J, E, R₀ e r para a DGlu e determinados por FRET.

| | | J (M⁻¹.cm⁻¹.nm⁴) | E (%) | R₀ (Å) | r (Å) |
|-----------------|-------------|--|--------------|--------------------------|--------------|
| Sítio I | DL | 2,6.10 ¹³ | 6,6 | 20,0 | 31,2 |
| | DGlu | 3,3.10¹³ | 10,5 | 20,7 | 29,6 |
| Sítio II | DP | 1,5.10 ¹³ | 24,0 | 18,2 | 22,0 |

Observando os valores de J, E, R₀ e r obtidos para a DGlu verificamos que apesar da porcentagem de transferência de energia (E %) ser maior para este dansilado quando comparado com as demais sondas de sítio I, o valor de r ainda é maior do que o esperado para uma sonda localizada nesta cavidade da proteína. Novamente, os resultados mostraram que a técnica de FRET não é a ideal para ser utilizada para a determinação do valor de r.

Os resultados envolvendo a DGlu mostraram que esta sonda apresenta valores de K_a superiores aos demais dansilados de sítio I, além de possuir comportamento semelhante aos dansilados de sítio II, quando se considera as técnicas de tempo de vida e anisotropia de fluorescência. Assim, pode-se concluir que a ausência da carga positiva sobre a cadeia lateral contribui positivamente para a interação dansilado-HSA.

5.1.13 – Estudos de *docking* molecular

Os estudos de *docking* molecular foram realizados a fim de se obter informações sobre a interação entre os dansilados com a HSA. Os resultados experimentais mostraram que os aminoácidos dansilados que se ligam ao sítio II da HSA possuem afinidade maior com a proteína. Além disso, foi verificado que a ausência da carga positiva sobre a cadeia lateral do dansilados (DGlu) contribui positivamente para aumentar a interação entre os dansilados e o sítio I da HSA.

Neste estudo, cada aminoácido dansilado foi analisado no seu sítio preferencial de ligação. Foram obtidas 100 execuções independentes do *docking* para cada aminoácido dansilado em interação com a HSA. Utilizando o Ligplot, foram determinadas as interações entre a HSA e a estrutura de menor energia de cada dansilado em um determinado sítio de ligação. A Figura 38 apresenta as interações para DL no interior do sítio I e DP no interior do sítio II. A Tabela 18 apresenta os valores de energia para os dansilados nos diferentes locais de ligação na HSA.

Figura 38 - Interações entre DL e DP com a HSA a partir do *docking* molecular.

(A) DL no interior no sítio I da HSA e (B) DP no interior do sítio II da HSA.

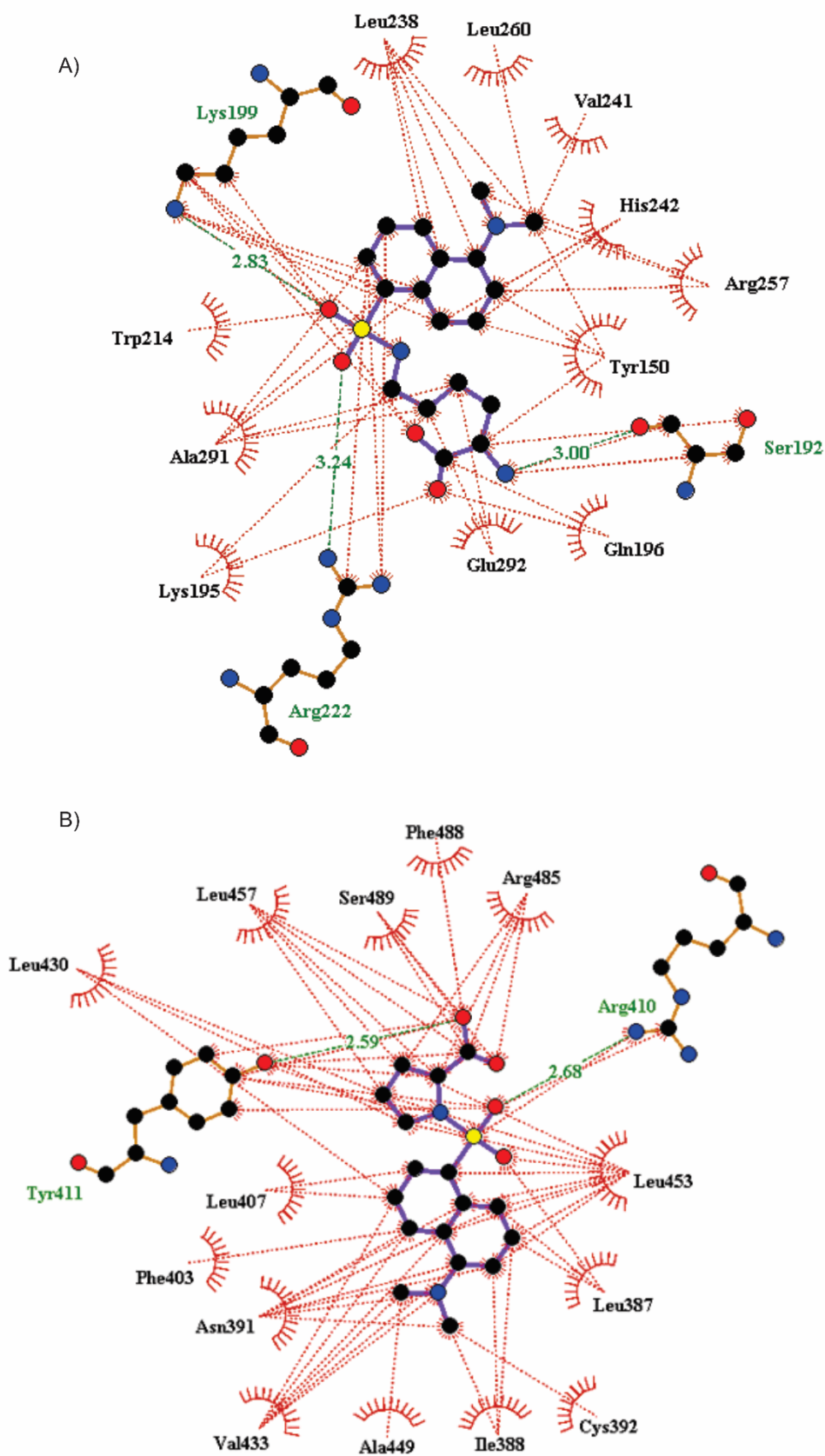


Tabela 18 - Valores de *score* para a interação entre os aminoácidos dansilados e a HSA.

| | | Valores de Score (kJ mol ⁻¹) | |
|----------|------|--|----------|
| | | Sítio I | Sítio II |
| Sítio I | DA | -5,38 | |
| | DL | -8,17 | |
| | DC | -8,33 | |
| | DGlu | -8,42 | |
| Sítio II | DP | | -6,48 |
| | DG | | -7,00 |
| | DN | | -6,54 |
| | DS | | -7,05 |

Diferentemente do observado para os resultados experimentais, os aminoácidos dansilados que possuem preferência para o sítio I da HSA apresentaram melhores valores de energia (*score*) quando comparados com os de sítio II. Como os aminoácidos dansilados que possuem especificidade pelo sítio I apresentam carga positiva em sua cadeia lateral, o acesso a este sítio pode ser dificultado devido a presença de aminoácidos carregados positivamente (Lys195, Lys199, Arg218 e Arg222) (AL-HARTHI *et al.*, 2019) em sua entrada, o que explicaria os dados obtidos experimentalmente. A Figura A 16 e Figura A 17 no Anexo A mostram as interações das poses de menor energia para os aminoácidos dansilados no sítio I e no sítio II, respectivamente.

Para verificar se nossa hipótese baseada nos estudos computacionais e experimentais estavam corretas buscamos em uma parceria a aplicação de estudos de dinâmica molecular a fim de auxiliar na compreensão do comportamento dos aminoácidos dansilados em associação com a HSA.

Estudos de *docking* molecular combinado com dinâmica molecular (*molecular dynamics*, MD) foram realizados em parceria pelo Prof. Dr. Sergey A. Samsonov da Universidade de Gdańsk. Os resultados obtidos por ele estão de acordo com os apresentados

anteriormente e mostram a maior afinidade dos dansilados de sítio I com a HSA. Nesses estudos foi aplicada uma abordagem totalmente atômica na MD e dois métodos de cálculo de energia livre a partir do MD. Todas as simulações mostraram um comportamento estável dos complexos, não apresentando mudança conformacional significativa ou dissociação do ligante. Os dados obtidos neste estudo em concordância com os resultados experimentais mostraram que os aminoácidos dansilados carregados/hidrofílicos preferem o sítio I, enquanto os hidrofóbicos preferente o sítio II da HSA. Observando a Tabela 19, verifica-se que a energia livre de ligação da DGlu sugere que esta sonda apresenta características intermediárias quando comparada com o sítio I e o sítio II, fato semelhante ao observado nos dados experimentais. Analisando os componentes da energia livre da ligação temos que o sítio I é mais polar do que o sítio II, enquanto o sítio II oferece mais oportunidades para estabelecer interações de van der Waals. Desta forma, os dansilados hidrofóbicos possuem um componente de energia livre de van der Waals mais favorável do que o observado para os polares/carregados.

Em todas as simulações foi possível verificar que o componente de energia livre de van der Waals contribui mais favoravelmente para a energia livre de ligação total do que o componente relativo as interações eletrostáticas. A partir da decomposição de energia livre de ligação por resíduo, determinou-se que os resíduos de aminoácidos Lys223, Arg242, Arg246 e Leu262 são os resíduos-chave para a interação dos aminoácidos dansilados no sítio I (exceto para DG que devido ao seu menor tamanho não recebe contribuição substancial da Leu262) (Tabela A 1 – Anexo A). No sítio II, Leu431, Arg434, Lys438 e Leu477 são os resíduos de aminoácidos mais cruciais para a ligação. A Tabela 19 mostra que a ligação dos dansilados polares/carregados no sítio I é mais forte do que os hidrofóbicos no sítio II. Como mencionamos anteriormente, este resultado é o oposto dos dados experimentais. Para entender por que os estudos teóricos produziram estes resultados aparentemente controversos, o Prof. Sergey aplicou a abordagem US MD. Esta técnica permite calcular o Potencial de Força Média (*Potential of Mean Force*, PMF) mediante a alteração da coordenada de reação do sistema. Nos sistemas, a coordenada de reação foi definida como a distância entre um dansilado e átomos da estrutura de um dos resíduos do sítio I. Assim, o aumento desta coordenada de reação descreve o processo de desacoplamento do ligante, e pode ser estimada a barreira de energia livre envolvida neste processo. Foi analisada a ligação de DA e DP nos sítios I e II, respectivamente. Restrições harmônicas foram usadas para fixar a estrutura da proteína e por isso, os resultados apresentados não devem ser estritamente considerados

quantitativos. A análise visual dos dois sítios sugere que a entrada e a saída do sítio I são energeticamente mais exigentes do que o observado para o sítio II, devido ao fato deste sítio ser mais “fechado” pela presença de numerosas cadeias laterais de aminoácidos. Os dados de PMF (Figura 38) mostra que a barreira de energia livre para DA é significativamente maior do que para DP. Comparando simplesmente DA e DP, DA está ligado mais fortemente no sítio I do que DP no sítio II. Porém, a diferença na altura das barreiras de energia livre reforça os dados experimentais: o dansilado pode acessar mais facilmente o sítio II do que o sítio I, o que explica os valores de constante de associação obtidos nos estudos experimentais.

Tabela 19 - Análise de energia livre de ligação de MM-GBSA de complexos de HSA-aminoácidos dansilados.

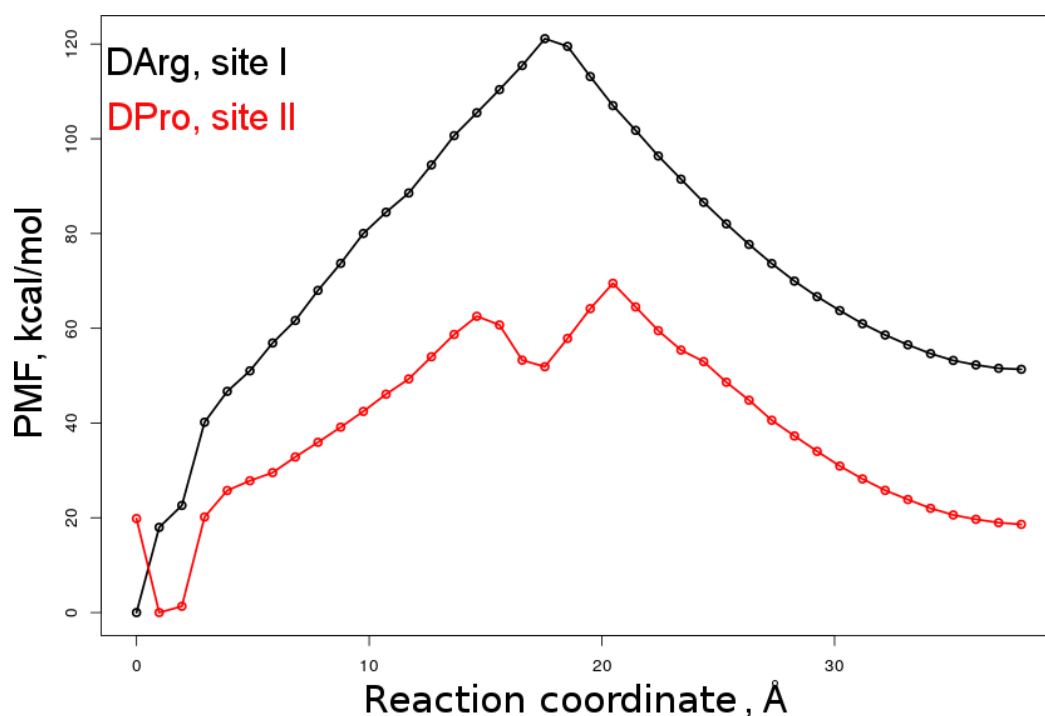
| | Aminoácido dansilado | ΔG kcal/mol | $\Delta GVDW$ kcal/mol | $\Delta GEEL$ kcal/mol | $\Delta GESURF$ kcal/mol | $\Delta GEEL+\Delta GEGB$ kcal/mol |
|-----------------|---------------------------------|---|--|--|--|--|
| Sítio I | DA | -65.9±9.2 | -38.8±4.9 | -232.0±21.3 | -7.1±0.5 | -20.0 |
| | DL | -62.5±8.3 | -42.5±3.9 | -226.4±33.1 | -7.4±0.3 | -12.6 |
| | DGlu | -57.6±5.3 | -42.2±3.9 | -39.8±17.8 | -6.4±0.3 | -9.1 |
| | DP | -33.0±7.7 | -34.9±3.5 | 17.4±21.9 | -5.2±0.4 | 7.0 |
| | DG | -43.2±4.9 | -35.5±3.2 | -14.1±21.7 | -5.7±0.2 | -1.9 |
| | DN | -36.2±3.7 | -45.2±3.7 | -32.1±8.1 | -6.2±0.3 | 15.2 |
| Sítio I' | DP | -37.5±4.3 | -37.8±3.3 | -2.0±19.1 | -5.2±0.3 | 5.5 |
| | DG | -34.2±4.3 | -36.0±2.9 | 4.9±15.3 | -5.5±0.2 | 7.3 |
| | DN | -30.9±3.4 | -41.9±2.8 | -13.4±5.8 | -5.8±0.3 | 16.8 |
| Sítio II | DA | -47.9±5.3 | -46.5±4.0 | -107.5±17.7 | -7.2±0.3 | 5.8 |
| | DL | -44.9±8.0 | -41.5±3.4 | -112.4±21.4 | -6.5±0.5 | 3.1 |
| | DGlu | -52.8±4.4 | -44.9±3.7 | -99.1±16.7 | -7.0±0.2 | -0.9 |
| | DP | -41.9±6.5 | -41.7±2.9 | -77.0±22.2 | -6.1±0.2 | 6.0 |
| | DG | -43.5±5.3 | -40.0±3.1 | -78.1±20.2 | -6.0±0.2 | 2.6 |
| | DN | -40.7±3.5 | -49.6±2.8 | -22.7±4.5 | -6.9±0.2 | 15.8 |

ΔG , $\Delta GVDW$, $\Delta GEEL$, $\Delta GESURF$, $\Delta GEEL+\Delta GEGB$: energia livre de ligação total, componente de van der Waals, componente eletrostático no vácuo, componente de solvatação apolar, proporcional à área de superfície acessível, eletrostática total com a consideração do modelo de solvente implícito como uma soma de dois componentes de energia livre, respectivamente. Todos os valores de energia livre estão em kcal / mol. Valores médios e desvios padrão são fornecidos. Sítio I': o mesmo que o local I, mas a orientação (para DPhe de PDB ID: 2XW0) do aminoácido dansilado é diferente (os grupos dansil e aminoácidos são trocados).

A Figura A 18 (Anexo A) apresenta os resíduos de aminoácidos que contribuem para a ligação de DA e DP nos sítios I e II, respectivamente, após o processo de dissociação. Como esperado, o processo de dissociação é o reverso ao processo de ligação, e é dirigido por resíduos carregados positivamente (Arg242, Arg248, Lys477 e Arg434, Lys569, sítio I e II, respectivamente). As cadeias laterais destes aminoácidos são longas e flexíveis sugerindo que mudanças conformacionais locais nas cadeias laterais são cruciais para o processo de ligação/dissociação.

Figura 39 - PMF de DArg (DA, em preto) e DPro (DP, em vermelho) nos sites I e II, respectivamente, calculados pela abordagem Umbrella Sampling.

A coordenada da reação foi definida como a distância entre os centros de massa dos aminoácidos dansilados e os átomos do esqueleto de His242 e Leu453 para os locais I e II, respectivamente. Para maior clareza, os valores iniciais da coordenada de reação foram traçados a partir de zero. Figura confeccionada pelo prof. Sergey.



Os estudos desenvolvidos pelo prof. Sergey corroboram com os obtidos anteriormente, reafirmando que a entrada do sítio I dificulta a interação entre os aminoácidos dansilados e HSA, o que é refletido nos resultados experimentais.

5.1.14 – Considerações finais sobre os estudos envolvendo os aminoácidos dansilados com a HSA

Os resultados experimentais destacaram que os aminoácidos dansilados que preferencialmente se ligam ao sítio II da HSA apresentam maior afinidade com a proteína. Inicialmente, os resultados de rendimento quântico de fluorescência em etanol evidenciaram que a menor afinidade dos aminoácidos dansilados com o sítio I da HSA não é relacionada a estrutura da sonda, já que, em um meio com maior hidrofobicidade (etanol), todos os dansilados apresentaram resultados semelhantes.

A disparidade entre os aminoácidos dansilados de sítio I e os de sítio II foi verificada em todas os estudos experimentais. Na determinação da constante de associação, ficou nítida a diferença na afinidade das sondas com a proteína. Os ensaios de competição mostraram que a menor afinidade dos dansilados de sítio I pode comprometer a especificidade dessas sondas neste sítio da HSA. A proposta de que os resíduos de aminoácidos carregados positivamente que se encontram na entrada da cavidade do sítio I poderiam influenciar na afinidade dos dansilados com a proteína se confirmou. Desta forma, a utilização da dansilglutamina reforçou que o problema da menor interação entre os aminoácidos dansilados e o sítio I da HSA poderia estar relacionado a carga positiva em suas cadeias laterais. A dansilglutamina, também possui preferência pelo sítio I da HSA e não possui carga em sua estrutura. A sua aplicação nas análises experimentais mostrou que ela possui maior afinidade com a HSA do que os demais dansilados de sítio I. A confirmação da dificuldade que os aminoácidos dansilados tem em acessar o sítio ocorreu a partir dos estudos de *docking* molecular e dinâmica molecular.

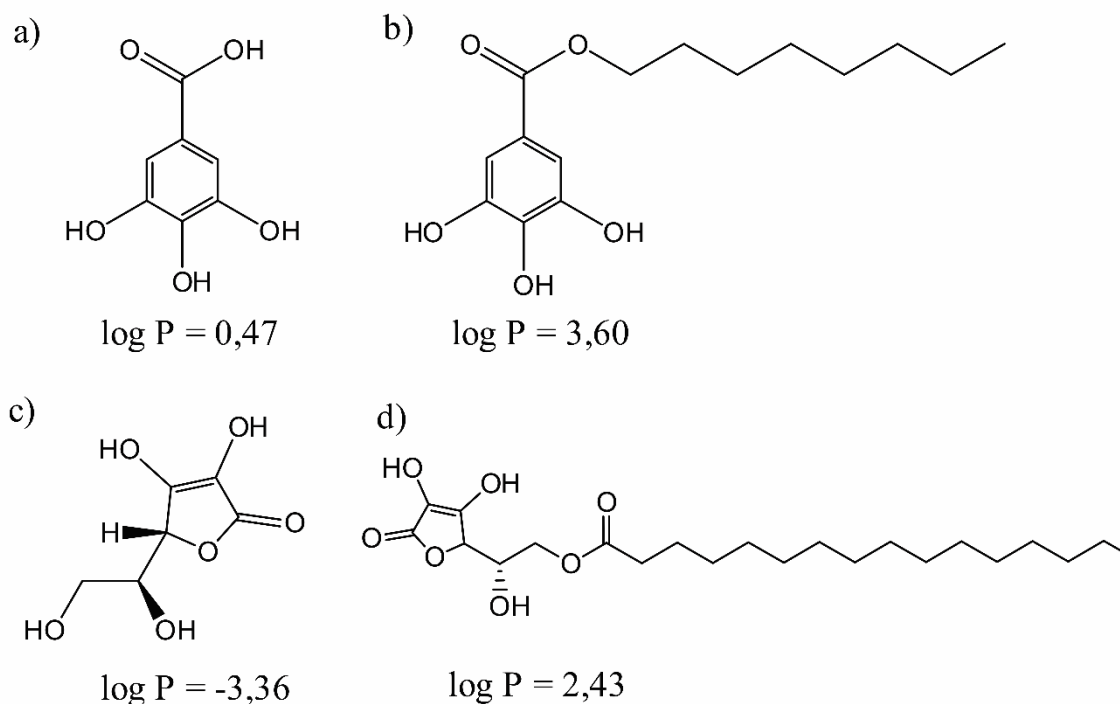
Diferentemente dos resultados obtidos experimentalmente, os estudos de *docking* molecular mostraram que os aminoácidos dansilados de sítio I apresentaram maior valor de energia de ligação quando comparados com os aminoácidos dansilados de sítio II. Este resultado, aparentemente contraditório se comparado aos estudos experimentais, foi esclarecido pelos estudos de dinâmica molecular realizados em parceria com o prof. Sergey, que mostraram que a menor afinidade dos aminoácidos dansilados com o sítio I da HSA pode ser explicada considerando o acesso a cavidade.

Uma vez esclarecida todas as características dos aminoácidos dansilados de sítio I e II, propomos que a melhor opção para caracterização de ligantes de sítio I em albumina humana é a dansilglutamina, pois é a única que não apresenta carga positiva em sua cadeia lateral.

Capítulo 2 - Aplicação de sondas de diferentes hidrofobicidades para a verificação da afinidade de ligação com a albumina.

Estudos apontam que sondas com maior hidrofobicidade possuem maior afinidade com a albumina (SINGH, T. SANJOY; MITRA, 2011). Nos nossos estudos envolvendo as sondas dansiladas, a DA, por exemplo, apresenta um valor de $\log P$ de 1,16 enquanto o valor de $\log P$ para a DP é de 2,33. Desta forma, para investigar se a diferença de hidrofobicidade poderia ser a causa das distinções encontradas na afinidade dos dansilados com a proteína, utilizamos dois compostos com diferentes hidrofobicidades, o ácido gálico (G0) e o galato de octila (G8) (Figura 40) e, concomitante com os estudos realizados para os aminoácidos dansilados, efetuamos ensaios de fluorescência no estado estacionário, calorimetria de titulação isotérmica, tempo de vida de fluorescência e *docking* molecular. A fim de reforçar nossos resultados, aplicamos estudos de fluorescência no estado estacionário para o ácido ascórbico e o seu éster, palmitato de ascorbila (Figura 40).

Figura 40 - Estruturas moleculares e o valor do coeficiente de partição ($\log P$). (a) ácido gálico; (b) galato de octila; (c) ácido ascórbico; (d) palmitato de ascorbila.



5.2.1 – Interação entre o G0 e G8 com a albumina: análises utilizando a fluorescência no estado estacionário.

A fluorescência intrínseca da albumina foi utilizada para a estudo da interação com o G8 e o G0. Os resultados apresentados na Figura 41 mostram a comparação entre o G0 e G8 e evidenciam a melhor eficácia do G8 como um supressor na fluorescência da proteína. Mantendo a concentração de albumina constante em $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, somente $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de G8 foram suficientes para provocar 58% de supressão. Utilizando os dados obtidos para a supressão da fluorescência da albumina, foram calculados os valores da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e a constante bimolecular (k_q) utilizando a Equação 5. O efeito de filtro interno foi corrigido pela Equação 4. A Figura 42 apresenta os espectros de UV-Vis do G0 e do G8, evidenciando que qualquer efeito de filtro interno que possa ocorrer é semelhante para os dois compostos, já que eles apresentam espectros de UV-Vis semelhantes. Os valores de K_{SV} , K_a e k_q estão listados na Tabela 20.

Figura 41 - Quenching da fluorescência intrínseca da albumina provocada pela interação com G0 e G8.

(a) BSA $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e G0 $0-12 \mu\text{mol L}^{-1}$; (b) BSA $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e G8 $0-6 \mu\text{mol L}^{-1}$; (c) Stern-Volmer (G0, $K_{sv} = 3,95 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$; G8, $K_{sv} = 1,19 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$); (d) Determinação da constante de associação (G0, $K_a = 5,2 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, $R^2 = 0,9615$; G8, $K_a = 2,2 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, $R^2 = 0,9976$).

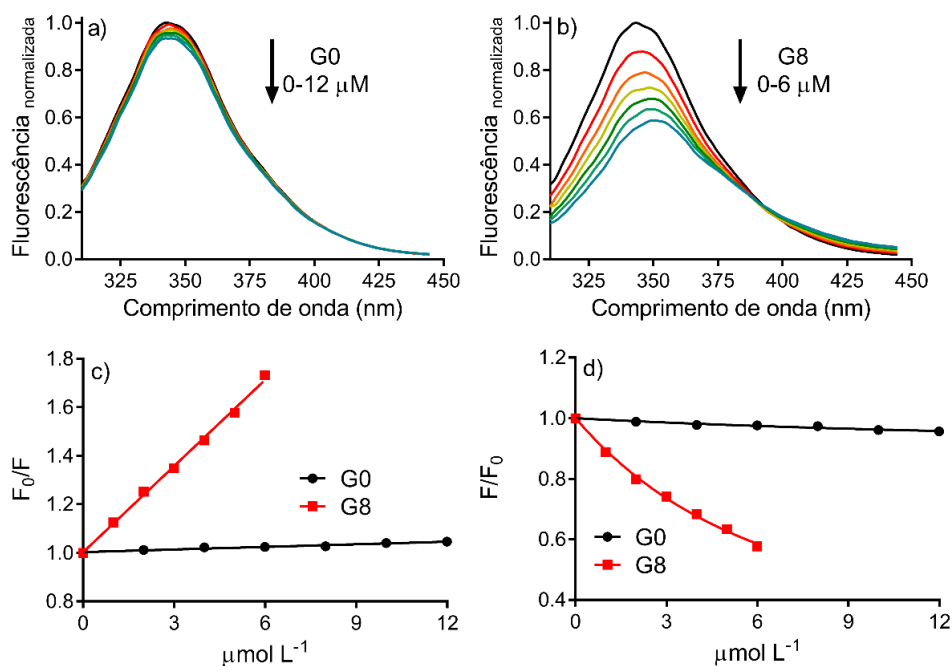
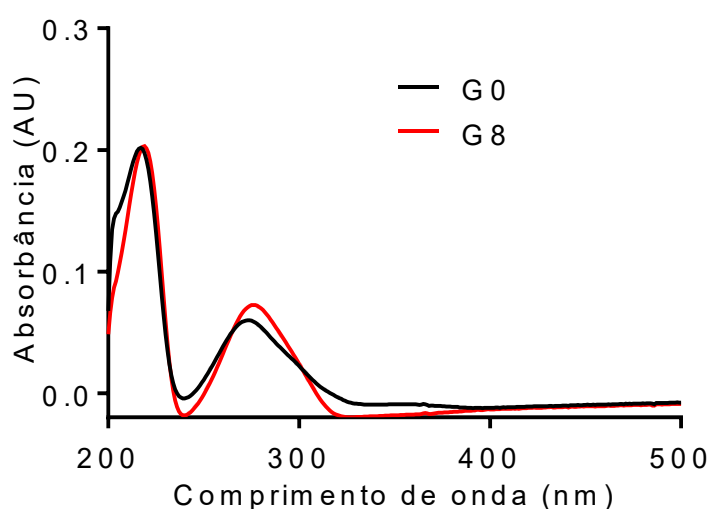


Tabela 20 - Valores de K_{SV} e K_q para o G0 e o G8.

| | K_{SV} ($\text{mol}^{-1} \text{L}$) | K_a ($\text{mol}^{-1} \text{L}$) | K_q ($\text{mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$) |
|-----------|---|--------------------------------------|---|
| G0 | $3,95 \times 10^3$ | $5,2 \times 10^4$ | $6,58 \times 10^{11}$ |
| G8 | $1,19 \times 10^5$ | $2,2 \times 10^5$ | $1,98 \times 10^{13}$ |

Figura 42 - Espectros de UV-Vis para o G0 e G8.

G0 e G8 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em álcool etílico.



A Tabela 20 mostra que a K_{SV} para o G8 ($1,19 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$) foi cerca de trinta vezes maior do que a K_{SV} para o G0 ($3,95 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$). A constante bimolecular (k_q) foi calculada assumindo que o tempo de vida do triptofano excitado na proteína (τ_0) é de $6 \times 10^{-9} \text{ s}$ (SIEMIARCZUK et al., 2004). A magnitude dos valores de k_q é uma indicação da complexação entre os ligantes e a proteína. Isto porque, é bem estabelecido que um valor de k_q maior do que $10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$, o valor da reação bimolecular controlada por difusão, não pode ser correlacionado com o *quenching* colisional (LAKOWICZ, 2006; ROY, 2004; VAN DE WEERT; STELLA, 2011) e, portanto, o fenômeno estático deve estar envolvido no *quenching* de fluorescência.

O aumento da afinidade do G8 comparado ao G0 com a albumina não é um caso isolado, pois em geral moléculas hidrofóbicas apresentam maiores constantes de associação com a albumina do que as hidrofílicas. Por exemplo, a metilação de grupos hidroxil em compostos fenólicos aumenta a constante de ligação (ZHANG, YUNYUE et al., 2018). De

maneira similar, o aumento da hidrofobicidade devido a grupos metoxi foi demonstrado como um fator chave na afinidade com proteínas plasmáticas (DINIZ et al., 2008). Assim como, a presença de cadeias alquilas aumentam a afinidade de derivados de ácido cinâmico com a albumina (SINGH, T. SANJOY; MITRA, 2011).

A maioria dos artigos encontrados na literatura mostram uma diminuição do valor da constante de Stern-Volmer associado ao aumento da temperatura e o mecanismo de *quenching* é então classificado como estático (JAHANBAN-ESFAHLAN et al., 2017; JAHANBAN-ESFAHLAN; PANAHI-AZAR; SAJEDI, 2015, 2016; ROUFEGARINEJAD; AMAROWICZ; JAHANBAN-ESFAHLAN, 2019). Contudo, há vários exemplos em que a diminuição da constante de Stern-Volmer é observada com o aumento da temperatura e ainda assim o *quenching* é estático. Por exemplo, no artigo “*human serum albumin binding of certain antimalarials*”, foi realizada a comparação de estruturas moleculares de derivados de cloroquina. A diferença entre os dois compostos estudados é o comprimento da cadeia carbônica e conseqüentemente a sua hidrofobicidade. Os dois compostos se ligam a HSA, mas enquanto um apresenta a diminuição da constante de Stern Volmer, o outro (mais hidrofóbico) apresenta o aumento da constante com o aumento da temperatura (MARKOVIĆ et al., 2018). Obviamente, não existem razões para se suspeitar diferentes mecanismos de interação (dinâmico versus estático). Neste caso, efeitos globais determinam a influência da temperatura. Há vários outros exemplos que apresentam raciocínios similares, tais como, a interação com timol (ROUFEGARINEJAD et al., 2018), derivados de curcumina (MOHAMMADI; MOEENI, 2017) e β -caroteno (CHANG et al., 2016).

Neste ponto, é importante destacar que a diferença entre o *quenching* estático e o *quenching* dinâmico pelo critério da taxa de reação controlada por difusão citada anteriormente é frequentemente utilizada para a interação proteína-ligante (LAKOWICZ, 2006; SUN; WANG; LEI, 2015; VAN DE WEERT; STELLA, 2011). Um segundo critério, que também é muito utilizado, é a dependência da temperatura. O aumento da temperatura favorece o *quenching* dinâmico levando a um aumento de K_{SV} , enquanto que a diminuição da constante indica o *quenching* estático (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014; LAKOWICZ, 2006; VAN DE WEERT; STELLA, 2011). Desta forma, se o estudo envolvendo a temperatura indicar um processo estático, os resultados experimentais obtidos pelo *quenching* podem ser utilizados para o cálculo da constante de associação entre a proteína e o ligante.

A aplicação da temperatura como critério para distinguir o *quenching* dinâmico do estático está relacionada a formação ou não de um complexo no estado fundamental. Isto

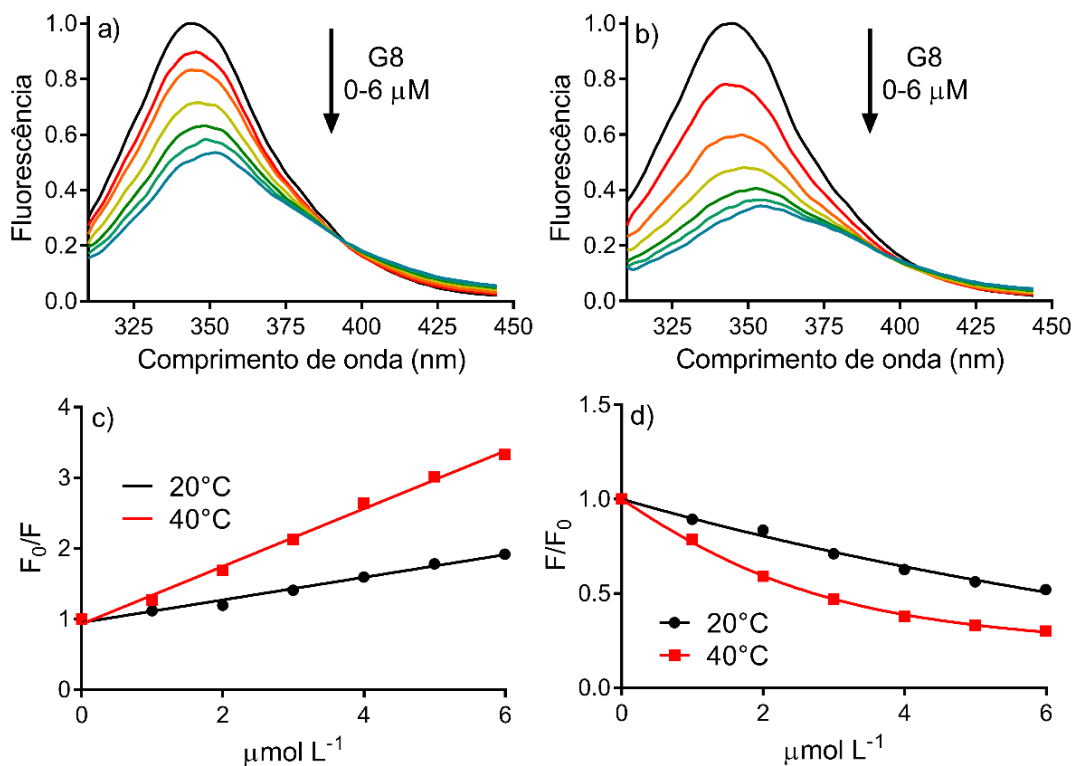
porque, a complexação de moléculas é acompanhada pela perda natural de graus de liberdade translacional e rotacional e um ΔS negativo (DU et al., 2016; STARODUB et al., 2016). Portanto, considerando a equação de Gibbs (Equação 6), a temperatura não é favorável a complexação e o seu aumento terá como consequência a diminuição na constante de ligação. Essas considerações físico-químicas são frequentemente válidas para a fase gasosa e se as mudanças de entropia devido a interações com o solvente não são significantes em todo o processo. No entanto, isto pode não ser válido para as interações proteína-ligante, que é realizada em um meio aquoso tamponado e geralmente com ligantes hidrofóbicos. A interação do G8 com a albumina foi claramente uma exceção no modelo frequentemente aceito, uma vez que, foi observado o aumento da constante de associação com o aumento da temperatura (Figura 43).

A Figura 43 mostra o *quenching* de fluorescência para o G8 em 20°C e 40°C. A partir destes resultados foram determinadas as K_{SV} e a K_a (Equação 5 e Equação 15). Os valores obtidos de K_{SV} e K_a para o G8 a 40°C ($K_{SV} = 4,1 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$; $K_a = 1,0 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) são superiores aos encontrados para o G8 a 20°C ($K_{SV} = 1,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$; $K_a = 6,8 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$). Para evidenciar a importância do meio na interação albumina-ligante, os estudos variando a temperatura foram obtidos em diferentes soluções tampão (Tabela 21).

$$\frac{F}{F_0} = 1 - \varphi \frac{[(K_d + P + Q) - \sqrt{(K_d + P + Q)^2 - 4 \times P \times Q}]}{2 \times P} \quad (15)$$

Figura 43 - Efeito da temperatura na interação do G8 com a albumina.

(a) 20°C; (b) 40°C; (c) Stern-Volmer ($K_{SV} = 1,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, 20°C; $K_{SV} = 4,1 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, 40°C); (d) Constante de associação ($K_a = 6,8 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, 20°C, $R^2 = 0,9976$; $K_a = 1,0 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, 40°C, $R^2 = 0,9996$). BSA $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e G8 $0-6 \mu\text{mol L}^{-1}$.

**Tabela 21 - Interação do G8 com a albumina. Efeito do meio na constante de Stern-Volmer (K_{SV}).**

| Solução tampão | $K_{SV} (\text{mol}^{-1} \text{ L})$ | | $K_{SV40^\circ\text{C}}/K_{SV20^\circ\text{C}}$ |
|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------|---|
| | 20°C | 40°C | |
| Fosfato | $1,6 \times 10^5$ | $4,1 \times 10^5$ | 2,6 |
| Fosfato + 20% de etanol | $9,9 \times 10^4$ | $1,4 \times 10^5$ | 1,4 |
| HEPES | $1,2 \times 10^5$ | $8,6 \times 10^5$ | 7,2 |

O aumento de K_{SV} a partir do aumento da temperatura foi mais expressivo para o tampão HEPES. A adição de etanol (20%) no tampão fosfato também foi significativa. Neste caso, K_{SV} aumentou somente 1,4 vezes, enquanto na ausência de etanol o aumento foi de 2,6 vezes para as interações em 40 °C (Tabela 21). Isto pode ser explicado uma vez que por

apresentar características hidrofóbicas o G8 tem a sua afinidade/solubilidade aumentada na presença de etanol e o ganho entrópico de removê-lo do solvente para a cavidade proteica foi menor do que o obtido para o meio na ausência de etanol. A partir dos valores de K_a , foram obtidos os valores dos parâmetros termodinâmicos utilizando a Equação 6, Equação 7 e Equação 16 (Tabela 22). Em todas as condições experimentais, as interações foram espontâneas (ΔG negativo). A viabilidade energética foi consequência de um efeito entrópico significativo (ΔS positivo), que neutralizou a alteração desfavorável da entalpia positiva (Tabela 22). Estes resultados confirmaram que a interação do G8 com a albumina é entropicamente dirigida. Conseqüentemente, a alteração total da entropia para a interação proteína-ligante foi proposta como uma soma de três componentes: i) ΔS_{solv} , que representa a alteração da entropia do solvente devido à liberação do solvente após a ligação; ΔS_{conf} , que representa a alteração de entropia conformacional devido à liberdade conformacional da proteína e do ligante após a ligação e iii) $\Delta S_{r/t}$, que representa a perda dos graus de liberdade de translação e rotação da proteína e ligante após a formação do complexo (CHANDEL et al., 2018; DU et al., 2016; STARODUB et al., 2016). Nesse sentido, o ΔS_{solv} deve ser o principal contribuinte para a alteração total da entropia na interação com o G8.

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \quad (16)$$

Tabela 22 - Constante de associação e parâmetros termodinâmicos para a interação G8-BSA.

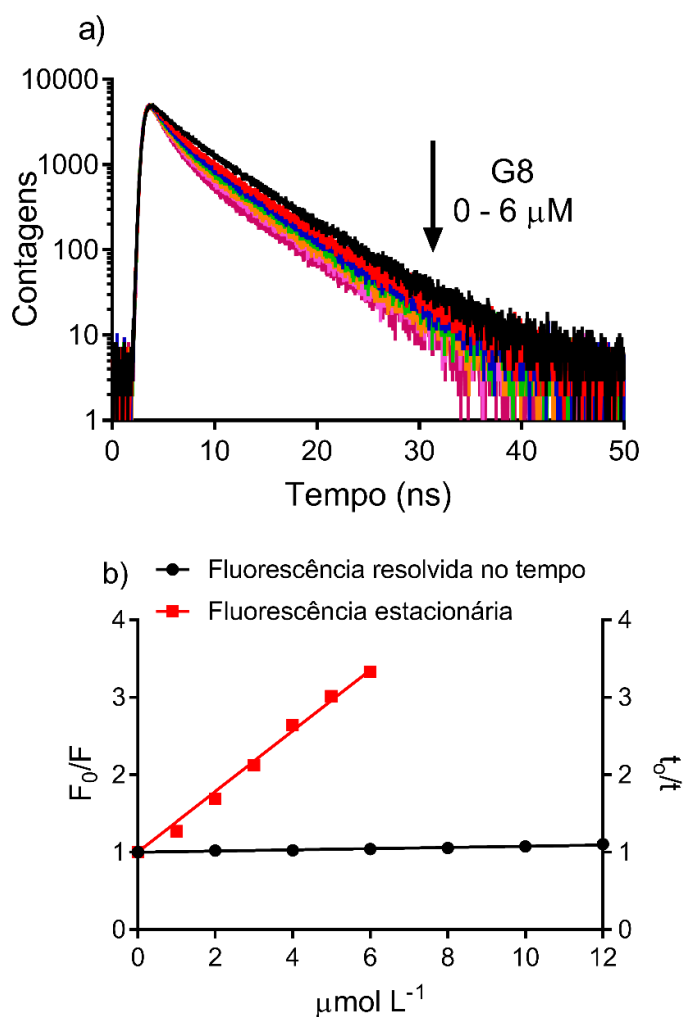
| Tampão | $K_a \times 10^5$ (mol ⁻¹ L) | | ΔH (kJ/mol) | ΔS (J/mol K) | | ΔG (kJ/mol) | |
|---------------------------------|---|------|------------------------|----------------------|-------|---------------------|-------|
| | 20°C | 40°C | | 20°C | 40°C | 20°C | 40°C |
| Fosfato | 0,68 | 10 | 104,4 | 447,5 | 447,5 | -27,2 | -36,1 |
| Fosfato + 20% etanol | 4,1 | 37 | 83,9 | 393,7 | 375,4 | -31,5 | -33,6 |
| HEPES | 0,98 | 19 | 113,8 | 482,6 | 473,1 | -28,1 | -34,7 |

5.2.2 – Estudo da interação G8 com a albumina utilizando a fluorescência resolvida no tempo.

Como mencionado anteriormente, a distinção entre o *quenching* colisional e estático é essencial para a decisão da aplicação ou não dos dados experimentais de *quenching* de fluorescência para calcular a constante de associação. Um outro critério é o baseado em

medidas de tempo de vida no estado excitado. Em um processo dinâmico, o tempo de vida do fluoróforo excitado diminui com a adição do supressor. Por outro lado, se ocorre a formação de um complexo não fluorescente no estado fundamental, a medida do tempo de vida no estado excitado não é alterada por um supressor (LAKOWICZ, 2006). A Figura 44 mostra que a adição do G8 teve apenas um efeito sutil na vida útil do estado excitado da proteína. Para reforçar esse resultado, a constante de Stern-Volmer obtida pela fluorescência no estado estacionário foi comparada a obtida pelos dados de fluorescência resolvida no tempo. Assim, pode-se concluir que a complexação entre G8 e a albumina no estado fundamental deve ser o principal contribuinte envolvido na interação.

Figura 44 - Fluorescência resolvida no tempo para o G8. (A) gráfico de decaimento de tempo de vida com adições de G8. (B) Comparação de Stern-Volmer obtido por fluorescência no estado estacionário e fluorescência resolvida no tempo.



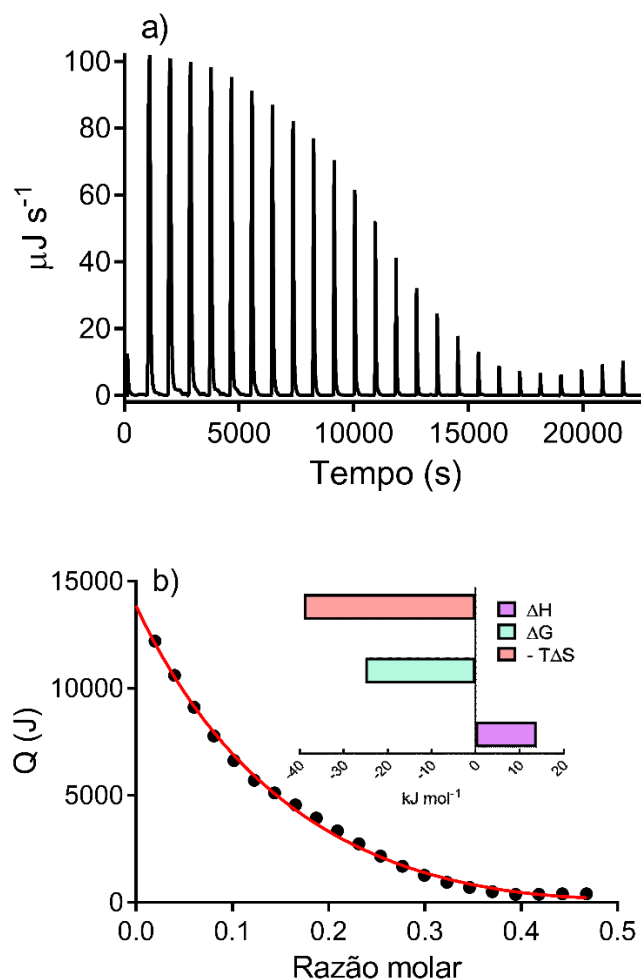
5.2.3 – Estudo da interação G8 com albumina utilizando a calorimetria de titulação isotérmica.

As conclusões obtidas anteriormente foram baseadas em dados espectroscópicos, por isso, para reforçar a interação entre o G8 e a albumina foram realizados estudos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC). As medidas espectroscópicas podem estar susceptíveis a equívocos, como efeitos de filtro interno, por outro lado, a técnica calorimétrica é capaz de observar o calor relativo à interação. No anexo B a Figura B 1 apresenta o gráfico de ITC obtido para o branco. O branco representado nesta figura é relativo ao calor de dissolução de injeções sequenciais do G8 em solução tampão. Para a determinação dos valores da constante de ligação, estequiometria e entalpia, as análises foram realizadas desconsiderando o branco e utilizando o modo independente, que considera um sítio de ligação apenas na macromolécula, ou seja, busca a estequiometria igual a 1.

Os resultados apresentados na Figura 45 confirmam a formação de um complexo entre o G8 e a albumina ($K_a = 2,52 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$; $n = 1,098$). Reforçando os dados espectroscópicos, os resultados de ITC também mostraram que a interação é espontânea ($\Delta G = -25,11 \text{ kJ mol}^{-1}$), com entalpia e entropias positivas ($13,888 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $132 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, respectivamente). Este resultado reafirma que a interação entre o G8 e a albumina é entropicamente dirigida.

Figura 45 - Análise de ITC para a interação entre o G8 e a albumina.

(a) Injeções sequenciais de G8 na BSA. (b) Regressão no modo independente, insert: valores de ΔS , ΔH e ΔG obtidos para a interação G8-BSA. Injeções sequenciais de 10 μL G8 1,35 mmol L^{-1} em BSA 0,075 mmol L^{-1} .

**5.2.4 – Interação entre o ácido ascórbico e o palmitato de ascorbila com a albumina**

Para reforçar a diferença encontrada entre ligantes hidrofóbicos e hidrofílicos na interação com a albumina, foram aplicados estudos de *quenching* para o ácido ascórbico e o seu ester, palmitato de ascorbila. De forma semelhante ao G8, o palmitato de ascorbila ($K_a = 4,06 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) apresentou constante de associação cerca de dez vezes maior do que o ácido ascórbico ($K_a = 3,54 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) (Figura 46). Além disso, a interação entre o palmitato de ascorbila e a albumina também foi entropicamente dirigida, apresentando

aumento na constante de associação com o aumento de temperatura ($K_a = 4,06 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ para 20°C e $K_a = 1,75 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ para 40°C) (Figura 47). Os parâmetros termodinâmicos encontrados estão listados na Tabela 23.

Tabela 23 - Valores de K_a e dos parâmetros termodinâmicos para o palmitato de ascorbila em 20°C e 40°C .

| Palmitato de ascorbila | 20°C | 40°C |
|--|--------------------|--------------------|
| $K_a \text{ (mol}^{-1} \text{ L)}$ | $4,06 \times 10^4$ | $1,75 \times 10^5$ |
| $\Delta G \text{ (kJ mol}^{-1})$ | -25,9 | |
| $\Delta H \text{ (kJ mol}^{-1})$ | 55,7 | |
| $\Delta S \text{ (J mol}^{-1} \text{ K}^{-1})$ | 278,3 | |

Figura 46 - Quenching de fluorescência da albumina provocado pela adição de ácido ascórbico e palmitato de ascorbila.

(a) BSA $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e ácido ascórbico $0-12 \mu\text{mol L}^{-1}$; (b) BSA $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e palmitato de ascorbila $0-6 \mu\text{mol L}^{-1}$; (c) constante de associação.

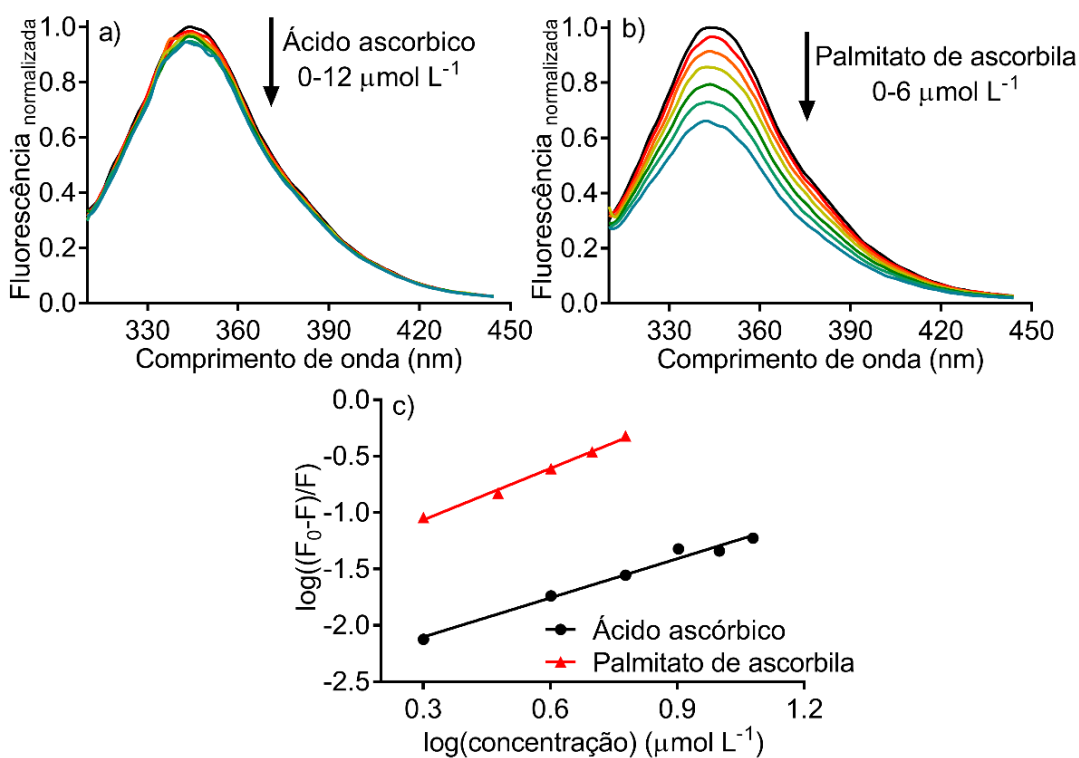
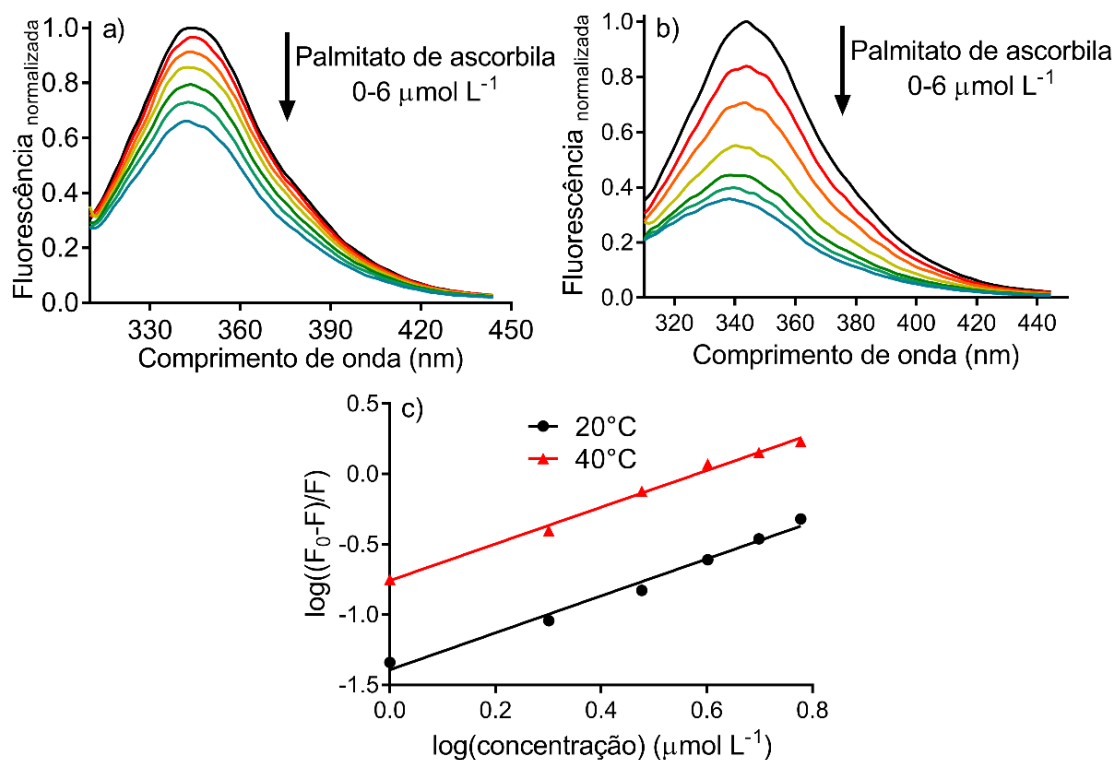


Figura 47 - Quenching de fluorescência da albumina provocado pela adição de palmitato de ascorbila em diferentes temperaturas.

(a) 20°C; (b) 40°C; (c) constante de associação. BSA 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e palmitato de ascorbila 0-6 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Estes resultados corroboraram com os obtidos para o G0 e o G8 mostrando que o aumento da hidrofobicidade do ligante contribui para que a interação seja entropicamente dirigida.

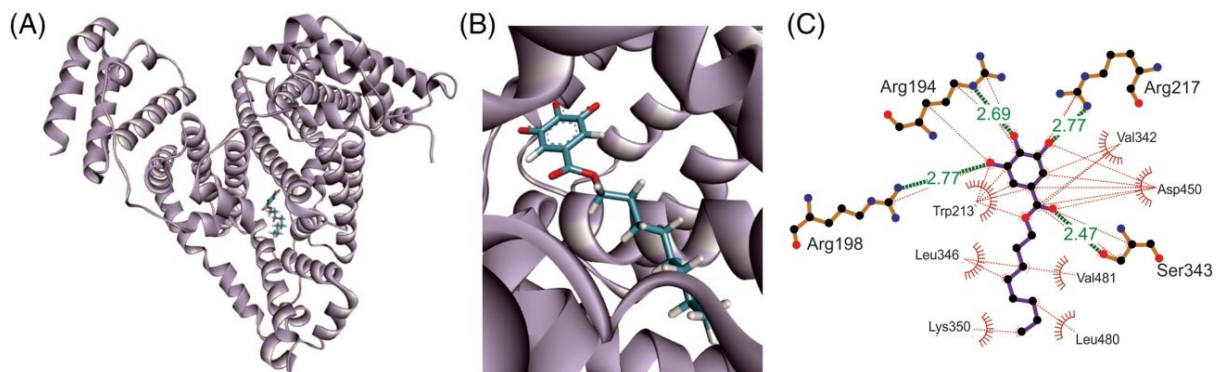
5.2.5 – Determinação do sítio de ligação do G8 na albumina: aplicação de ensaios de deslocamento.

A determinação do sítio de ligação preferencial do G8 na albumina foi realizada utilizando o dicroísmo circular induzido e os compostos fenilbutazona e dansilprolina como marcadores dos sítios I e II, respectivamente. Tanto a fenilbutazona como a dansilprolina possuem um sinal de dicroísmo circular induzido após a complexação com a albumina (TEDESCO; BERTUCCI, 2015). Estes sinais foram utilizados para monitorar uma alteração indicativa da competição do G8 com esses compostos em um determinado sítio de ligação.

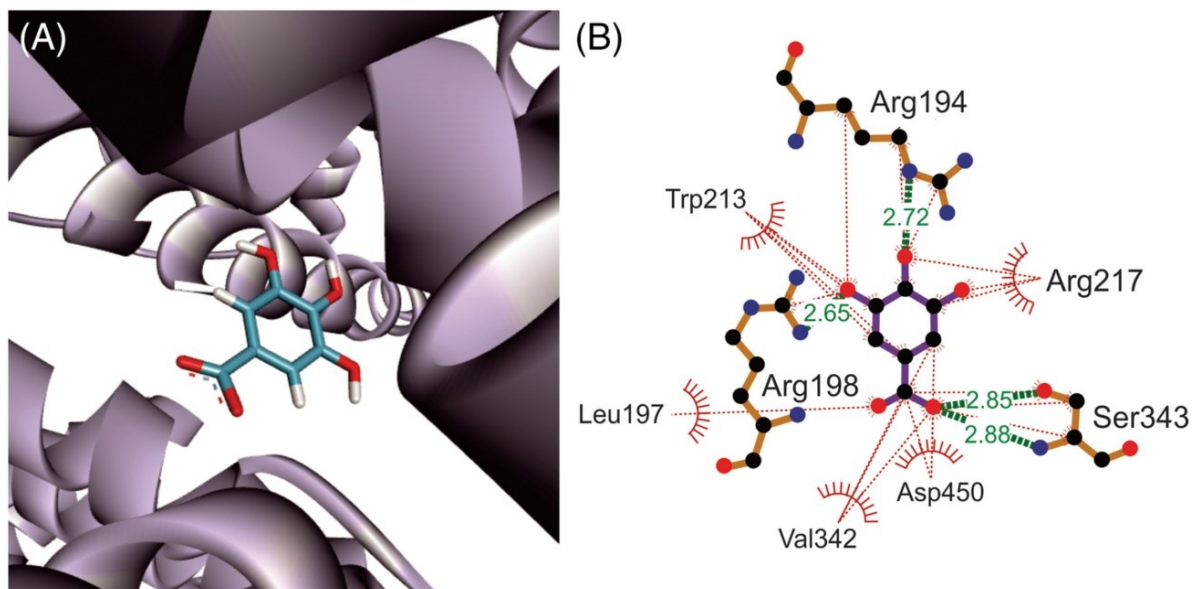
5.2.6 – Estudo da interação entre G0 ou G8 com a albumina utilizando o *docking* molecular.

Os estudos experimentais mostraram que ao se comparar o G0 com o G8, este último foi significativamente mais eficiente como ligante da albumina e que o efeito hidrofóbico foi a “força” dominante responsável pela interação favorável. Assim, para uma melhor compreensão em nível molecular da interação entre os compostos G0 e G8 com a albumina foram realizados estudos de *docking* molecular. A estrutura cristalográfica da BSA complexada com moléculas de naproxeno nos sítios I, II e VI (PDB: 4OR0) foi utilizada neste estudo. Os valores das energias de ligação das melhores poses para o G0 e o G8 no *docking* com a HSA estão listados na Tabela 24. Os resultados estão de acordo com os obtidos experimentalmente em que é possível observar que em todos os sítios de ligação, o G8 apresentou valores de energia maiores do que o G0. Analisando o sítio preferencial de ligação do G8, os sítios I e VI apresentaram valores bem próximos de energia, e, portanto, seriam as cavidades preferenciais na BSA. Sabe-se que o sítio I é predominante não polar (GHUMAN *et al.*, 2005), o que é adequado para a ligação de moléculas como o G8. Moléculas com longas cadeias alquilas, tais como o ácido capríco e o ácido laurático, além de se ligarem em sítios específicos para ácidos graxos, são também capazes de se ligarem ao sítio I (FANALI *et al.*, 2012). O sítio VI, localizado entre os subdomínios IIA e IIIB, é específico para a ligação de ácidos graxos de média e longa cadeia (FANALI *et al.*, 2012), sendo que a afinidade do G8 com este sítio não pode ser considerada uma surpresa. Seguindo os critérios do *software GOLD*, o sítio II foi menos adequado para acomodar o G8. Este comportamento é coerente com o menor tamanho do sítio II quando comparado ao sítio I (GHUMAN *et al.*, 2005), restringindo o acesso do G8, mas não do G0. O sítio III é a terceira maior cavidade da albumina, e neste sítio se ligam diversos fármacos, incluindo agentes anticâncer (ZSILA, 2013). Desta maneira, o sítio III também foi capaz de acomodar o G8, mas não foi a cavidade preferencial para este composto.

As poses de menor energia para o G8 e o G0 foram analisadas para encontrar as interações intermoleculares e os contatos hidrofóbicos com os resíduos dos aminoácidos. A Figura 49 mostra as interações com as poses de menor energia do G8 para o sítio I. No sítio I, foram determinadas quatro ligações de hidrogênio com os aminoácidos Arg194, Arg198, Arg217 e Ser343; e vinte e sete contatos hidrofóbicos envolvendo os aminoácidos Arg194, Arg198, Trp213, Leu346, Lys350, Leu480, Val481, Ser343, Asp450, Val342 e Arg217.

Figura 49 - Estrutura de menor energia (a,b) e interações (c) do G8 do sítio I da BSA.

A Figura 50 mostra as interações do G0 com o sítio I, que foi o resultado que apresentou menor valor de score para esta molécula. A pose de melhor score apresentou quatro ligações de hidrogênio com os aminoácidos Arg194, Arg198 e Ser343 e dezenove contatos hidrofóbicos com os aminoácidos Leu197, Trp213, Arg194, Arg217, Val343, Asp450 e Ser343. Os resultados de *docking* molecular para os outros sítios de ligação do G8 e G0 estão apresentados no anexo B.

Figura 50 - Estrutura de menor energia (a) e interações (b) do G0 com o sítio I da BSA.

Em resumo, além da maior afinidade energética, as simulações de *docking* mostraram uma quantidade maior de contatos hidrofóbicos para o G8 em seus locais preferenciais de ligação em comparação ao G0 (Tabela 24). Isso é consistente com os resultados experimentais

da interação dirigidas entropicamente, mas não significa que as ligações de hidrogênio não estão envolvidas. De fato, as ligações de hidrogênio estão presentes tanto para o G0 quanto para o G8, porém a hidrofobicidade, ou seja, o contato hidrofóbico é a principal diferença entre esses ligantes. Destaca-se que a presença de ligações de hidrogênio não é contraditória a proposição amplamente citada e aceita de Ross e Subramanian sobre a termodinâmica das interações proteína-ligante (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981), que afirma “ $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ implica interação hidrofóbica, $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ sugere força de van der Waals ou a formação de ligações de hidrogênio, e $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ envolve força eletrostática”. Neste contexto, os autores propuseram duas etapas para entender a termodinâmica da interação proteína-ligante: (a) interação hidrofóbica e (b) interações intermoleculares. A primeira etapa está relacionada as alterações de entropia devido ao deslocamento do ligante do meio aquoso para o interior da proteína. Uma vez dentro da proteína, ocorre a segunda etapa. Conforme citado pelos autores, a segunda etapa “pode desempenhar papel crucial, se não predominante, na determinação da termodinâmica da interação com proteínas” (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). Porém, deve haver casos em que a primeira etapa é dominante, mesmo que as ligações de hidrogênio estejam envolvidas. Este caso foi o apresentado pelo G8 e pelo palmitato de ascorbila, além de outros exemplos encontrados na literatura (CHAVES *et al.*, 2018; PAWAR *et al.*, 2017; RABBANI *et al.*, 2017; ROUFEGARINEJAD *et al.*, 2018).

Tabela 24 - Energia de ligação e número de ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos para a interação G0 ou G8 com a BSA obtidos por *docking* molecular.

| | Energia de ligação (kJ mol ⁻¹) | | Ligação de hidrogênio | | Contatos hidrofóbicos | |
|------------------|---|--------|--------------------------|----|-----------------------|----|
| | G0 | G8 | G0 | G8 | G0 | G8 |
| Sítio I | -43,34 | -72,61 | 4 | 4 | 19 | 27 |
| Sítio II | -41,44 | -54,56 | 2 | 2 | 18 | 27 |
| Sítio III | -33,87 | -56,47 | 3 | 3 | 15 | 14 |
| Sítio VI | -41,41 | -72,00 | 3 | 1 | 15 | 22 |

Portanto, este trabalho contribuiu para advertir ao risco de usar o critério de temperatura para a distinção entre o *quenching* estático e dinâmico, o que por sua vez interfere na decisão de se utilizar esta análise para a determinação da constante de associação

entre ligante e proteína. Sendo o efeito hidrofóbico a principal “força” envolvida na interação, o aumento da temperatura não enfraquecerá a complexação ligante-proteína. A diminuição da entropia devido à perda dos graus de liberdade translacional e rotacional pode ser cancelada pelo aumento entrópico devido ao ganho ao se remover um ligante hidrofóbico do meio aquoso para um microambiente hidrofóbico no interior da proteína.

5.2.7 – Considerações finais dos estudos envolvendo a interação dos galatos com a albumina

Os resultados experimentais obtidos mostraram que a interação de ligantes hidrofóbicos com albumina é favorecida quando comparada com ligantes com hidrofobicidade inferior, tais como: G8 *versus* G0 ou palmitato de ascorbila *versus* ácido ascórbico. O aumento da temperatura provoca o aumento da constante de associação entre o G8 e albumina, além do aumento da entropia, indicando que a interação G8-BSA é entropicamente dirigida. A dependência da entropia na interação entre o G8 e a BSA também foi analisada a partir de estudos envolvendo o ITC. Estes estudos mostraram que esta interação é endotérmica, destacando a contribuição do termo $T\Delta S$ para que a associação seja favorável ($\Delta G < 0$).

Além disso, os estudos envolvendo o G0 e o G8 em interação com albumina mostraram o risco que há quando somente o critério envolvendo a temperatura é utilizado para a distinção entre o *quenching* estático e o dinâmico. Uma vez que o efeito hidrofóbico pode ser a maior força envolvida na interação ligante-proteína, a diminuição da entropia devido a perda dos graus de liberdade translacional e rotacional pode ser cancelado pelo aumento de entropia ocasionado pelo ganho da remoção de um ligante hidrofóbico de um meio aquoso para o interior hidrofóbico da proteína. Isto indica que a dependência da temperatura não é adequada para ser utilizada na distinção entre *quenching* estático ou dinâmico.

6 – Conclusões

- Valores distintos de rendimento quântico de fluorescência, tempo de vida e anisotropia foram observados entre os aminoácidos dansilados em associação com a HSA. Em particular, os aminoácidos dansilados que possuem preferência pelo sítio I apresentaram resultados inferiores destacando a menor afinidade desses compostos com a HSA.

- A determinação de K_a por fluorescência, os estudos de dicroísmo circular induzido (ICD) e de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) confirmaram a menor afinidade dos dansilados de sítio I com a HSA.

- Os estudos de competição envolvendo fármacos específicos para um determinado sítio da proteína evidenciou que a menor afinidade dos dansilados de sítio I foi refletida na especificidade desses compostos com o sítio de ligação da HSA.

- A utilização da DGlu, aminoácido dansilado de sítio I que não possui carga positiva sobre a cadeia lateral, confirmou que a carga positiva dos demais dansilados de sítio I afeta a sua interação com a HSA, devido a presença de resíduos de aminoácidos carregados positivamente na entrada da cavidade do sítio I.

- A utilização do G0 e do G8 evidenciou que compostos hidrofóbicos apresentam maior afinidade com a proteína e mostrou que o critério da utilização dos estudos de quenching em diferentes temperaturas para se determinar o tipo de supressão deve ser utilizado com atenção quando uma interação é entropicamente dirigida.

- Os estudos de docking molecular e dinâmica molecular mostraram que os aminoácidos dansilados de sítio I apresentam maior afinidade com a HSA, porém devido a uma maior barreira energética o acesso ao sítio é prejudicado, confirmando os resultados obtidos experimentalmente. Esses estudos destacam a importância de se compreender o “caminho” de uma sonda até um sítio de ligação da proteína.

- A utilização de uma sonda em ensaios de competição deve ser realizada com cautela, pois o modo como esta sonda se liga a proteína pode afetar diretamente os resultados que serão obtidos nesta análise.

Referências Bibliográficas

ABDOLLAHPOUR, Nooshin et al. Investigation of the Interaction Between Human Serum Albumin and Two Drugs as Binary and Ternary Systems. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, v. 41, n. 6, p. 705–721, 2 dez. 2016.

ABUIN, Elsa; CALDERÓN, Cristian; LISSI, Eduardo. Interaction of alkylpyridinium chlorides with human serum albumin studied by fluorescence techniques. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 195, n. 2–3, p. 295–300, 15 abr. 2008.

AL-HARTHI, Samah et al. Towards the functional high-resolution coordination chemistry of blood plasma human serum albumin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 198, p. 110716, 1 set. 2019.

ALLENMARK, Stig. Induced circular dichroism by chiral molecular interaction. *Chirality*, v. 15, n. 5, p. 409–422, 2003.

ARICOV, Ludmila et al. Interaction of piroxicam with bovine serum albumin investigated by spectroscopic, calorimetric and computational molecular methods. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, p. 1–13, 29 jul. 2019.

BARTUZI, Damian et al. Recent advances and applications of molecular docking to G protein-coupled receptors. *Molecules*. [S.l.]: MDPI AG.

BAYLY, Christopher I. et al. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: The RESP model. *Journal of Physical Chemistry*, v. 97, n. 40, p. 10269–10280, 1 out. 1993.

BENESI, H A; HILDEBRAND, J H. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*, v. 71, n. 8, p. 2703–2707, 1949.

BHATTACHARYA, A A; CURRY, S; FRANKS, N P. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. High resolution crystal structures. *The Journal of biological chemistry*, v. 275, n. 49, p. 38731–8, 8 dez. 2000.

BHOI, Abhas Kumar et al. Combined photophysical, NMR and theoretical (DFT) study on the interaction of a multi component system in the absence and presence of different biologically and environmentally important ions. *RSC Advances*, v. 5, n. 75, p. 61258–61269, 14 jul. 2015.

BIOVIA, D. S. *Discovery Studio Visualizer*. . San Diego: Dassault Systemes Biovia Corp. , 2018

BROUWER, Albert M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report) in: *Pure and Applied Chemistry Volume 83 Issue 12 (2011)*. *Pure and Applied Chemistry*, v. 83, n. 12, p. 2213–2228, 2011.

BRUTON, Laurence L.; HILAL-DANDAN, Randa. *Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman - 2a Ed.* 2015. [S.l.]: Mcgraw-hill, 2015.

BUJACZ, Anna; ZIELINSKI, Kamil; SEKULA, Bartosz. Structural studies of bovine, equine, and leporine serum albumin complexes with naproxen. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 82, n. 9, p. 2199–2208, set. 2014.

CARTER, D C et al. Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science*, v. 244, n. 4909, p. 1195–8, 9 jun. 1989.

- CASE, D.A. et al. Amber 2016. . [S.l.: s.n.], 2016.
- CHANDEL, Tajalli Ilm et al. A mechanistic insight into protein-ligand interaction, folding, misfolding, aggregation and inhibition of protein aggregates: An overview. *International Journal of Biological Macromolecules*. [S.l.]: Elsevier B.V. , 1 jan. 2018
- CHANG, Hui-Ting et al. Binding to Bovine Serum Albumin Protects β -Carotene against Oxidative Degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, n. 29, p. 5951–5957, 27 jul. 2016.
- CHAVES, Otávio et al. Multi-Spectroscopic and Theoretical Analysis on the Interaction between Human Serum Albumin and a Capsaicin Derivative—RPF101. *Biomolecules*, v. 8, n. 3, p. 78, 23 ago. 2018.
- CHEN, Yan-Min; GUO, Liang-Hong. Fluorescence study on site-specific binding of perfluoroalkyl acids to human serum albumin. *Archives of Toxicology*, v. 83, n. 3, p. 255–261, 15 mar. 2009.
- CHEN, Yi-Cun et al. Binding between Saikosaponin C and Human Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy and Molecular Docking. *Molecules*, v. 21, n. 2, p. 153, 28 jan. 2016.
- CHENG, Zhengjun. Comparative studies on the interactions of honokiol and magnolol with human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 66, p. 240–251, 1 jul. 2012.
- COLMENAREJO, Gonzalo; ALVAREZ-PEDRAGLIO, Ana; LAVANDERA, José-Luis. Cheminformatic Models To Predict Binding Affinities to Human Serum Albumin. *J. Med. Chem*, v. 44, n. 25, p. 4370–4378, 2001.
- COMPANY, Gaylord Chemical. DMSO Physical Properties | Gaylord Chemical. Disponível em: <<https://www.gaylordchemical.com/literature/dmso-physical-properties/>>. Acesso em: 24 jan. 2019.
- COX, MICHAEL, M. COX, MICHAEL, DOUDNA, Jennifer A. *Biologia Molecular - Princípios e Técnicas*. 1. ed. [S.l.]: Artmed, 2012.
- DE, Dipanwita; KAUR, Harpreet; DATTA, Anindya. Unusual Binding of a Potential Biomarker with Human Serum Albumin. *Chemistry - An Asian Journal*, v. 8, n. 4, p. 728–735, abr. 2013.
- DE SOUZA, Aguinaldo Robinson et al. Elucidation of the induced chirality of dansylglycine by its interaction with human serum. *Quimica Nova*, v. 42, n. 2, p. 135–142, 2019.
- DEMORO, Bruno et al. Screening organometallic binuclear thiosemicarbazone ruthenium complexes as potential anti-tumour agents: cytotoxic activity and human serum albumin binding mechanism. *Dalton Transactions*, v. 42, n. 19, p. 7131, 24 abr. 2013.
- DENNINGTON, Roy; KEITH, Todd A.; MILLAM, John M. *GaussView 5.0*. . Wallingford, CT, USA: Semichem Inc. Disponível em: <<https://gaussian.com>>. Acesso em: 23 out. 2020. , 2008
- DINIZ, Andréa et al. Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 391, n. 2, p. 625–32, maio 2008.
- DU, Xing et al. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 2, 26 jan. 2016.
- DUFOUR, Claire; DANGLES, Olivier. Flavonoid–serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1721, n. 1–3, p. 164–173, 18 jan. 2005.
- ERCELEN, Sebnem et al. The binding of novel two-color fluorescence probe FA to serum albumins of different species. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 35, n. 5, p. 231–242, 2005.

- FANALI, Gabriella et al. Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 33, n. 3, p. 209–290, jun. 2012.
- FERLIZZA, Enea et al. Validation of an electrophoretic method to detect albuminuria in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 19, n. 8, p. 860–868, 23 ago. 2017.
- FRAZIER, Richard A.; PAPADOPOULOU, Athina; GREEN, Rebecca J. Isothermal titration calorimetry study of epicatechin binding to serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, n. 5, p. 1602–1605, 28 ago. 2006.
- FREYER, Matthew W.; LEWIS, Edwin A. *Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions*. *Methods in Cell Biology*. [S.l.]: Methods Cell Biol. , 2008
- FRISCH, M. J. et al. *Gaussian 09*. . Wallingford CT: [s.n.], 2016.
- GHISAIDOOBE, Amar; CHUNG, Sang. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 12, p. 22518–22538, 5 dez. 2014.
- GHUMAN, Jamie et al. Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin. *Journal of Molecular Biology*, v. 353, n. 1, p. 38–52, 14 out. 2005.
- GRACIANI, Fernanda S.; XIMENES, Valdecir F. Investigation of Human Albumin-Induced Circular Dichroism in Dansylglycine. *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, p. e76849, 16 out. 2013.
- GROSSFIELD, Alan. “WHAM: the weighted histogram analysis method”, version XXXX. . [S.l: s.n.], [S.d.]. Disponível em: <http://membrane.urmc.rochester.edu/wordpress/?page_id=126>. Acesso em: 10 out. 2020.
- HANSEN, Lee D.; TRANSTRUM, Mark K.; QUINN, Colette F. *Titration Calorimetry: From Concept to Application*. Springer ed. [S.l: s.n.], 2018. p. 57.
- HE, Ling-Ling et al. Studies on the interaction between promethazine and human serum albumin in the presence of flavonoids by spectroscopic and molecular modeling techniques. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 145, p. 820–829, 1 set. 2016.
- HORNAK, Viktor et al. Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, v. 65, n. 3, p. 712–725, 15 nov. 2006.
- HU, Yan-Jun; LIU, Yi; XIAO, Xiao-He. Investigation of the Interaction between Berberine and Human Serum Albumin. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 3, p. 517–521, 9 mar. 2009.
- HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1 fev. 1996.
- JAHANBAN-ESFAHLAN, Ali et al. Investigating the interaction of juglone (5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone) with serum albumins using spectroscopic and in silico methods. *Journal of the Iranian Chemical Society*, v. 14, n. 7, p. 1527–1540, 1 jul. 2017.
- JAHANBAN-ESFAHLAN, Ali; PANAHI-AZAR, Vahid; SAJEDI, Sanaz. Interaction of glutathione with bovine serum albumin: Spectroscopy and molecular docking. *Food Chemistry*, v. 202, p. 426–431, 1 jul. 2016.

JAHANBAN-ESFAHLAN, Ali; PANAHI-AZAR, Vahid; SAJEDI, Sanaz. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction between N -acetyl cysteine and bovine serum albumin. *Biopolymers*, v. 103, n. 11, p. 638–645, nov. 2015.

JANA, Sankar et al. Binding interaction between plasma protein bovine serum albumin and flexible charge transfer fluorophore: A spectroscopic study in combination with molecular docking and molecular dynamics simulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 231, n. 1, p. 19–27, mar. 2012.

JIN, Zhe et al. Perfluoroalkane sulfonyl fluorides non-covalently bind to human serum albumin at Sudlow's sites. *Toxicology Letters*, v. 301, p. 17–23, 1 fev. 2019.

JISHA, Vadakkancheril S. et al. Site-Selective Binding and Dual Mode Recognition of Serum Albumin by a Squaraine Dye. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 128, n. 18, p. 6024–6025, 2006.

JISHA, Vadakkancheril S. et al. Site-Selective Interactions: Squaraine Dye–Serum Albumin Complexes with Enhanced Fluorescence and Triplet Yields. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, n. 17, p. 5912–5919, 6 maio 2010.

JONES, Gareth et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. *Journal of Molecular Biology*, v. 267, n. 3, p. 727–748, 4 abr. 1997.

JONES, Gareth; WILLETT, Peter; GLEN, Robert C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *Journal of Molecular Biology*, v. 245, n. 1, p. 43–53, jan. 1995.

KHOURY, George A. et al. Forcefield-NCAA: Ab initio charge parameters to aid in the discovery and design of therapeutic proteins and peptides with unnatural amino acids and their application to complement inhibitors of the compstatin family. *ACS Synthetic Biology*, v. 3, n. 12, p. 855–869, 19 dez. 2014.

KOIKE, Tohru et al. A Novel Biomimetic Zinc(II)–Fluorophore, Dansylamidoethyl–Pendant Macrocyclic Tetraamine 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (Cyclen). *Journal of the American Chemical Society*, v. 118, n. 50, p. 12696–12703, 1996.

KRAGH-HANSEN, Ulrich; CHUANG, Victor Tuan Giam; OTAGIRI, Masaki. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 25, n. 6, p. 695–704, jun. 2002.

KUMAR, Shankar et al. Multidimensional free-energy calculations using the weighted histogram analysis method. *Journal of Computational Chemistry*, v. 16, n. 11, p. 1339–1350, 1 nov. 1995.

KUNWAR, Amit et al. Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: An absorption and fluorescence spectroscopic study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1760, n. 10, p. 1513–1520, out. 2006.

LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3a ed ed. [S.l.]: Springer, 2006.

LI, Yan et al. Human Serum Albumin–Mercurial Species Interactions. *Journal of Proteome Research*, v. 6, n. 6, p. 2277–2286, jun. 2007.

LIU, Pei et al. Competitive Host–Guest Interaction between β -Cyclodextrin Polymer and Pyrene-Labeled Probes for Fluorescence Analyses. *Analytical Chemistry*, v. 87, n. 5, p. 2665–2671, 3 mar. 2015.

- LIU, Xiangping et al. Study on the interaction of levocetirizine dihydrochloride with human serum albumin by molecular spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 74, n. 5, p. 1189–1196, 1 dez. 2009.
- LOVING, Galen S.; SAINLOS, Matthieu; IMPERIALI, Barbara. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. *Trends in Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 73–83, fev. 2010.
- LUYKX, Dion M.A.M.; VAN RUTH, Saskia M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*. [S.l.]: Elsevier. , 15 mar. 2008
- MA, Xue Jiao; ZHANG, Yin Juan; ZENG, Cheng Ming. Inhibition of amyloid aggregation of bovine serum albumin by sodium dodecyl sulfate at submicellar concentrations. *Biochemistry (Moscow)*, v. 83, n. 1, p. 60–68, 1 jan. 2018.
- MACIĄŻEK-JURCZYK, Małgorzata et al. Human serum albumin aggregation/fibrillation and its abilities to drugs binding. *Molecules*, v. 25, n. 3, p. 1–19, 31 jan. 2020.
- MALISZEWSKA, Monika et al. Fluorometric Investigation on the Binding of Letrozole and Resveratrol with Serum Albumin. *Protein and peptide letters*, v. 23, n. 10, p. 867–877, 2016.
- MALLICK, Suman; PAL, Kaushik; KONER, Apurba L. Probing microenvironment of micelle and albumin using diethyl 6-(dimethylamino)naphthalene-2,3-dicarboxylate: An electroneutral solvatochromic fluorescent probe. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 467, p. 81–89, 1 abr. 2016.
- MANJUSHREE, M.; REVANASIDDAPPA, H. D. Interpretation of the binding interaction between bupropion hydrochloride with human serum albumin: A collective spectroscopic and computational approach. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 209, p. 264–273, 15 fev. 2019.
- MARINI, Alberto et al. What is Solvatochromism? *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, n. 51, p. 17128–17135, 30 dez. 2010.
- MARKOVIĆ, Olivera S. et al. Human serum albumin binding of certain antimalarials. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 192, p. 128–139, 5 mar. 2018.
- MATSUDA, Ryan et al. Analysis of Drug–Protein Interactions by High-Performance Affinity Chromatography: Interactions of Sulfonylurea Drugs with Normal and Glycated Human Serum Albumin. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. [S.l.: s.n.], 2015. v. 1286. p. 255–277.
- MERLOT, Angelica M.; KALINOWSKI, Danuta S.; RICHARDSON, Des R. Unraveling the mysteries of serum albumin—more than just a serum protein. *Frontiers in Physiology*, v. 5, p. 299, 12 ago. 2014.
- MITZNER, Steffen R. Extracorporeal liver support-albumin dialysis with the Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS). *Annals of hepatology*, v. 10 Suppl 1, p. S21-8, maio 2011.
- MOHAMMADI, Fakhrossadat; MOEENI, Marzieh. Investigation of the binding interactions of bisdemethoxycurcumin, diacetylcurcumin and diacetylbisdemethoxycurcumin with bovine α -lactalbumin by experimental and theoretical analysis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 35, n. 16, p. 3486–3498, 1 dez. 2017.
- MORRIS, Garrett M et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785–91, dez. 2009.

- MUSA, Kabiru Abubakar et al. Exploring the combination characteristics of lumefantrine, an antimalarial drug and human serum albumin through spectroscopic and molecular docking studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2020.
- NISHI, Kodai et al. Pharmacokinetic Alteration of ^{99m}Tc-MAG3 using Serum Protein Binding Displacement Method. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 40, n. 3, p. 366–370, 1 abr. 2013.
- OLSSON, Tjelvar S.G. et al. The Thermodynamics of Protein–Ligand Interaction and Solvation: Insights for Ligand Design. *Journal of Molecular Biology*, v. 384, n. 4, p. 1002–1017, 26 dez. 2008.
- ONUFRIEV, Alexey; BASHFORD, Donald; CASE, David A. Exploring Protein Native States and Large-Scale Conformational Changes with a Modified Generalized Born Model. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, v. 55, n. 2, p. 383–394, 1 maio 2004.
- ORAVCOVA', Jana; BOHS, Barbara; LINDNER, Wolfgang. Drug-protein binding studies new trends in analytical and experimental methodology. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 677, n. 1, p. 1–28, 23 fev. 1996.
- OTAGIRI, Masaki. A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, v. 20, n. 5, p. 309–23, out. 2005.
- PAGADALA, Nataraj S.; SYED, Khajamohiddin; TUSZYNSKI, Jack. Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*. [S.l.]: Springer Verlag, , 1 abr. 2017
- PARKER, Vivian Barfield. Thermal properties of aqueous uni-univalent electrolytes. Washington, D.C: National Standard Reference Data Series, 1965.
- PATEL, Bhargav R.; KERMAN, Kagan. Calorimetric and spectroscopic detection of the interaction between a diazo dye and human serum albumin. *Analyst*, v. 143, n. 16, p. 3890–3899, 21 ago. 2018.
- PATEL, Sunita; SHARMA, Kaushal Kishor; DATTA, Anindya. Competitive binding of Chlorin p6 and Dansyl-L-Proline to Sudlow's site II of human serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 138, p. 925–931, 5 mar. 2015.
- PATTANAYAK, Rudradip et al. An insight to the binding of ellagic acid with human serum albumin using spectroscopic and isothermal calorimetry studies. *Biochemistry and Biophysics Reports*, v. 10, p. 88–93, 1 jul. 2017.
- PAWAR, Suma K. et al. Spectroscopic and molecular modeling approaches to investigate the binding of proton pump inhibitors to human serum albumin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 35, n. 15, p. 3205–3220, 18 nov. 2017.
- PISTOLOZZI, Marco; BERTUCCI, Carlo. Species-dependent stereoselective drug binding to albumin: A circular dichroism study. *Chirality*, v. 20, n. 3–4, p. 552–558, mar. 2008.
- POÓR, Miklós et al. Interaction of Citrinin with Human Serum Albumin. *Toxins*, v. 7, n. 12, p. 5155–5166, 1 dez. 2015.
- R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. . Vienna, Austria: [s.n.], 2013.
- RABBANI, Gulam et al. Binding of erucic acid with human serum albumin using a spectroscopic and molecular docking study. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 105, p. 1572–1580, 1 dez. 2017.
- REINARD, T; JACOBSEN, H J. An inexpensive small volume equilibrium dialysis system for protein-ligand binding assays. *Analytical biochemistry*, v. 176, n. 1, p. 157–60, jan. 1989.

- RODRIGUEZ, Eric A. et al. Sulfation of Lower Chlorinated Polychlorinated Biphenyls Increases Their Affinity for the Major Drug-Binding Sites of Human Serum Albumin. *Environmental Science & Technology*, v. 50, n. 10, p. 5320–5327, 17 maio 2016.
- RONZETTI, Michael et al. Testing for drug-human serum albumin binding using fluorescent probes and other methods. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 13, n. 11, p. 1005–1014, 2 nov. 2018.
- ROSS, P D; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, v. 20, n. 11, p. 3096–102, 26 maio 1981.
- ROUFEGARINEJAD, Leila et al. Molecular interactions of thymol with bovine serum albumin: Spectroscopic and molecular docking studies. *Journal of Molecular Recognition*, v. 31, n. 7, p. e2704, jul. 2018.
- ROUFEGARINEJAD, Leila; AMAROWICZ, Ryszard; JAHANBAN-ESFAHLAN, Ali. Characterizing the interaction between pyrogallol and human serum albumin by spectroscopic and molecular docking methods. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 37, n. 11, p. 2766–2775, 24 jul. 2019.
- ROY, Siddhartha. Fluorescence Quenching Methods to Study Protein–Nucleic Acid Interactions. *Methods in Enzymology*, v. 379, p. 175–187, 1 jan. 2004.
- RYAN, Ali J. et al. Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin. *Journal of Structural Biology*, v. 174, n. 1, p. 84–91, abr. 2011.
- RYAN, Ali J; CHUNG, Chun-Wa; CURRY, Stephen. Crystallographic analysis reveals the structural basis of the high-affinity binding of iophenoxic acid to human serum albumin. *BMC structural biology*, v. 11, p. 18, 18 abr. 2011.
- SAKURAMA, Keiki et al. Analysis of the Binding of Aripiprazole to Human Serum Albumin: The Importance of a Chloro-Group in the Chemical Structure. *ACS Omega*, v. 3, p. 13790–13797, 2018.
- SALDANHA, Juliana F. et al. Determination of the binding properties of the uremic toxin phenylacetic acid to human serum albumin. *Biochimie*, v. 125, p. 53–58, jun. 2016.
- SALIM, Nilshad N.; FEIG, Andrew L. Isothermal titration calorimetry of RNA. *Methods*, v. 47, n. 3, p. 198–205, mar. 2009.
- SAMARI, Fayeze et al. Investigation of the interaction between amodiaquine and human serum albumin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, p. 255–263, ago. 2012.
- SEKI, T. et al. The interaction of dansyl amino acids with bovine serum albumin. *Colloid & Polymer Science*, v. 262, n. 4, p. 311–318, abr. 1984.
- SETOGUCHI, Nao et al. A diclofenac suppository-nabumetone combination therapy for arthritic pain relief and a monitoring method for the diclofenac binding capacity of HSA site II in rheumatoid arthritis. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v. 34, n. 2, p. 125–136, mar. 2013.
- SIEMIARCZUK, Aleksander et al. Analysis of Tryptophan Fluorescence Lifetimes in a Series of Human Serum Albumin Mutants with Substitutions in Subdomain 2A. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 40, n. 2, p. 115–122, 2004.
- SINGH, Rupashree Balia et al. Interaction of human serum albumin with charge transfer probe ethyl ester of N,N-dimethylamino naphthyl acrylic acid: An extrinsic fluorescence probe for studying protein micro-environment. *Photochem. Photobiol. Sci.*, v. 8, n. 1, p. 101–110, 6 jan. 2009.

- SINGH, T. Sanjoy; MITRA, Sivaprasad. Interaction of cinnamic acid derivatives with serum albumins: A fluorescence spectroscopic study. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 78, n. 3, p. 942–948, mar. 2011.
- SRIVASTAVA, Priyanka; SHAHID, Mohammad; MISRA, Arvind. Protein assisted fluorescence enhancement of a dansyl containing fluorescent reagent: Detection of Hg⁺ ion in aqueous medium. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 9, n. 14, p. 5051, 21 jul. 2011.
- STARODUB, Maria A. et al. Interrelation of Entropic Contributors to π -Stacking in Solution. *International Journal of Thermophysics*, v. 37, n. 8, 1 ago. 2016.
- SUDLOW, G; BIRKETT, D J; WADE, D N. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular pharmacology*, v. 11, n. 6, p. 824–32, nov. 1975.
- SUGIO, S. et al. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering*, v. 12, n. 6, p. 439–446, 1 jun. 1999.
- SUN, Xiangcheng; WANG, Ying; LEI, Yu. Fluorescence based explosive detection: from mechanisms to sensory materials. *Chemical Society Reviews*, v. 44, n. 22, p. 8019–8061, 3 nov. 2015.
- TAGUCHI, Kazuaki et al. Cross-linked human serum albumin dimer has the potential for use as a plasma-retaining agent for the fatty acid-conjugated antidiabetic drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 67, n. 2, p. 255–263, fev. 2015.
- TEDESCO, Daniele; BERTUCCI, Carlo. Induced circular dichroism as a tool to investigate the binding of drugs to carrier proteins: Classic approaches and new trends. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 113, p. 34–42, 10 set. 2015.
- TIAN, Hsin et al. Effects of Plasma Albumin on the Pharmacokinetics of Esomeprazole in ICU Patients. *BioMed Research International*, v. 2018, 2018.
- TORRIE, G. M.; VALLEAU, J. P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics*, v. 23, n. 2, p. 187–199, 1 fev. 1977.
- TRAMARIN, Anna et al. New insights into the altered binding capacity of pharmaceutical-grade human serum albumin: site-specific binding studies by induced circular dichroism spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 162, p. 171–178, 5 jan. 2019.
- VALERIO, Christopher et al. Human albumin solution for patients with cirrhosis and acute on chronic liver failure: Beyond simple volume expansion. *World Journal of Hepatology*, v. 8, n. 7, p. 345, 8 mar. 2016.
- VALEUR, Bernard.; BERBERAN-SANTOS, Mário Nuno. *Molecular Fluorescence : principles and applications*. [S.l.]: Wiley-VCH, 2013.
- VALEUR, Bernard; BERBERAN-SANTOS, Mário Nuno. *Molecular Fluorescence*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.
- VAN DE WEERT, Marco; STELLA, Lorenzo. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. *Journal of Molecular Structure*, v. 998, n. 1–3, p. 144–150, 13 jul. 2011.
- VASCONCELOS, Débora Naliati De; XIMENES, Valdecir Farias. Albumin-induced circular dichroism in Congo red: Applications for studies of amyloid-like fibril aggregates and binding sites. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 150, p. 321–330, 5 nov. 2015.

- VENTURINI, Diego et al. Experimental, DFT and docking simulations of the binding of diapocynin to human serum albumin: induced circular dichroism. *RSC Advances*, v. 5, n. 76, p. 62220–62228, 16 jul. 2015.
- VENTURINI, Diego et al. Induction of axial chirality in divanillin by interaction with bovine serum albumin. *PLOS ONE*, v. 12, n. 6, p. e0178597, 2 jun. 2017.
- WALLACE, A C; LASKOWSKI, R A; THORNTON, J M. LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. . [S.l.]: Prot. Eng.
- WANG, Junmei et al. Development and testing of a general Amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 9, p. 1157–1174, 15 jul. 2004.
- WANG, Qi et al. Binding interaction of atorvastatin with bovine serum albumin: Spectroscopic methods and molecular docking. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 156, p. 155–163, 5 mar. 2016.
- WANG, Yanli et al. Comparison of the binding affinity of chlorogenic acid with two serum albumins. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, n. 1, p. 81–86, 1 jan. 2011.
- WU, Xihu et al. Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to human serum albumin at subdomain IIA. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 79, n. 5, p. 1202–1209, set. 2011.
- YAMASAKI, K et al. Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1295, n. 2, p. 147–57, 18 jul. 1996.
- YAMASAKI, Keishi et al. Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1830, n. 12, p. 5435–5443, 1 dez. 2013.
- YAMASAKI, Keishi et al. Characterization of site I on human serum albumin: Concept about the structure of a drug binding site. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1295, n. 2, p. 147–157, 18 jul. 1996.
- ZHANG, Ye-Zhong et al. Fluorescence Study on the Interaction of Bovine Serum Albumin with P-Aminoazobenzene. *Journal of Fluorescence*, v. 18, n. 1, p. 109–118, 25 jan. 2008..
- ZHANG, Yuanwei et al. Bovine Serum Albumin Nanoparticles with Fluorogenic Near-IR-Emitting Squaraine Dyes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 5, n. 17, p. 8710–8717, 11 set. 2013.
- ZHANG, Yunyue et al. Interaction of phenolic acids and their derivatives with human serum albumin: Structure–affinity relationships and effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, v. 240, p. 1072–1080, 1 fev. 2018.
- ZHIVKOVA, Zvetanka. Studies on Drug – Human Serum Albumin Binding: The Current State of the Matter. *Current Pharmaceutical Design*, v. 21, n. 14, p. 1817–1830, 26 mar. 2015.
- ZHIVKOVA, Zvetanka D. Studies on drug-human serum albumin binding: the current state of the matter. *Current pharmaceutical design*, v. 21, n. 14, p. 1817–30, 2015.
- ZHONG, Wenying et al. The interaction of human serum albumin with a novel antidiabetic agent—SU-118. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 93, n. 4, p. 1039–1046, abr. 2004.
- ZSILA, Ferenc et al. Evaluation of drug–human serum albumin binding interactions with support vector machine aided online automated docking. *Bioinformatics*, v. 27, n. 13, p. 1806–1813, 1 jul. 2011.

ZSILA, Ferenc. Subdomain IB Is the Third Major Drug Binding Region of Human Serum Albumin: Toward the Three-Sites Model. *Molecular Pharmaceutics*, v. 10, n. 5, p. 1668–1682, 6 maio 2013.

ZSILA, Ferenc; BIKÁDI, Zsolt; SIMONYI, Miklós. Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods. *Biochemical pharmacology*, v. 65, n. 3, p. 447–56, 1 fev. 2003.

Anexo A

Figura A 1 - Espectros de fluorescência para os aminoácidos dansilados em solução tampão PBS, álcool etílico ou complexado a HSA.

(A) DL; (B) DA; (C) DC; (D) DP; (E) DN; (F) DG; (G) DS.

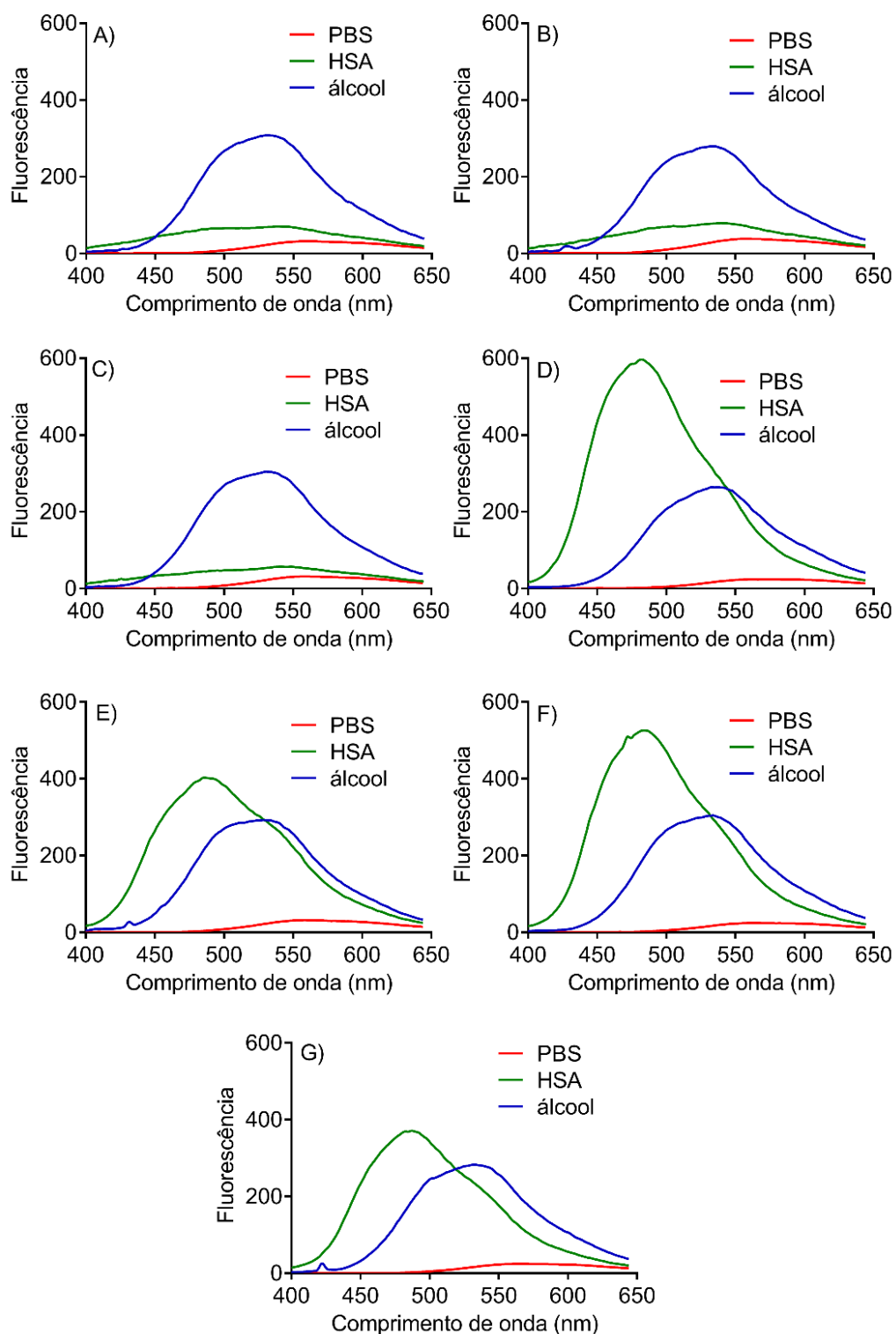


Figura A 2 - Espectros de fluorescência dos aminoácidos dansilados na ausência e na presença de HSA.

(A) DL; (B) DA; (C) DC; (D) DP; (E) DN; (F) DG; (G) DS.

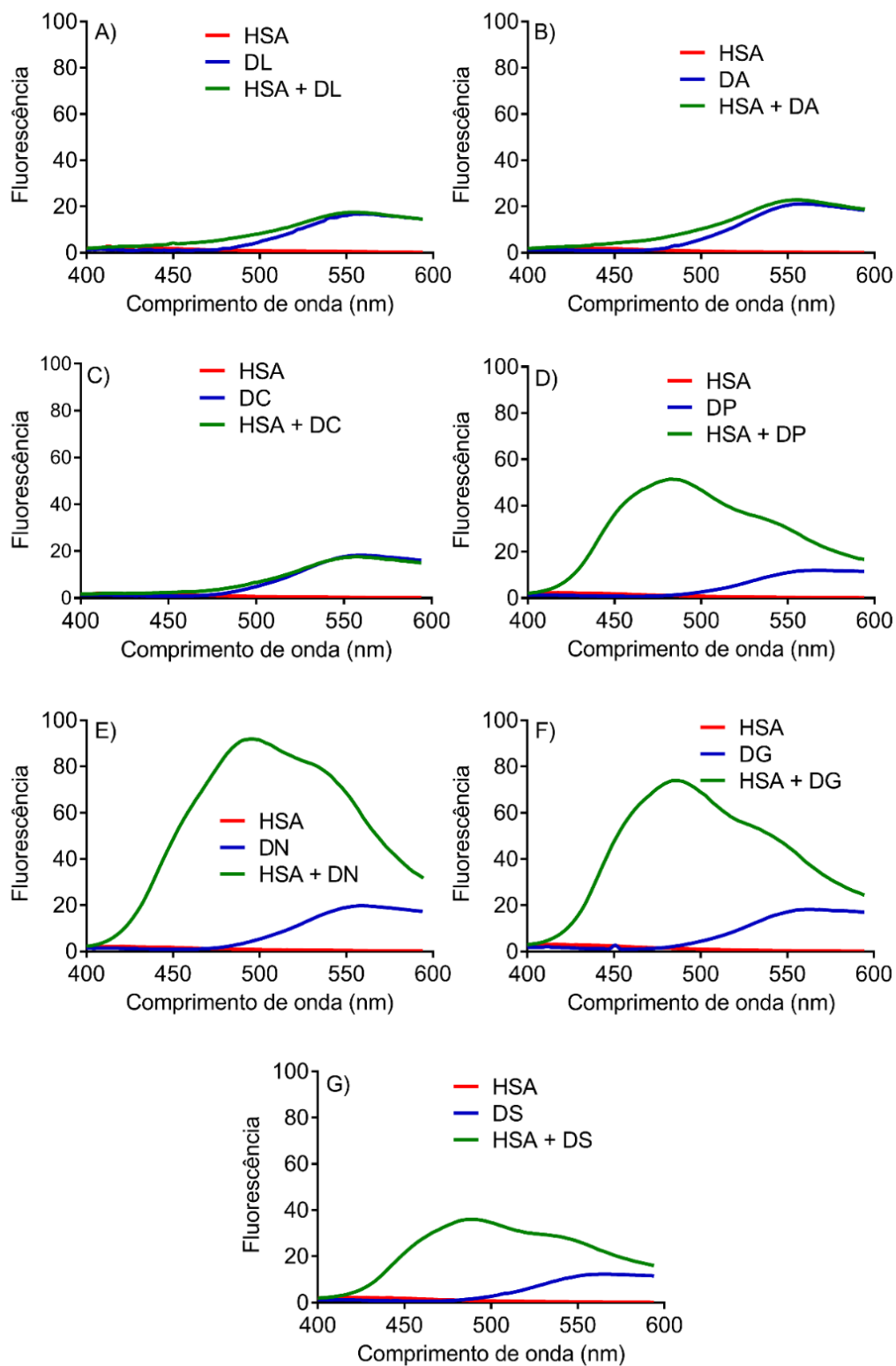


Figura A 3 - Determinação da constante de associação a partir da adição de HSA.
 (A) DL; (B) DA; (C) DC; (D) DP; (E) DN; (F) DG; (G) DS.

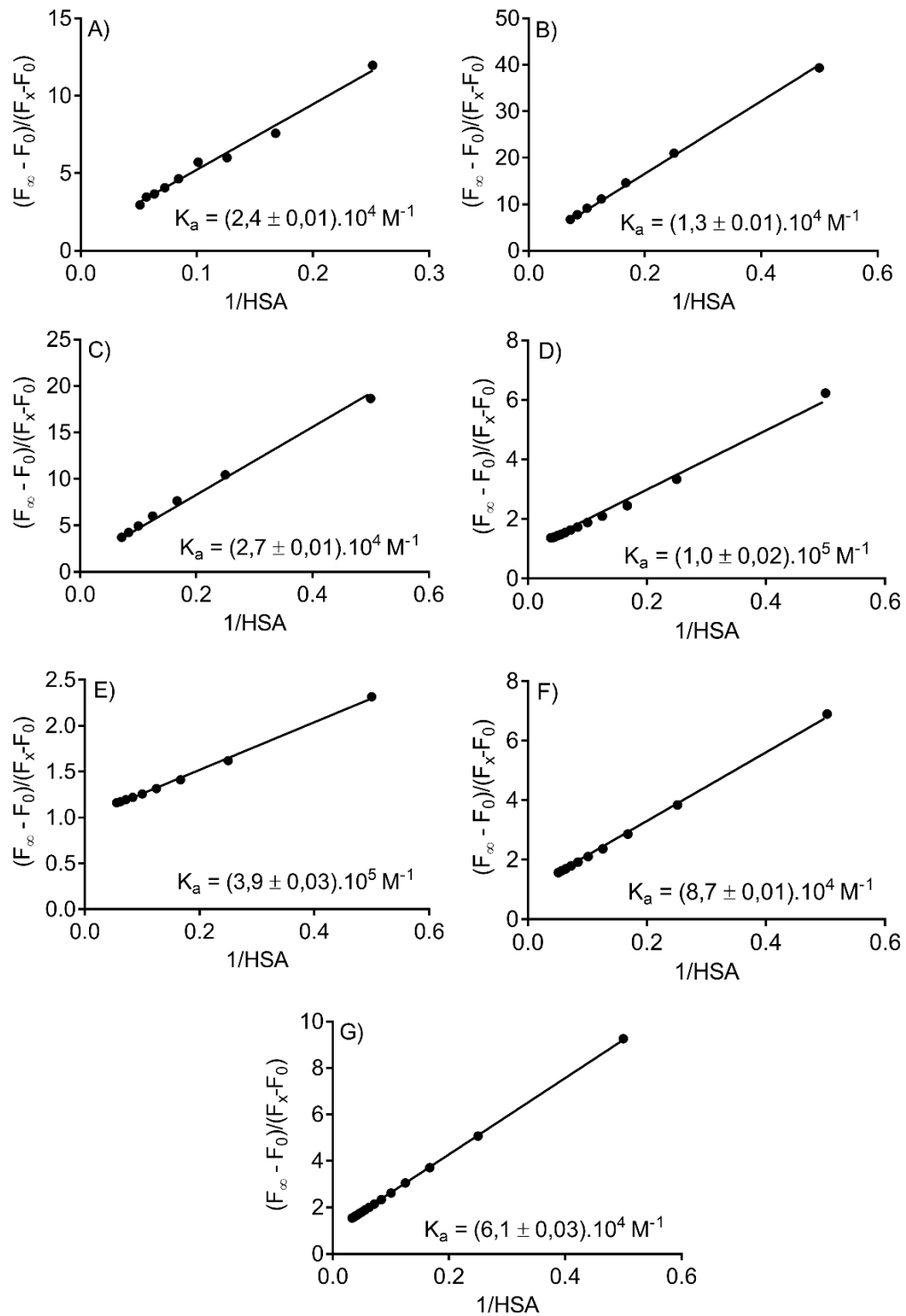


Figura A 4 - Espectros de fluorescência dos aminoácidos dansilados obtidos após a adição das sondas dansiladas.

(A) DL; (B) DA; (C) DC; (D) DP; (E) DN; (F) DG; (G) DS.

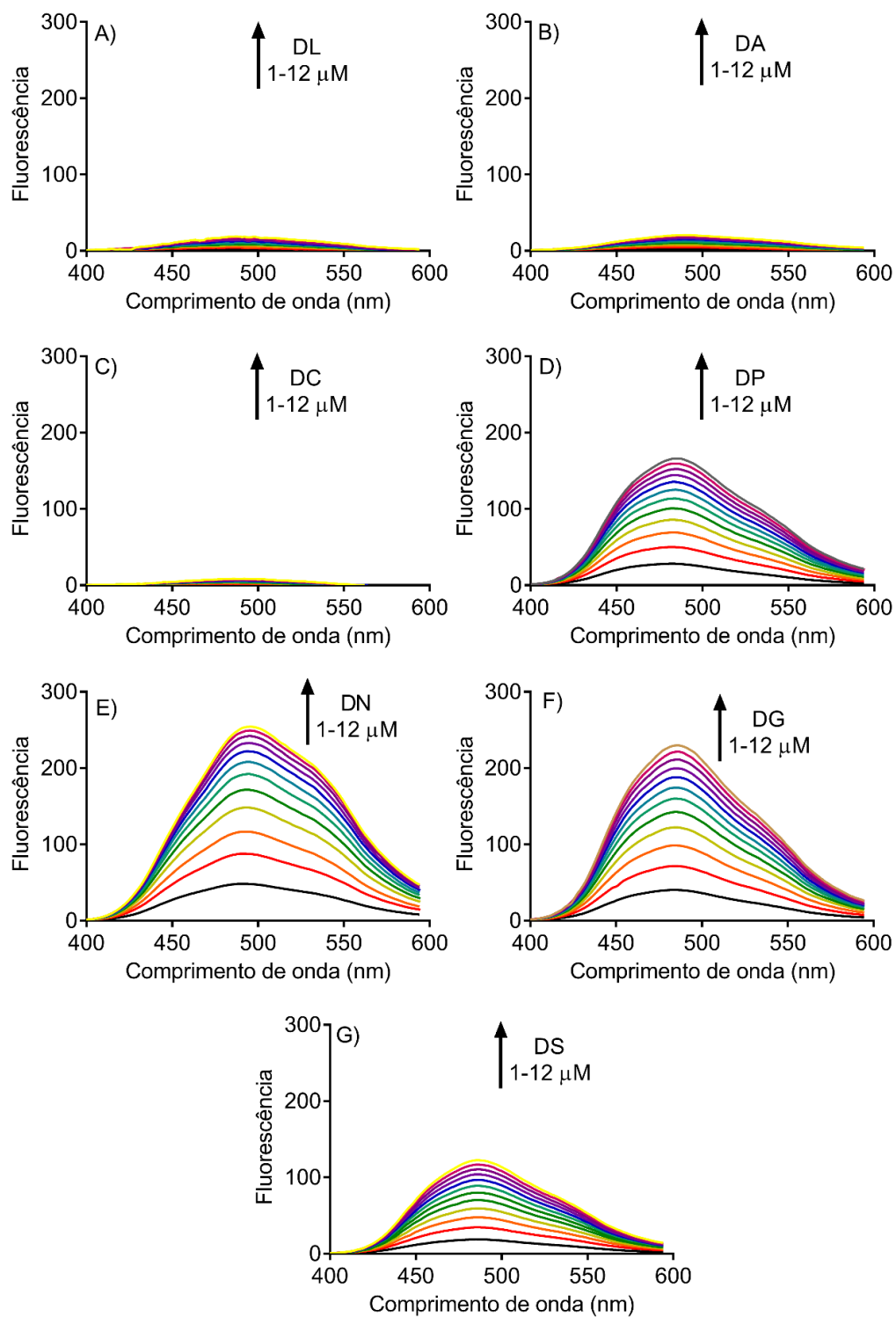


Figura A 5 - Determinação da constante de associação a partir da adição dos aminoácidos dansilados.

(A) DL; (B) DA; (C) DC; (D) DP; (E) DN; (F) DG; (G) DS.

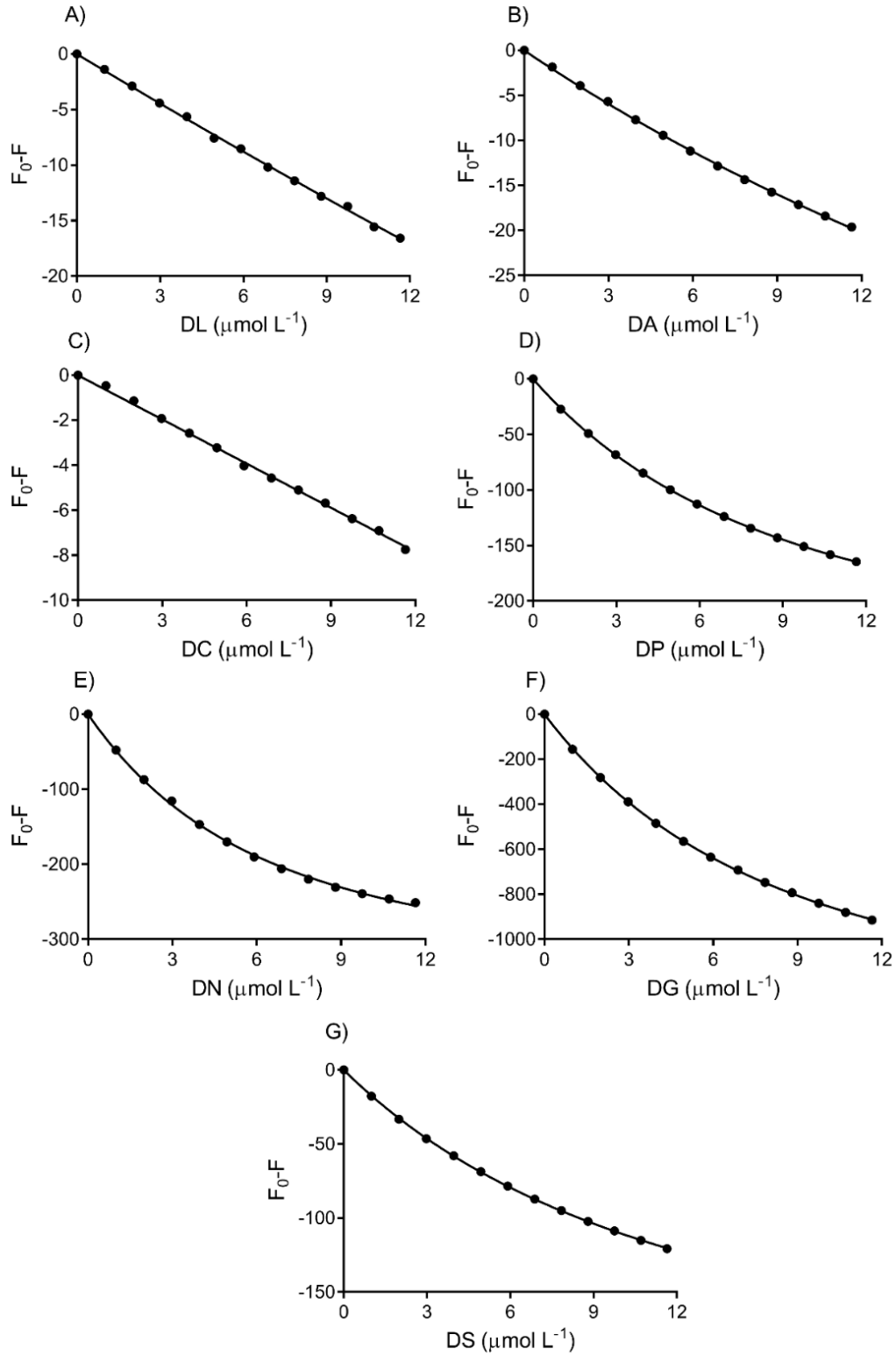


Figura A 6 - Espectros de *quenching* para os aminoácidos dansilados.

(A) DL; (B) DA; (C) DC; (D) DP; (E) DN; (F) DG; (G) DS.

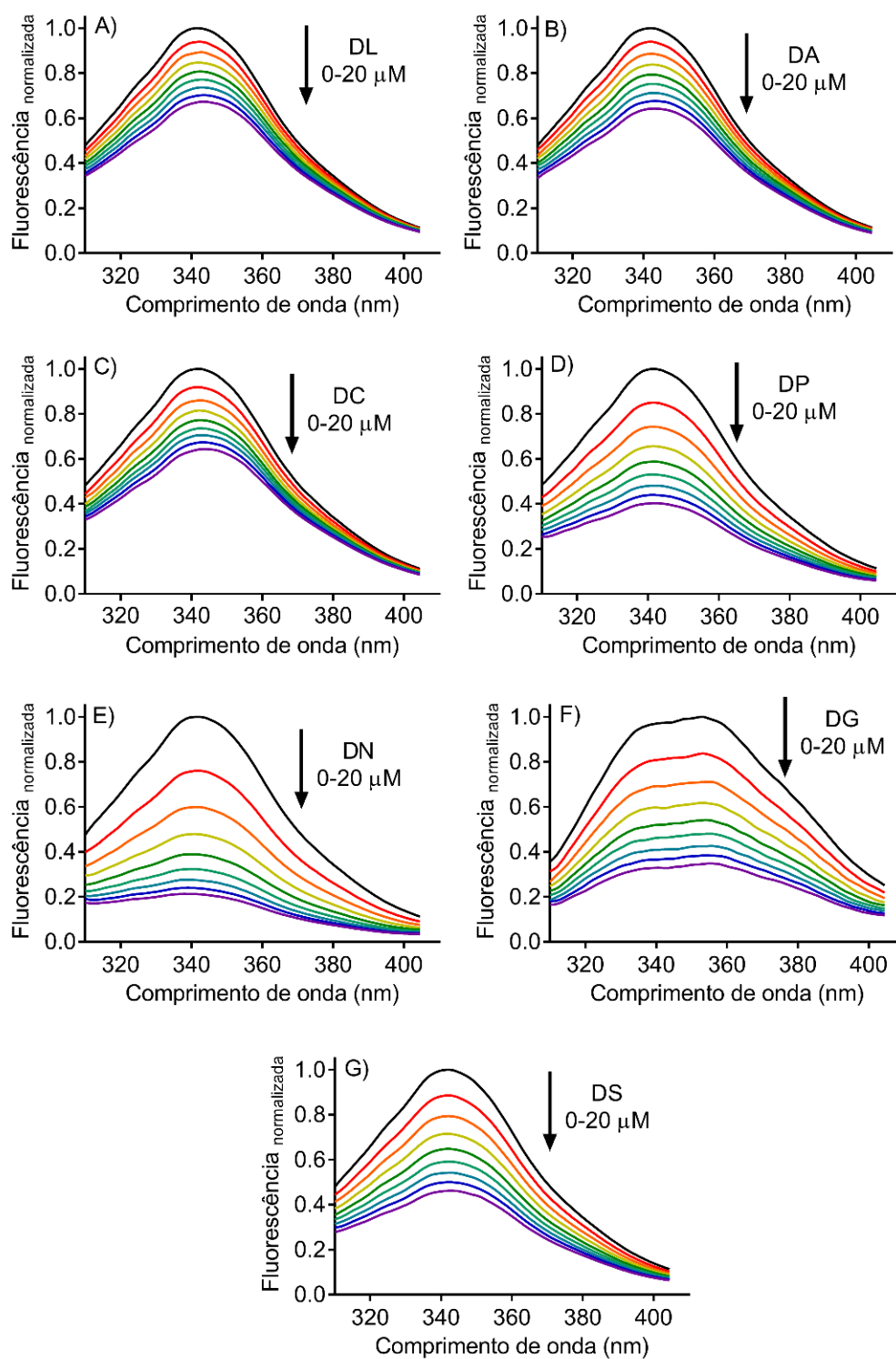


Figura A 7 - Determinação da constante de associação pelo *quenching* de fluorescência.
(A) DL; (B) DA; (C) DC; (D) DP; (E) DN; (F) DG; (G) DS.

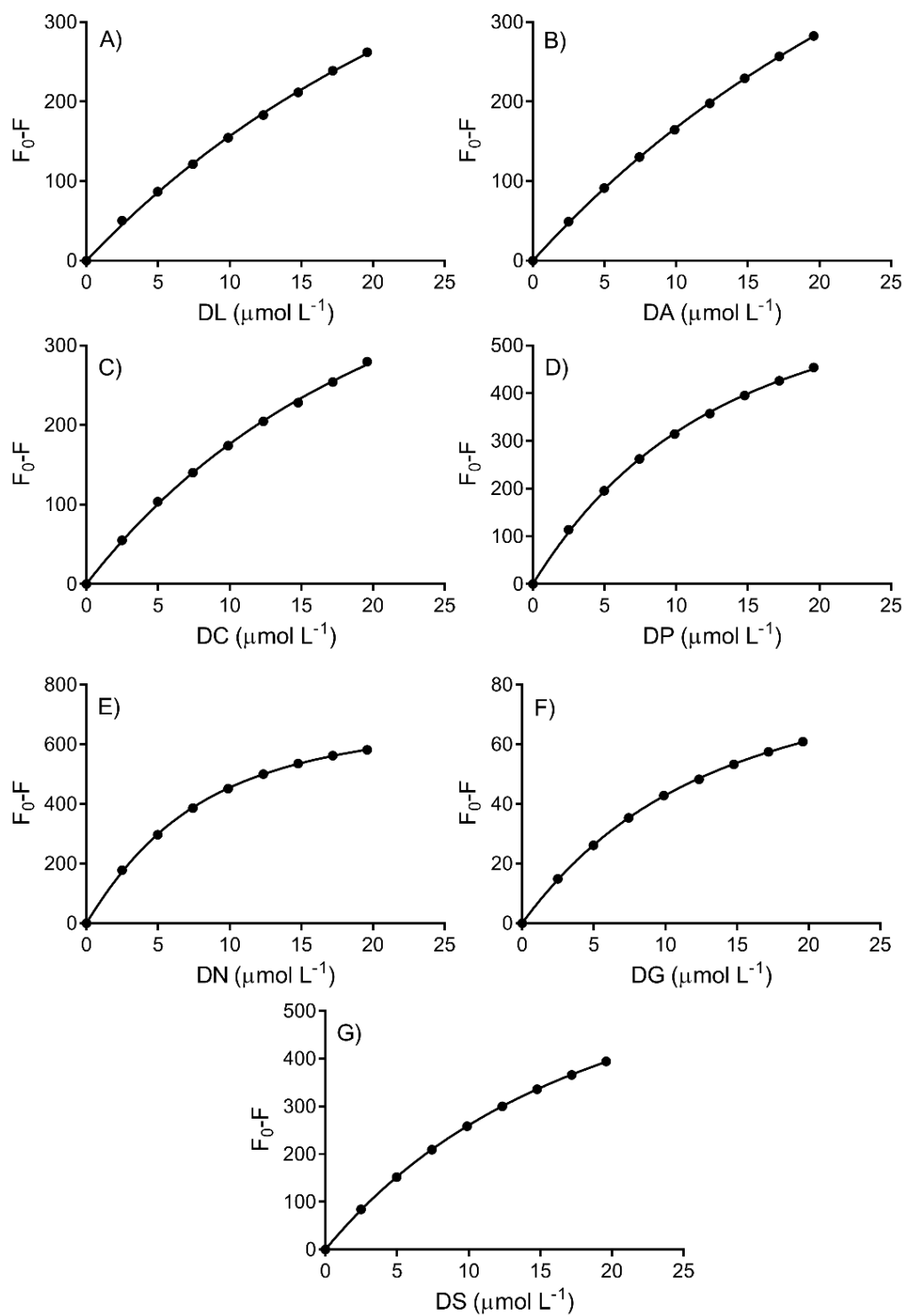


Figura A 8 - Espectros de fluorescência para os aminoácidos dansilados de sítio I após a adição de fenilbutazona (FBZ) ou ibuprofeno (IBU).

(A) DL com FBZ; (B) DL com IBU; (C) DA com FBZ; (D) DA com IBU; (E) DC com FBZ; (F) DC com IBU; (G) DGlu com FBZ e (H) DGlu com IBU.

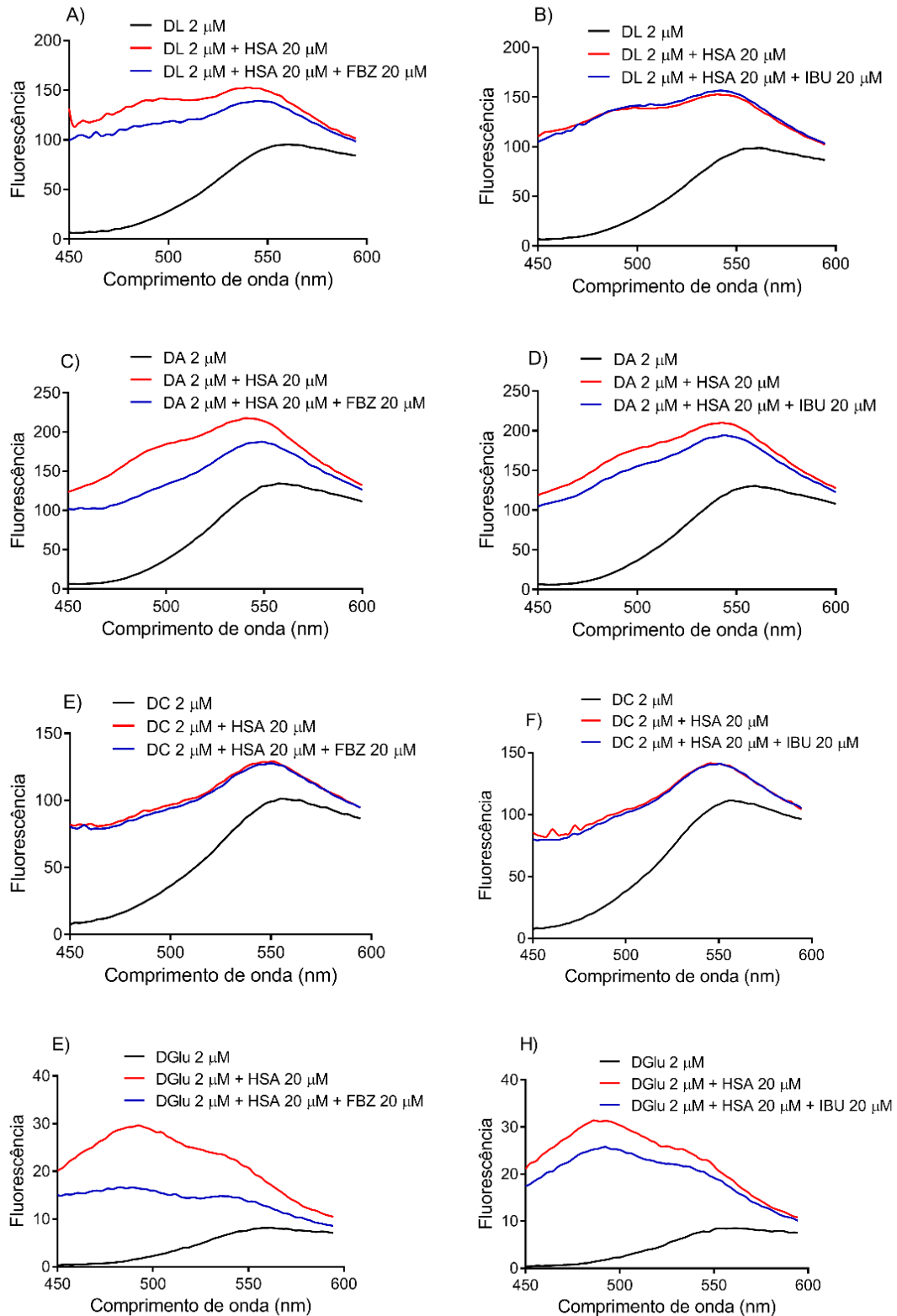


Figura A 9 - Espectros de fluorescência para os aminoácidos dansilados de sítio II após a adição de fenilbutazona (FBZ) ou ibuprofeno (IBU).

(A) DP com FBZ; (B) DP com IBU; (C) DN com FBZ; (D) DN com IBU; (E) DG com FBZ; (F) DG com IBU; (G) DS com FBZ e (H) DS com IBU.

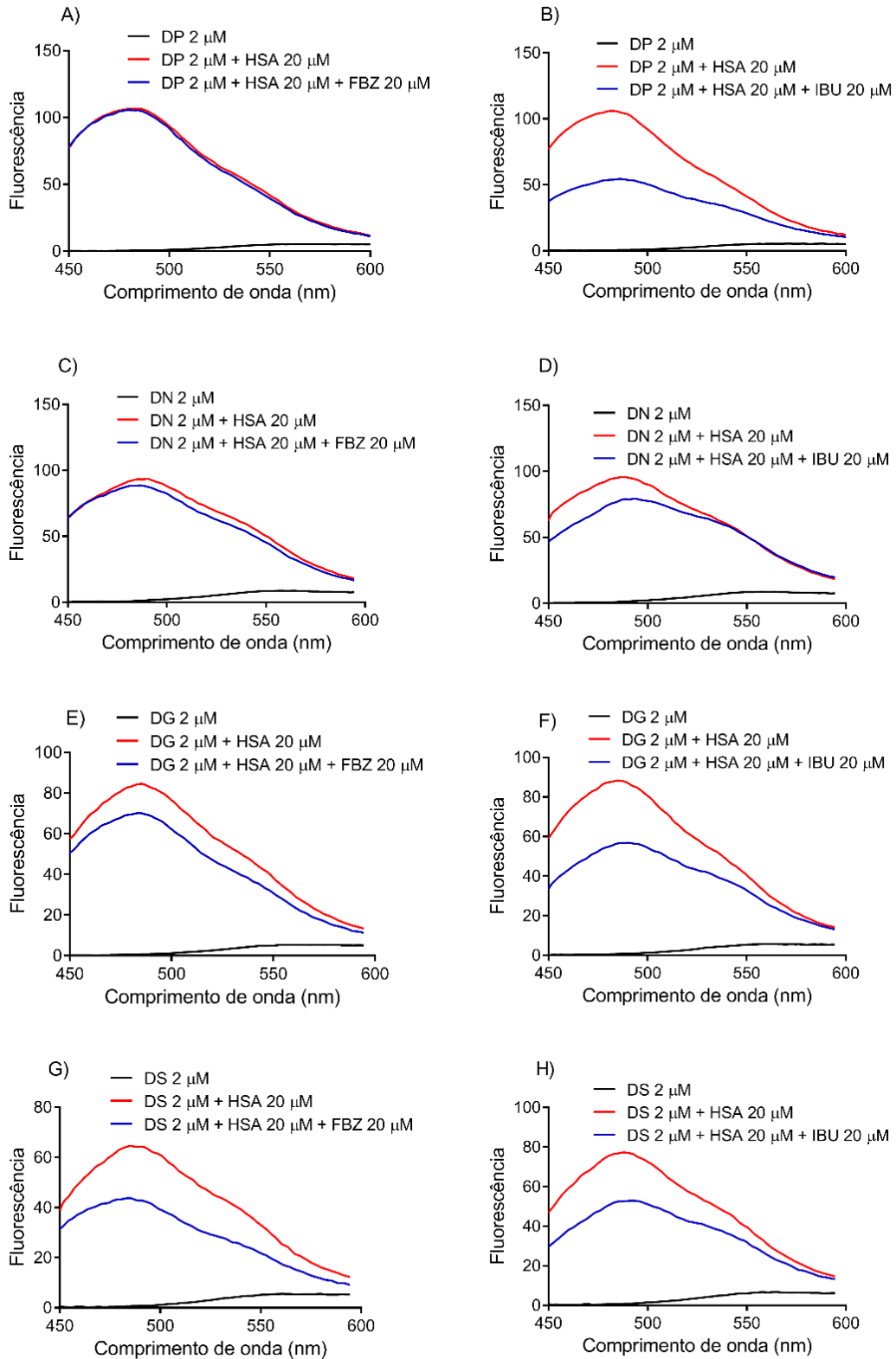


Figura A 10 - Espectros de dicroísmo circular para os aminoácidos dansilados em associação com a HSA.

(A) DL; (B) DA; (C) DC; (D) DP; (E) DN; (F) DG; (G) DS.

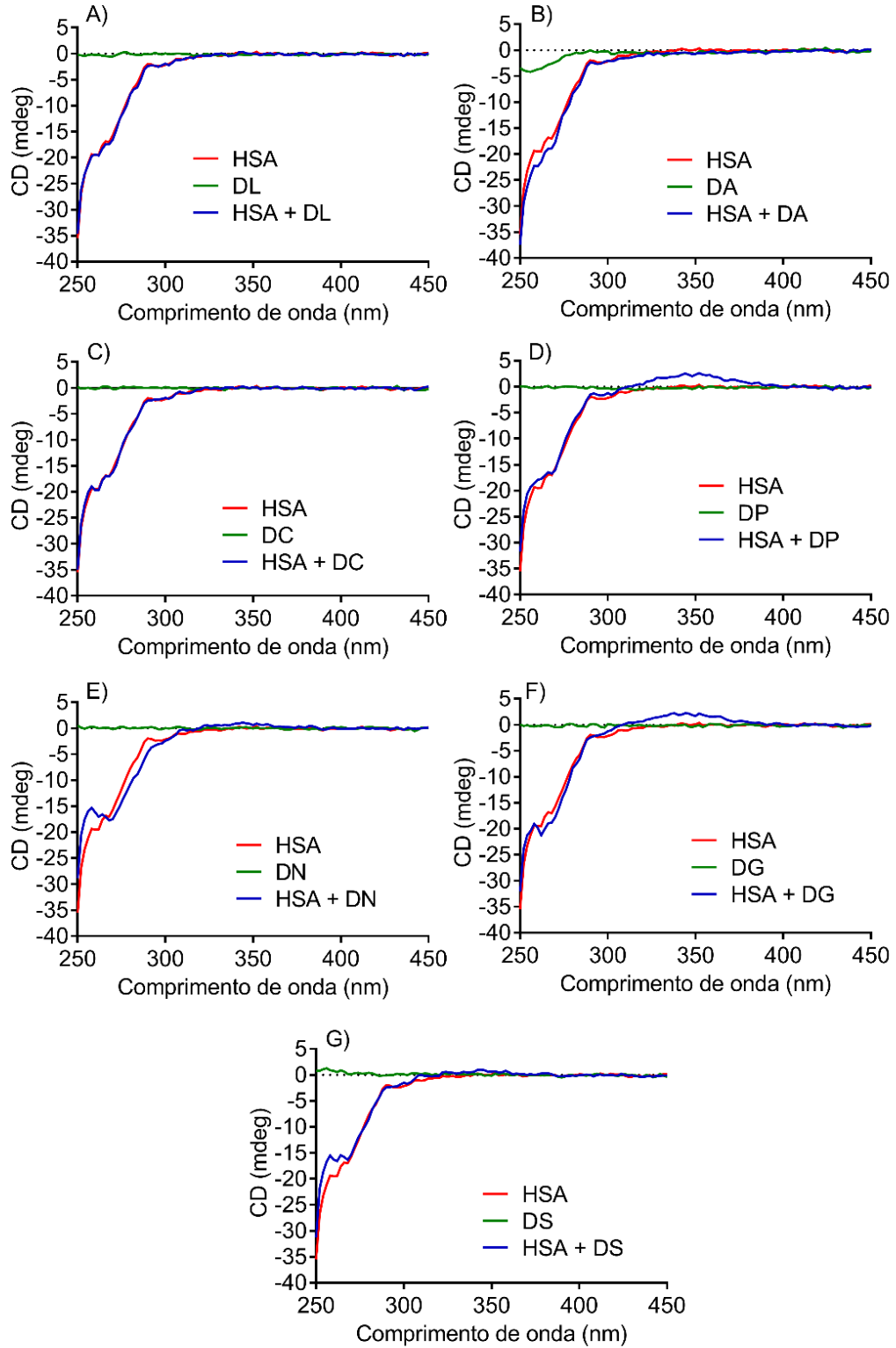


Figura A 11 - Espectros de dicroísmo circular para os aminoácidos dansilados em associação com a HSA – Avaliação de alterações na estrutura secundária da HSA.
(A) DL; (B) DA; (C) DC; (D) DP; (E) DN; (F) DG; (G) DS.

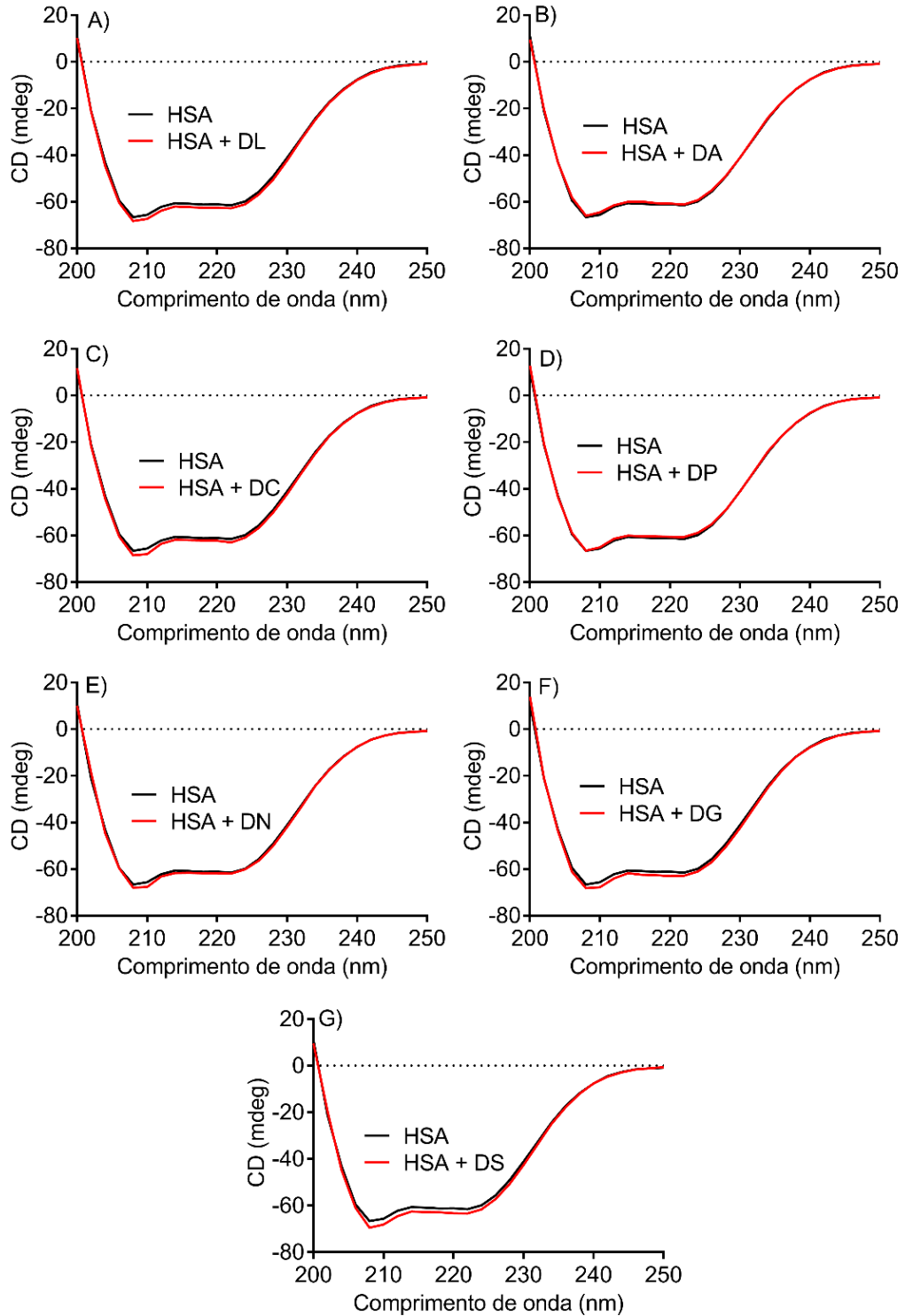


Figura A 12 - Espectros de dicroísmo circular para os aminoácidos dansilados de sítio II em competição com varfarina (VAR) e naproxeno (NPX).

(A) DP com NPX; (B) DP com VAR; (C) DN com NPX; (D) DN com VAR; (E) DG com NPX; (F) DG com VAR; (G) DS com NPX e (H) DS com VAR.

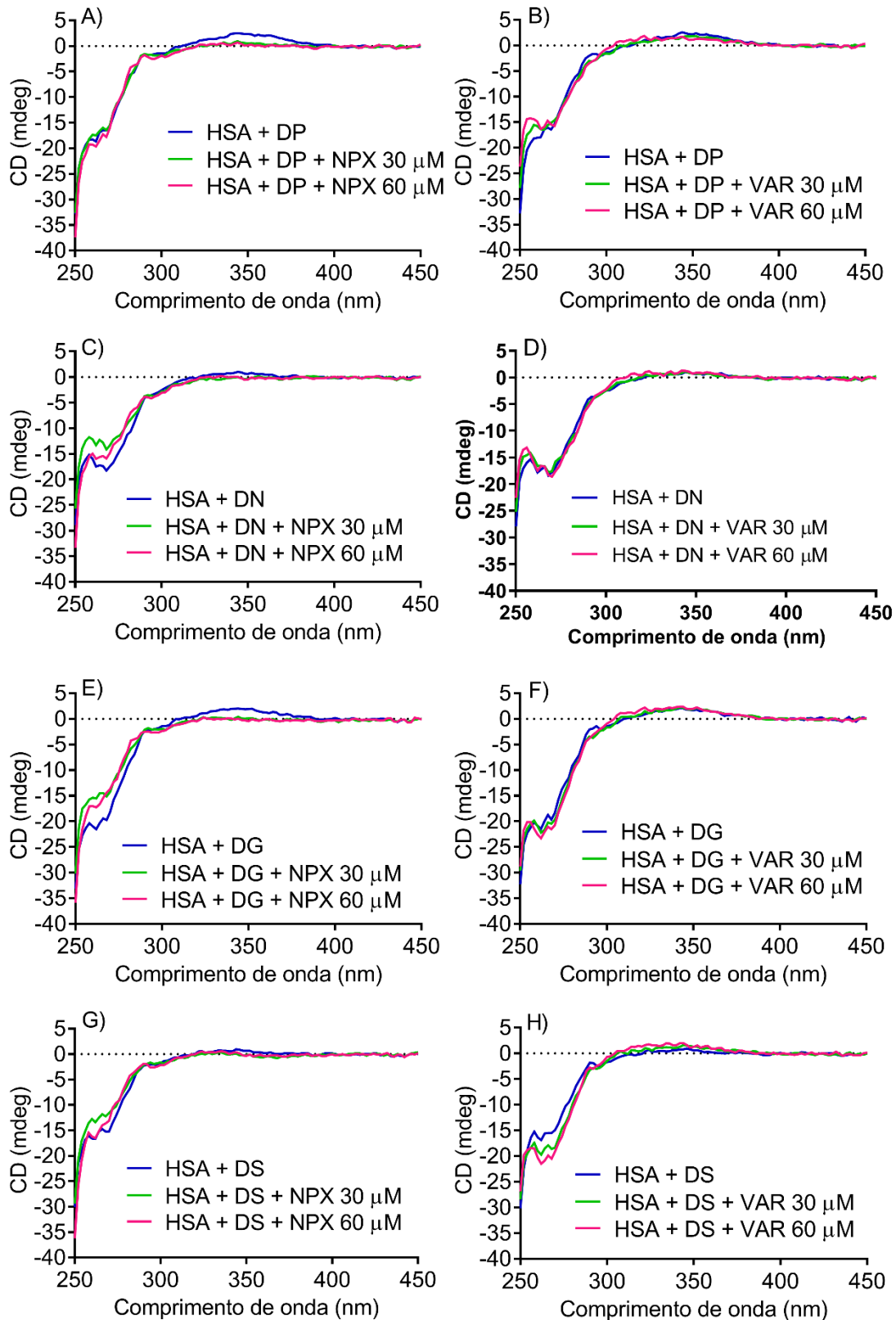


Figura A 13 - Perfil de ITC para o DL e o DG.

(A) Injeções sequenciais de DL na HSA. (B) Injeções sequenciais de DG na HSA (C) Ajuste linear obtido no modo independente. Injeções sequenciais de 10 μL de DL ou DG 1 mM em HSA 0,1 mmol L^{-1} .

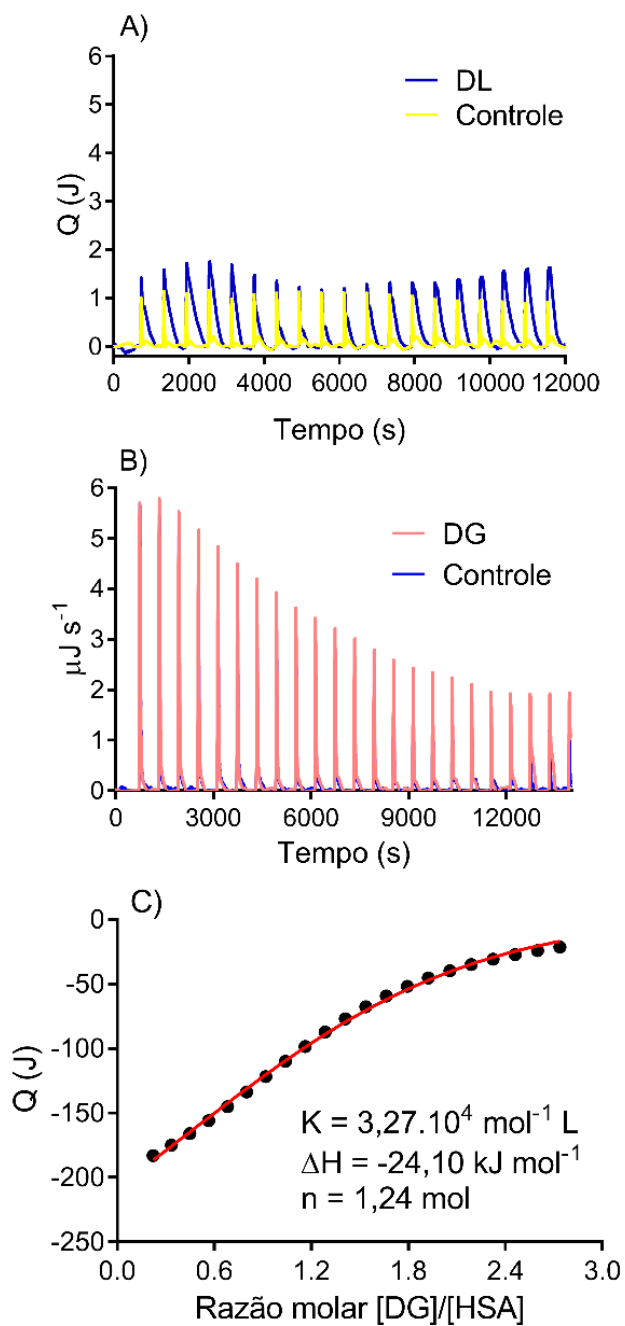


Figura A 14 - Sobreposição dos espectros de absorvância e fluorescência para a aplicação do FRET.

(A) DL; (B) DA; (C) DC; (D) DP; (E) DN; (F) DG; (G) DS.

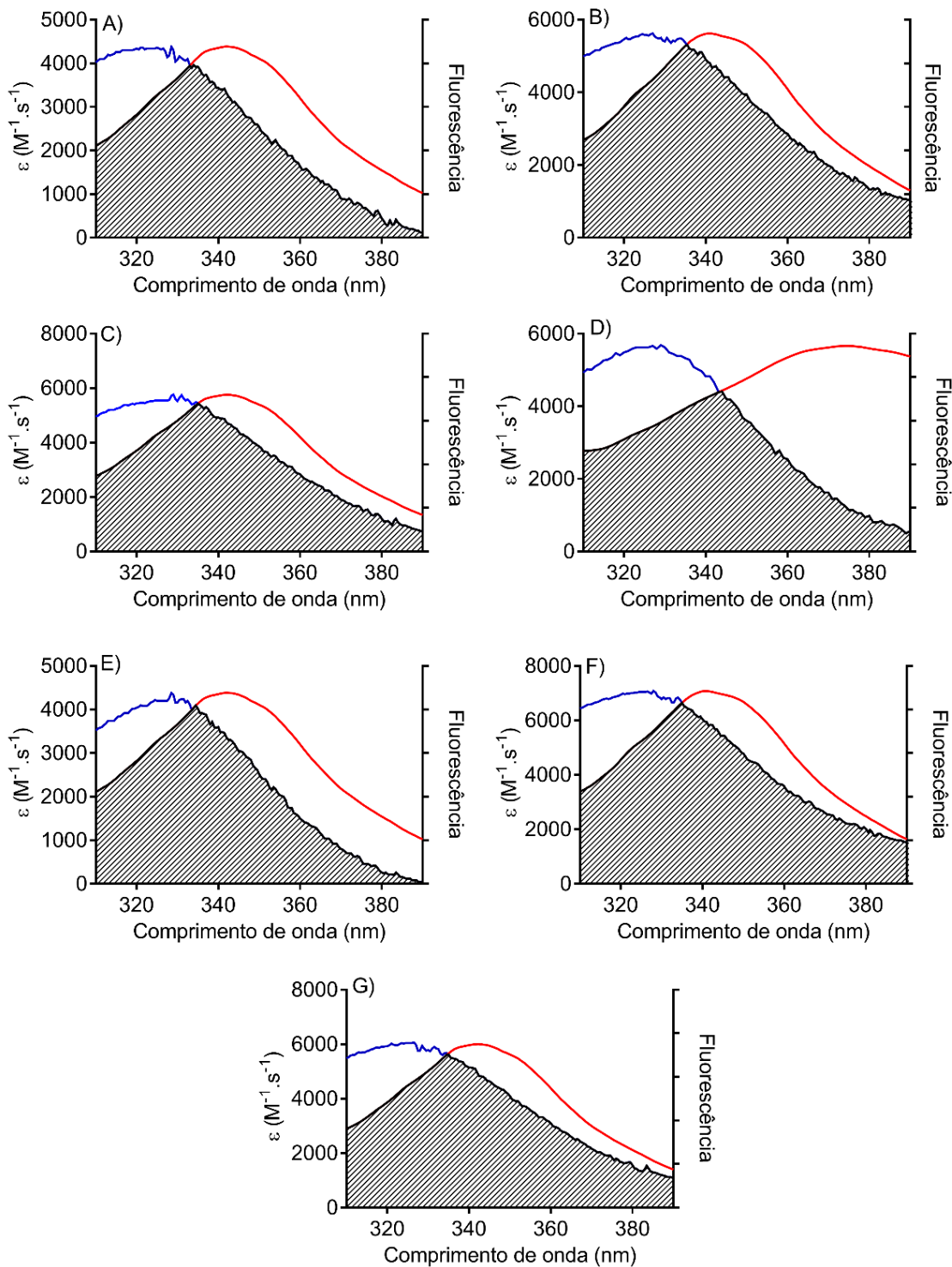


Figura A 15 - Determinação da constante de associação entre a DGlu e a HSA utilizando fluorescência.

(A) K_a pela adição de HSA; (B) K_a pela adição de DGlu; (C) K_{SV} ; (D) K_a por *quenching* de fluorescência.

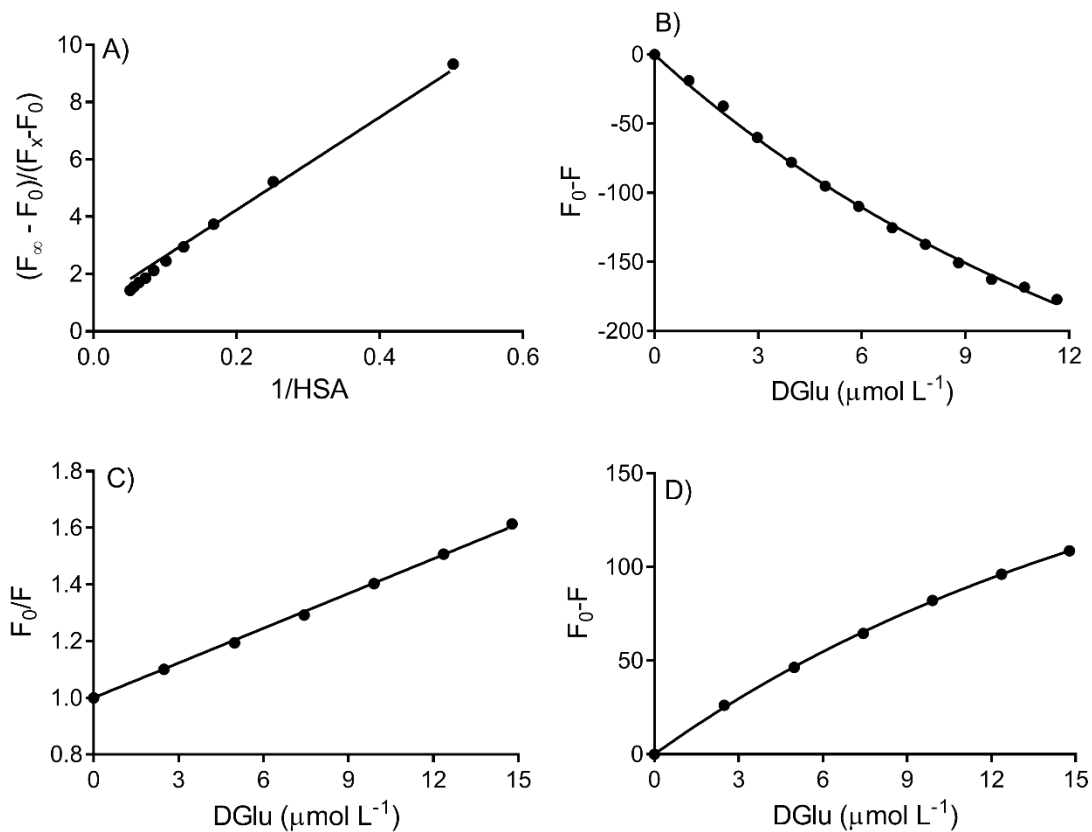


Figura A 16 - Interação dos aminoácidos dansilados na entrada e no interior do sítio I da HSA a partir do *docking* molecular

(A) DA no sítio I, (B) DC no sítio I e (C) DGlu no sítio I.

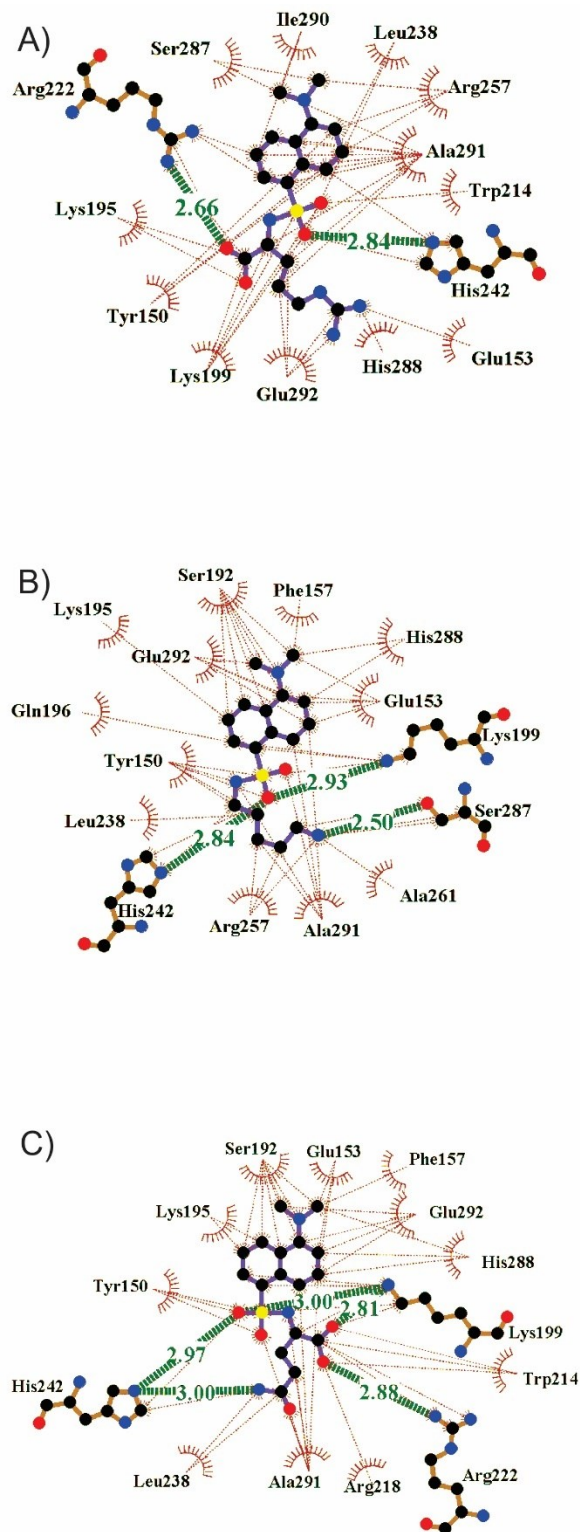


Figura A 17 - Interação entre os aminoácidos dansilados e o sítio II da HSA a partir de *docking* molecular.

(A) DG no sítio II da HSA; (B) DN no sítio II da HSA e (C) DS no sítio II da HSA.

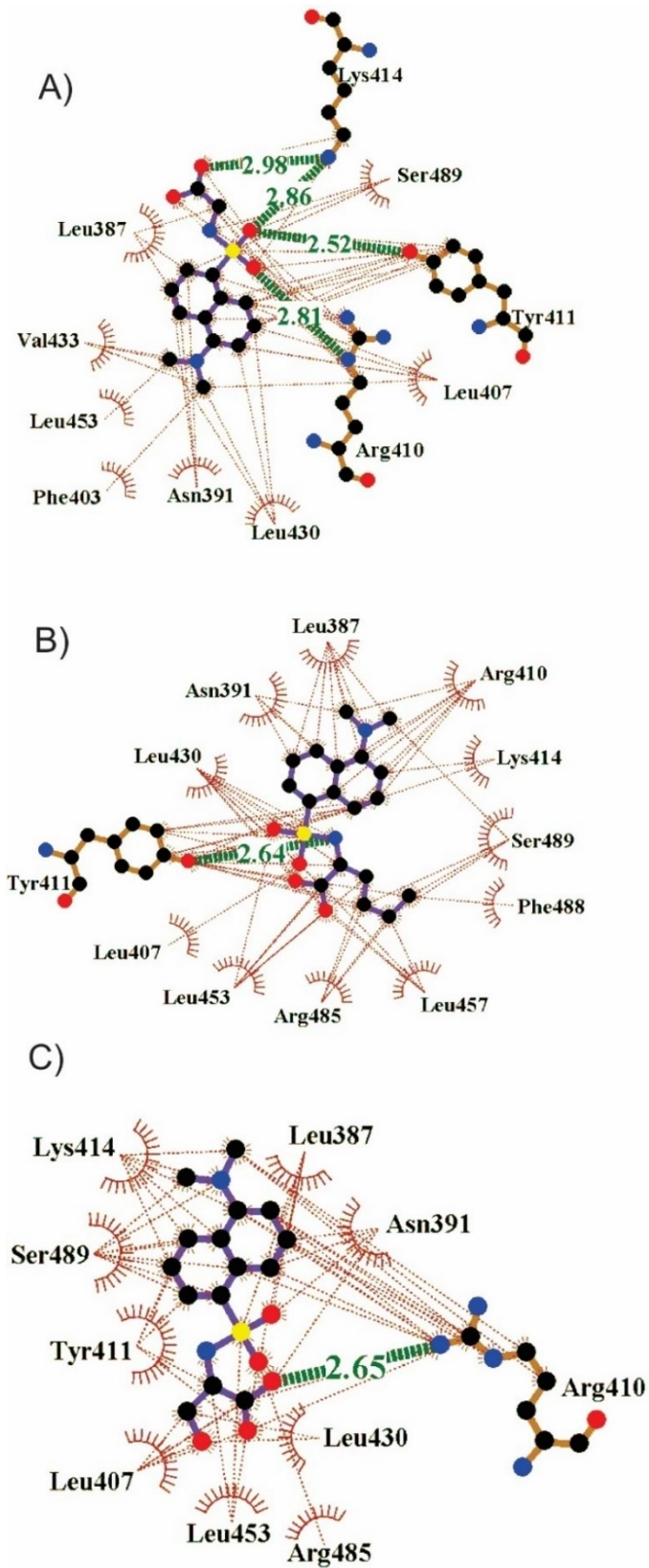


Figura A 18 - O processo de dissociação de DA (esquerda) e DP (direita) dos locais de ligação I e II, respectivamente.

Os ligantes e resíduos de HSA (na representação de bastões com átomos de carbono em magenta e verde, respectivamente) com a contribuição de energia de ligação livre inferior a -1,5 kcal / mol para o estado inicial (estado ligado) e a posição do ligante com a coordenada de reação de 10 Å e 15 Å são mostrados de cima para baixo, respectivamente.

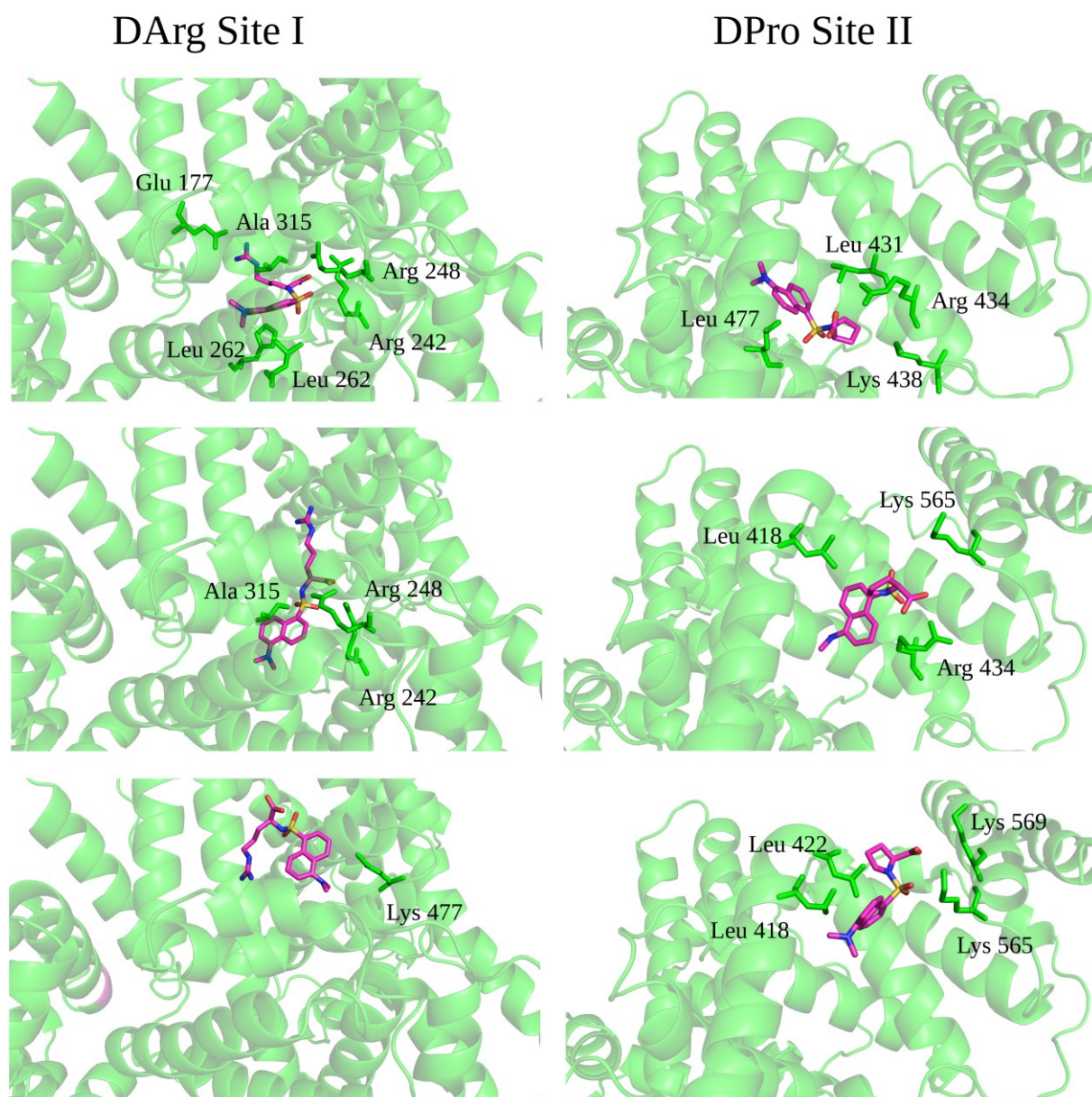


Tabela A 1 - Decomposição de energia livre de MM-GBSA por resíduo para os complexos de HSA com aminoácidos dansilados ligados nos sítios I e II.

A. Aminoácidos dansilados polares e carregados

| | Sítio I | | Sítio II | |
|--------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|
| | resíduo HSA | ΔG , kcal/mol | resíduo HSA | ΔG , kcal/mol |
| DA | Glu177 | -3,2 | Asn415 | -1,9 |
| | Arg242 | -9,6 | Leu431 | -1,7 |
| | Arg246 | -7,5 | Arg434 | -8,1 |
| | Leu262 | -2,2 | Lys438 | -4,4 |
| | His266 | -1,6 | Leu477 | -1,9 |
| | Ala315 | -2,0 | | |
| DGlu | Lys223 | -4,1 | Leu411 | -1,6 |
| | Arg242 | -9,9 | Asn415 | -2,2 |
| | Arg246 | -8,5 | Arg434 | -8,3 |
| | Leu262 | -2,1 | Lys438 | -7,1 |
| | His266 | -1,5 | Leu477 | -2,3 |
| | Ala315 | -2,7 | | |
| DL | Glu177 | -3,5 | Arg434 | -4,0 |
| | Ser216 | -2,5 | Lys438 | -6,2 |
| | Lys223 | -2,4 | Leu477 | -2,4 |
| | Arg242 | -9,1 | Ser513 | -1,6 |
| | Arg246 | -5,0 | | |
| | Leu262 | -1,9 | | |
| | Ala315 | -2,8 | | |
| Glu316 | -1,8 | | | |

B. Aminoácidos dansilados hidrofóbicos

| | Sítio I | | Sítio I' | | Sítio II | |
|--------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|
| | resíduo HSA | ΔG , kcal/mol | resíduo HSA | ΔG , kcal/mol | resíduo HSA | ΔG , kcal/mol |
| DP | Lys223 | -4,6 | Lys211 | -7,3 | Leu431 | -1,6 |
| | Arg242 | -2,4 | Trp226 | -2,1 | Arg434 | -3,3 |
| | Arg246 | -1,8 | Arg230 | -2,4 | Lys438 | -6,6 |
| | His266 | -2,0 | Leu231 | -1,6 | Leu477 | -2,0 |
| | Arg281 | -2,4 | Leu250 | -1,5 | | |
| His254 | | | -2,5 | | | |
| DG | Lys219 | -2,9 | Lys211 | -5,5 | Asn415 | -2,0 |
| | Lys223 | -3,2 | Trp226 | -1,7 | Arg434 | -6,3 |
| | Arg242 | -8,8 | Arg230 | -2,1 | Lys438 | -5,8 |
| | Arg246 | -1,9 | His254 | -3,3 | Leu477 | -2,3 |
| | Leu262 | -1,6 | | | | |
| | Ala315 | -2,4 | | | | |
| DN | Leu262 | -2,1 | Trp226 | -1,9 | Asn415 | -1,5 |
| | His266 | -1,7 | Arg230 | -2,1 | Leu431 | -1,7 |
| | Ala315 | -2,3 | Leu231 | -1,7 | Leu477 | -2,2 |

Anexo B

Figura B 1 - Perfil de ITC comparando a análise do branco com G8-BSA.

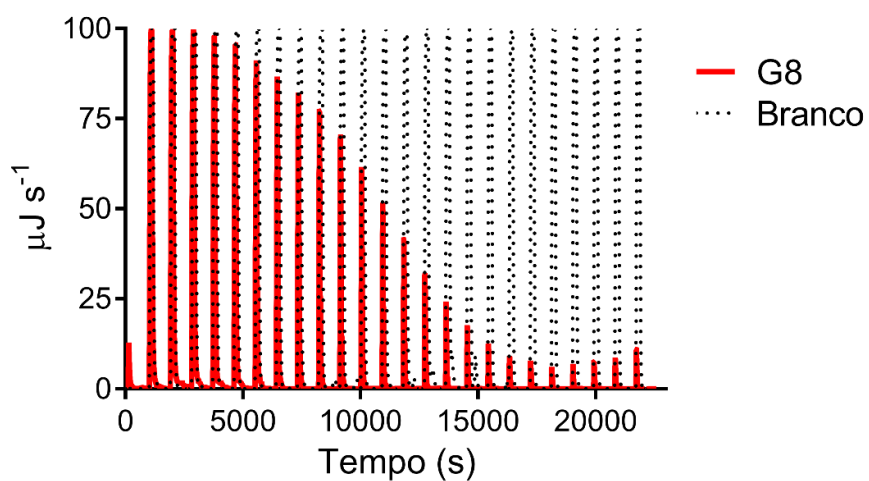


Figura B 2 - G0 no sítio II da BSA.

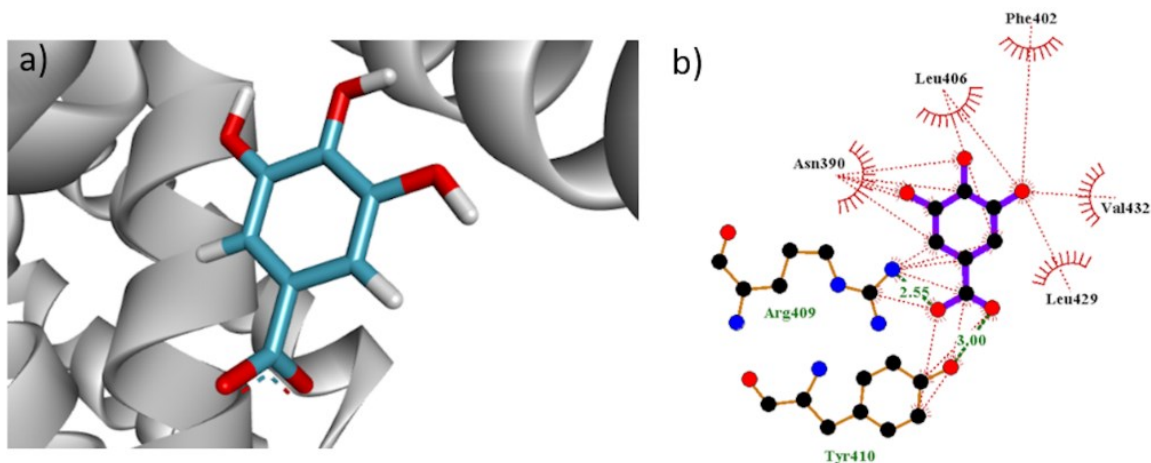


Figura B 3 - G0 no sítio III da BSA.

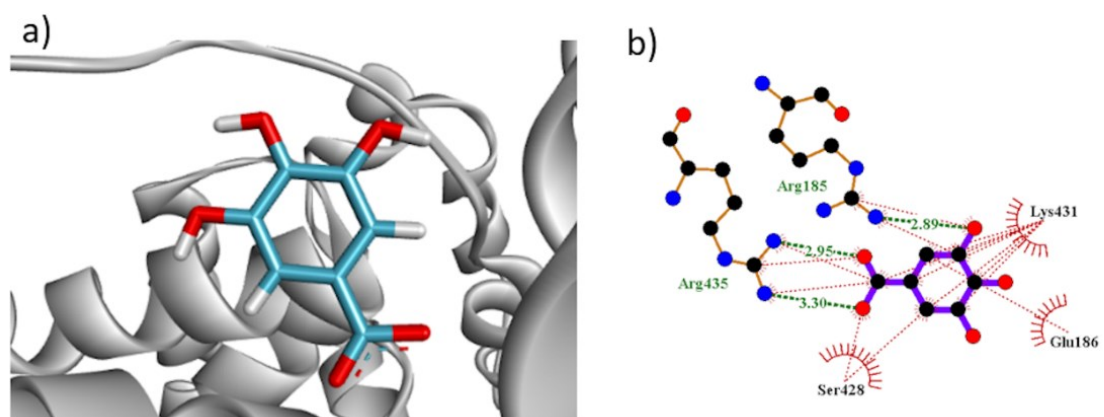


Figura B 4 - G0 no sítio VI da BSA.

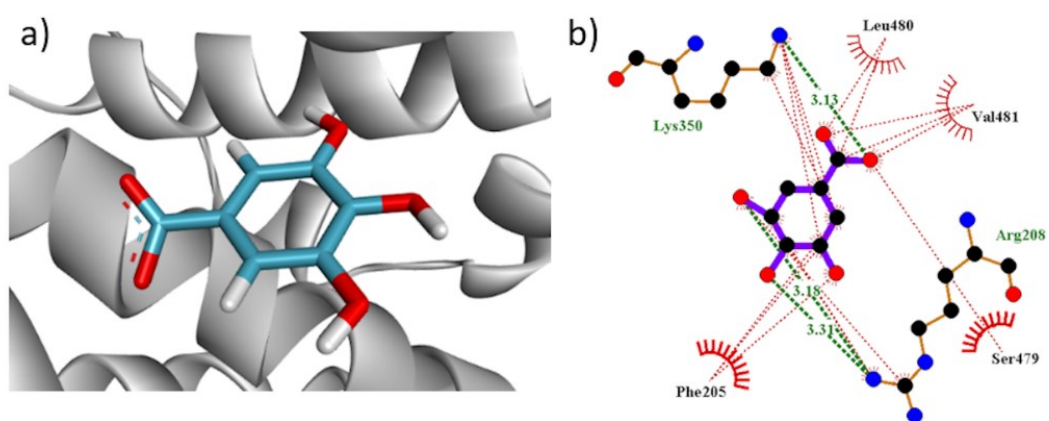


Figura B 5 - G8 no sítio III da BSA.

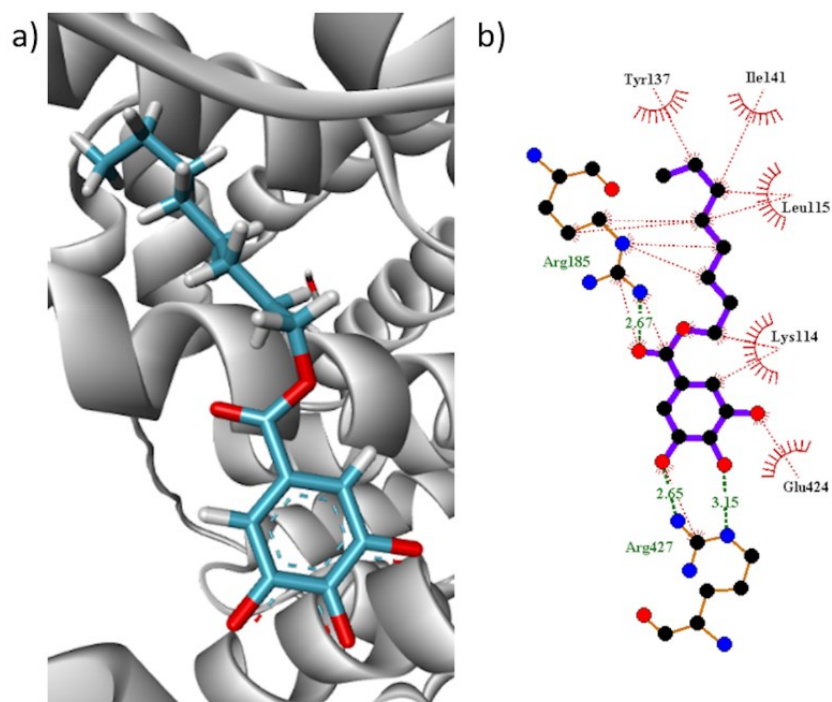


Figura B 6 - G8 no sítio VI da BSA.

