

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

MAURÍCIO IKEDA YOGUIM

Estudos da interação da Rosa de Bengala com a proteína Albumina do Soro Humano (HSA) sob aspectos experimentais e teóricos na caracterização dos sítios de ligação.

BAURU (SP)

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

MAURÍCIO IKEDA YOGUIM

Estudos da interação da Rosa de Bengala com a proteína Albumina do Soro Humano (HSA) sob aspectos experimentais e teóricos na caracterização dos sítios de ligação.

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 as orientações dos prof. Dr. Aguinaldo Robinson de Souza, prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes e prof^a. Dr^a. Ignez Caracelli.

BAURU (SP)

2021

Yoguim, Maurício Ikeda.

Estudos da interação da Rosa de Bengala com a proteína Albumina do Soro Humano (HSA) sob aspectos experimentais e teóricos na caracterização dos sítios de ligação / Maurício Ikeda Yoguim, 2021.

201 f. : il.

Orientadores: Aguinaldo Robinson de Souza, Valdecir Farias Ximenes e Ignez Caracelli

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

1. Rosa de Bengala. 2. Albumina do Soro Humano. 3. Espectro de ultra-violeta visível. 4. *Docking* molecular
I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências.
II. Título: Doutor.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Bauru



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

Aos 19 dias do mês de novembro do ano de 2021, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de MAURICIO IKEDA YOGUIM, intitulada “**Estudos da interação da Rosa de Bengala com a proteína Albumina do Soro Humano (HSA) sob aspectos experimentais e teóricos na caracterização dos sítios de ligação.**”. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Química Faculdade de Ciências / UNESP Campus de Bauru, Prof. Dr. FELIPE RODRIGUES DE SOUZA (Participação Virtual) do(a) Química / PUC-RJ, Prof. Dr. NELSON HENRIQUE MORGON (Participação Virtual) do(a) Departamento de Físico Química - Instituto de Química / Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. MARINONIO LOPES CORNELIO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / UNESP/Câmpus de São José do Rio Preto , Prof. Dr. DANIEL RINALDO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final **APROVADO**. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA

Dedico esse trabalho aos meus amigos e à minha família que me apoiaram durante todo o processo do doutorado. E também aos meus pais, avós e amigos que sempre torciam para as minhas conquistas, mas hoje, não podem estar presentes para celebrar mais uma das minhas realizações.

AGRADECIMENTOS

Esses anos de doutorado conheci pessoas que me auxiliaram muito na minha tese, assim venho agradecer com muita gratidão aos meus colegas de trabalho Luiza, Bruna, Ana Julia, Taina, Izabelle, Giulia, Carmen, Bruna, Victor e Willian. E também aos colegas da Unicamp, Lucas e Caio. Também quero agradecer ao departamento de Química da Unesp, aos funcionários (Vagner e em memória do Daniel), e também a todos os professores, que me acolheram e me auxiliaram ao meu retorno a universidade.

Quero agradecer especialmente aos meus coorientadores prof. Dr. Valdecir e prof. Dra. Ignez por me auxiliarem no procedimento dos estudos que envolvem a tese, como também a liberação do laboratório de pesquisa e softwares para os cálculos computacionais. Agradeço também pelas reuniões, discussões e ensinamentos/aula realizadas durante todo o processo do meu doutorado.

Quero agradecer imensamente ao prof. Dr. Aguinaldo, que me recebeu de braços abertos para o meu retorno universidade. Tenho total admiração e gratidão ao professor, pois foi ele que me proporcionou e me incentivou o meu primeiro projeto de pesquisa da iniciação científica durante o curso de graduação. Agradeço ao professor pela amizade que construímos, e também pelos vários conselhos.

Agradeço a todos os meus amigos na qual sempre estiveram ao meu lado, tanto nas horas felizes como tristes. Sem o apoio deles ficaria muito complicado a finalização desse trabalho, pois foram eles que me fortaleceram nos momentos mais difíceis da minha vida, assim muito obrigado Edijane, Fábio, Denise, Felipe, Paulo, Rycardo, Claudio, Japa, Orisson, Kelly, Luiz, João, Silmara, Daniel.

E os meus agradecimentos finais ficam para os meus familiares, que me deram muito apoio para que eu continuasse com os meus estudos e que eu conseguisse superar a cada etapa da minha vida.

“Execute cada ato da sua vida como se ele fosse o último.”

Marco Aurélio

Resumo

O corante Rosa de Bengala (RB) é um xanteno que possui algumas propriedades interessantes, como converter fotocataliticamente moléculas de oxigênio para o estado singlete (1O_2), e alterar a sua coloração de acordo com o valor de pH do meio. A compreensão da interação entre esse corante à macromoléculas biológicas é muito importante, porque estes estudos permitem compreender a formação de complexos como a proposição de mecanismos de interação e reação, estudos de reconhecimento à nível atômico e molecular dos sítios de ligação e a identificação das interações determinantes no processo de sua formação. A proteína escolhida para esse estudo foi a albumina do soro humano (HSA), que possui 9 sítios ativos para ácidos graxos (FA), ou 3 sítios de Sudlow, na qual é responsável por carrear compostos endógenos e exógenos para todo o organismo humano. Com os experimentos de Job's Plot foi possível determinar que 6 estruturas do corante estão interagindo à estrutura da proteína, e estes possuem um valor médio de $3,90 \pm 0,08 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (constante de associação). Como o corante se interage à estrutura da proteína, averigou quais são os sítios ativos que o corante teve maior afinidade, desse modo, realizou tanto os experimentos laboratoriais (competição de sítios), como teóricos (*docking* molecular). Para os resultados experimentais foram observados que o RB possui afinidades aos sítios Sudlow I (IIA), FA1 (IB) e FA6 (IIB), e não ao sítio Sudlow II (IIIA). Com os estudos de *docking* molecular foram comprovados os mesmos resultados obtidos experimentalmente, e ainda foi possível identificar uma possível região preferencial ao sítio FA6. Os estudos termodinâmicos auxiliaram a compreender melhor a formação desse complexo, desse modo tem-se um $\Delta H > 0$ (endotérmico), $\Delta S > 0$ (grau de desordem mínimo) e $\Delta G < 0$ (reversível e espontâneo). Foi averiguado também que a formação do complexo apresentou um comportamento semelhante do RB nos meios caráter menos polares. Percebeu também que o corante interage com a proteína mesmo em situação onde há a deformação estrutural protéica, ocasionado por alguma patologia como Alzheimer, Diabetes e parkinson.

Palavras-chave: *Rosa de Bengala, Albumina do Soro Humano, Espectro de ultra-violeta visível, Docking molecular.*

Abstract

The Rose Bengal (RB) dye is a xanthene that has some very interesting properties, such as photocatalytically converting oxygen molecules to the singlet state ($^1\text{O}_2$), and also changing its color according to the pH value of the medium. Understanding the interaction between this dye and biological macromolecules, for example, is very important, as these studies allow us to understand the formation of complexes such as the preposition of interaction and reaction mechanisms, recognition studies at the atomic and molecular level of binding sites, and the identification of the determinant interactions in the process of its formation. The protein chosen for this study was human serum albumin (HSA), which has 9 active sites for fatty acids (FA), or 3 Sudlow sites, which is responsible for carrying endogenous and exogenous compounds to the entire human body. With the Job's Plot experiments it was possible to determine that 6 dye structures are interacting with the protein structure, and these have a mean value of $3.90 \pm 0.08 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (association constant). As the dye interacts with the protein structure, it investigated which active sites the dye had the greatest affinity, thus, it carried out both laboratory (site competition) and theoretical (molecular *docking*) experiments. For the experimental results, it was observed that RB has affinities to the Sudlow I (IIA), FA1 (IB) and FA6 (IIB) sites, and not to the Sudlow II (IIIA) site. With the molecular *docking* studies, the same results obtained experimentally were proven, and it was still possible to identify a possible preferential region to the FA6 site. Thermodynamic studies helped to better understand the formation of this complex, thus having a $\Delta H > 0$ (endothermic), $\Delta S > 0$ (minimum degree of disorder) and $\Delta G < 0$ (reversible and spontaneous). It was also verified that the formation of the complex presented a similar behavior to the RB in the less polar character media. He also noticed that the dye interacts with the protein even in a situation where there is structural protein deformation, caused by some pathology such as Alzheimer's, Diabetes and Parkinson's.

Keywords: *Rose Bengal, Human Serum Albumin, Ultraviolet-visible spectrum, Docking molecular*

SUMÁRIO

Resumo	VII
Abstract	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XV
LISTA DE TABELAS	XXIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. PROTEÍNA ALBUMINA DO SORO HUMANO	3
2.1 Propriedades estruturais	3
2.1.1 Propriedades dos complexos da Proteína Albumina do Soro Humano com ligantes.....	4
2.1.2 Mapeamento dos Sítios de interação na Proteína Albumina do Soro Humano.....	5
2.1.2.1 Classificação dos Sítios de Interações por Ácido Graxos.....	6
2.1.2.2 Classificação dos Sítios de Interações por Fármacos	8
2.1.2.2.1 Sítio de ligação Sudlow I.....	9
2.1.2.2.2 Sítio de ligação Sudlow II.....	11
2.1.2.2.3 Sítio de ligação III para fármacos ou Sítio 1 para ácidos graxos	12
2.2 Corante Xantênico	13
2.2.1 Corante Rosa de Bengala.....	16
2.2.1.1 Aplicações	18
2.2.1.1.1 Medicina	18
2.2.1.1.2 Armamentos Químicos.....	20
2.2.1.1.3 Células Solares	21
2.3 Técnicas utilizadas na metodologia de investigação da interação entre corante Rosa de Bengala e proteína HSA.	22
2.3.1 <i>Docking</i> Molecular.....	23
2.3.2 Espectroscopia de UV-vis	26
2.3.2.1 Lei de Beer-Lambert.....	27
2.3.3 Constante de Associação ou Constante de Interação ou Constante de Afinidade ou Constante de Ligação.	28
2.3.4 Método de Benesi-Hildebrand.....	29
3. OBJETIVOS	30

3.1	Objetivo Geral	30
3.2	Objetivos Específicos.....	30
4.	MATERIAS E MÉTODOS.....	30
4.1	Softwares	30
4.2	Reagentes.....	30
4.3	Equipamentos	31
4.4	Preparo de Soluções.....	31
4.4.1	Tampão Fosfato.....	31
4.4.2	Tampão Citrato	32
4.4.3	Corante Rosa de Bengala.....	32
4.4.4	Proteína Albumina do Soro Humano	32
4.4.5	Varfarina	32
4.4.6	Ibuprofeno.....	32
4.4.7	Diflunisal	33
4.4.8	Diazepam.....	33
4.4.9	Digitoxina	33
4.4.10	Biliverdina.....	33
4.4.11	Ácido Linoleico	33
4.4.12	Glicose.....	33
4.4.13	Azida de Sódio	34
4.4.14	Borato de Sódio	34
4.4.15	Dodecil Sulfato de Sódio	34
4.4.16	Metionina.....	34
4.4.17	Ácido Hipocloroso.....	34
4.4.18	Ácido Hipobromoso	34
4.4.19	Tioflavina T	34
4.4.20	Nitrato de Níquel.....	35
4.4.21	Sulfato de Cobre	35
4.4.22	Acetato de Chumbo.....	35
4.4.23	Sulfato de Zinco	35
4.5	Metodologia	35
4.5.1	<i>Docking</i> Molecular	35

4.5.1.1 Software Autodock 4.2.6	36
4.5.1.1.1 Conformação estrutural da proteína HSA cristalográfica	36
4.5.1.1.2 <i>Docking</i> Cego	36
4.5.1.1.3 Procedimento de <i>docking</i> molecular no software Autodock 4.2.6	37
4.5.1.1.3.1 Sítio de Sudlow I	37
4.5.1.1.3.2 Sítio de Sudlow II	37
4.5.1.1.3.3 Sítio III de fármacos ou Sítio FA1	38
4.5.1.1.3.4 Sítio FA6.....	39
4.5.1.2 Software GOLD 5.5.....	40
4.5.1.2.1 Conformação estrutural da proteína HSA cristalográfica	40
4.5.1.2.2 <i>Redocking</i> Molecular	40
4.5.1.2.3 Estrutura conformacional do corante Rosa de Bengala	41
4.5.1.2.4 Cálculo do <i>Docking</i> Molecular.....	42
4.5.2 Estudos para a determinação das interações atrativas e repulsivas da interação entre o corante RB à proteína HSA	43
4.5.3 Determinação da constante de ligação do corante RB à proteína HSA... ..	45
4.5.4 Determinação do sítio de ligação na HSA	46
4.5.4.1 Ensaio de deslocamento utilizando a Varfarina	46
4.5.4.2 Ensaio de deslocamento utilizando o Ibuprofeno	46
4.5.4.3 Ensaio de deslocamento utilizando o Diflunisal	47
4.5.4.4 Ensaio de deslocamento utilizando o Diazepam.....	47
4.5.4.5 Ensaio de deslocamento utilizando a Digitoxina	47
4.5.4.6 Ensaio de deslocamento utilizando a Biliverdina	47
4.5.4.7 Ensaio de deslocamento utilizando o Ácido Linoleico.....	48
4.5.4.8 Ensaio de deslocamento utilizando Varfarina, Ibuprofeno, Biliverdina e Ácido Linoleico.....	48
4.5.5 Determinação da quantidade proporcional entre ligante e proteína	48
4.5.6 Influência do meio reacional	49
4.5.6.1 Influência da variação do pH do meio reacional	50
4.5.6.2 Influência da variação da polaridade do meio reacional.....	50
4.5.6.3 Influencia da variação da temperatura no meio reacional	50
4.5.7 Efeito do íon metálico na interação do corante RB à proteína HSA	51

4.5.8 Comportamento do corante RB em diferentes conformações da proteína HSA.....	51
4.5.8.1 Ensaio de Glicação da Proteína HSA.....	51
4.5.8.2 Ensaio de Oxidação da Proteína HSA.....	52
4.5.8.2.1 Oxidação da Proteína HSA por Ácido Hipocloroso.....	53
4.5.8.2.2 Oxidação da Proteína HSA por Ácido Hipobromoso.....	53
4.5.8.3 Ensaio de Desnaturação da Proteína HSA.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1 <i>Docking</i> Molecular.....	55
5.1.1 <i>Docking</i> cego.....	56
5.1.2 Software Autodock.....	58
5.1.2.1 Sítio Sudlow I.....	58
5.1.2.2 Sítio Sudlow II.....	61
5.1.2.3 Sítio FA1.....	62
5.1.2.4 Sítio FA6.....	65
5.1.3 Software GOLD 5.5.....	67
5.1.3.1 Seleção da estrutura da proteína HSA.....	67
5.1.3.2 Sítio Sudlow I.....	72
5.1.3.3 Sítio FA1.....	75
5.1.3.4 Sítio Sudlow II.....	78
5.1.3.5 Sítio FA6.....	84
5.1.4 Comparando os resultados de <i>docking</i> molecular.....	87
5.1.4.1 Sítio Sudlow I.....	89
5.1.4.2 Sítio Sudlow II.....	91
5.1.4.3 Sítio FA1.....	91
5.1.4.3 Sítio FA6.....	92
5.2 Constante de associação.....	94
5.2.1 Variando a Concentração da Rosa de Bengala.....	94
5.2.2 Determinação do Sítio de ligação.....	96
5.2.2.1 Sítio Sudlow I.....	97
5.2.2.1.1 Varfarina.....	97
5.2.2.2 Sítio Sudlow II.....	99

5.2.2.2.1 Ibuprofeno	99
5.2.2.2.2 Diflunisal	102
5.2.2.2.3 Diazepam	105
5.2.2.3 Sítio FA1	107
5.2.2.3.1 Digitoxina	107
5.2.2.3.2 Biliverdina	111
5.2.2.4 Ácido Linoleico	113
5.2.2.5 Sondas específicas de cada sítio com Ácido Linoleico.....	115
5.3 Proporção entre Proteína-Ligante	119
5.4 Influências do Meio Reacional	121
5.4.1 Variando a polaridade do meio reacional	121
5.4.2 Variando o valor de pH	124
5.4.3 Efeito do íon metálico na interação do corante RB à proteína HSA	128
5.4.4 Estudo Termodinâmico	131
5.5 Aplicações do corante em diferentes proteínas	135
5.5.1 Proteína HSA Glicada	135
5.5.2 Proteína HSA Oxidada.....	140
5.5.3 Proteína HSA Desnaturada.....	143
6. CONCLUSÕES.....	147
7. PERSPECTIVAS	149
7.1 Tese	149
7.2 Aluno.....	149
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	150
APÊNDICE.....	166

LISTA DE ABREVIATURAS

HSA – Albumina do Soro Humano
RB – Rosa de Bengala
FA – Ácido Graxo
LGA – Algoritmo Genético Lamarckiano
DS – Discovery Studio Visualizer 2020
VMD – Visual Molecular Dynamics
NCI —Interações não covalentes
vdw – Van der Waals
LH – Ligação de Hidrogênio
UV-vis – Ultravioleta/Visível
AGEs – Produtos Finais de Glicação Avançada
MGO – Metilgloxical
THT – Tioflavina T
THF – Tetrahidroxifurano
DMF – Dimetilfuramida
Arg – Arginina
Ala – Alanina
Asp – Asparagina
Glu – Ácido Glutâmico
Leu – Leucina
Ser – Serina
Trp – Triptofano
Tyr – Tirosina
Val – Valina
SCF - Campo auto-consistente
DFT - Teoria do Funcional de Densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do corante Rosa de Bengala no formato em 2D realizado no software Chemdraw.	1
Figura 2. Estrutura da proteína HSA com seus respectivos domínios e subdomínios.	4
Figura 3. Classificação dos sítios de interações em base aos ácidos graxos (Fonte: ASCENZI <i>et al.</i> , 2015).	6
Figura 4. Classificação dos sítios de interação (Fonte: KHAIBRAKHMANOVA <i>et al.</i> , 2020 - modificado).	9
Figura 5. Região do sítio Sudlow I da proteína HSA. (Fonte: YAMASAKI <i>et al.</i> , 1996 - modificada).	11
Figura 6. Localização do sítio Sudlow I na proteína HSA, representada pelos aminoácidos no formato de α -hélices.	11
Figura 7. Localização do sítio Sudlow II na proteína HSA, representada pelos aminoácidos no formato de α -hélices.	12
Figura 8. Localização do sítio FA1 na proteína HSA, representada pelos aminoácidos no formato de α -hélices.	13
Figura 9. Representação esquemática genérica para corantes xantênicos. No destaque, estrutura do anel xantênico (Fonte: PEREIRA, 2013 - modificado).	14
Figura 10. Equilíbrio entre as formas quinoide, zwitteriônica e lactônica da estrutura xantêmica (GERASIMOVA <i>et al.</i> , 2020; LAMBERTS <i>et al.</i> , 1984 - modificados).	15
Figura 11. Estrutura molecular do corante Rosa de Bengala em 3D obtido no site Pubchem e visualizado no Discovery Studio Visualizer 2019.	16
Figura 12. Diagrama de Jablonski (Fonte: ABRAHAMSE <i>et al.</i> , 2017 - modificado).	17
Figura 13. Imagens da patologia "olho seco" sob a análise do corante Rosa de Bengala. a) Olho sem patologia. b) Olho com grau moderado da patologia. c) Olho com grau severo da patologia (WANG <i>et al.</i> , 2019).	19
Figura 14. Resultados da regressão volumétrica do tumor no percorrer dos dias ao tratamento com o corante Rosa de Bengala. a) Gráfico da relação do volume do tumor em mm ³ por dia de tratamento. b) Imagem da redução volumétrica do tumor, obtida nas análises experimentais (QIN <i>et al.</i> , 2017).	20

Figura 15. Utilização do corante Rosa de Bengala nas células solares. a) Esquema da composição da célula solar. b) Gráfico das análises dos resultados experimentais (KHADTARE <i>et al.</i> , 2019).	22
Figura 16. Fluxograma com as etapas básicas do desenho racional de fármacos baseado em estrutura. (Fonte: JARDINE <i>et al.</i> , 2014 – modificado).	24
Figura 17. Espectro de Absorção e Emissão no Uv-vis. (Fonte: site mnstate.edu, 2016 – modificado).	26
Figura 18. Estrutura do corante RB. a) PubChem, b) alterações no DS.	42
Figura 19. Interação intermolecular para o sítio Sudlow I obtido dos resultados de <i>docking</i> molecular pelo software Autodock. a) Diagrama de Scatter. b) Escala de cores do valor da função λ_2 (MU <i>et al.</i> , 2019).....	44
Figura 20. Nomenclatura dos sítios de ligação da proteína HSA.	55
Figura 21. Numeração dos átomos na estrutura do corante RB.	56
Figura 22. Resultados das energias dos confôrmeros RB obtidos nos estudos de <i>docking</i> cego realizados no software Autodock.....	57
Figura 23. Resultados percentuais dos confôrmeros RB obtidos nos estudos de <i>docking</i> cego.	57
Figura 24. Confôrmero RB obtido nos estudos de <i>docking</i> molecular no sítio Sudlow I da proteína HSA.	59
Figura 25. Mapa de interação do confôrmero RB ao sítio Sudlow I da proteína HSA com a distância em Å. a) Interação LH, b) Interações vdw e π	60
Figura 26. Resultados do NCIplot da interação entre o RB ao aminoácido lisina 195 do sítio Sudlow I obtidos pelo estudo de <i>docking</i> molecular no software Autodock, com a distancia em Å.....	61
Figura 27. Resultados energéticos (kcal/mol) dos conformeros obtidos nos estudos de <i>docking</i> cego.....	62
Figura 28. Poses dos confôrmeros obtidos no estudo de <i>docking</i> ao sítio de Sudlow II.....	62
Figura 29. Confôrmero RB obtido nos estudos de <i>docking</i> molecular no sítio FA1 da proteína HSA.	63
Figura 30. Mapa de interação do confôrmero RB ao sítio FA1 da proteína HSA, com o distanciamento em Å. a) Interação LH, b) Interações vdw e π	64
Figura 31. Resultados do NCIplot da interação entre o RB aos aminoácidos do sítio FA1 obtidos pelo estudo de <i>docking</i> molecular no software	

Autodock, com distanciamento em Å. a) Arginina 114. b) Arginina 117.	65
Figura 32. Confômero RB obtido nos estudos de <i>docking</i> molecular no sítio FA6 da proteína HSA.	65
Figura 33. Mapa de interação do confômero RB ao sítio FA6 da proteína HSA, com distanciamento em Å. a) Interação LH, b) Interações π	66
Figura 34. Resultados do NCIplot da interação entre o RB ao aminoácido ácido glutâmico 208 do sítio FA6, obtido pelo estudo de <i>docking</i> molecular no software Autodock, com distanciamento em Å.	67
Figura 35. Estruturas cristalográfica da proteína HSA obtidas no PDB. a) PDB 2BX8 e a representação da Azapropazona. b) PDB 2BXE e a representação do Diflunisal.	71
Figura 36. Sobreposição das estruturas PDB 2BX8 e PDB 2BXE realizadas no software Chimera.	72
Figura 37. Confômero RB obtido nos estudos de <i>docking</i> molecular no sítio Sudlow I da proteína HSA.	73
Figura 38. Mapa de interação do confômero RB ao sítio Sudlow I da proteína HSA, com distanciamento em Å. a) Interação LH, b) Interações π	74
Figura 39. Resultados do NCIplot da interação entre o RB aos aminoácidos do sítio Sudlow I obtidos pelo estudo de <i>docking</i> molecular no software GOLD, com distanciamento em Å. a) Ácido glutâmico 292. b) Alanina 291.	75
Figura 40. Confômero RB obtido nos estudos de <i>docking</i> molecular no sítio FA1 da proteína HSA.	76
Figura 41. Mapa de interação do confômero RB ao sítio FA1 da proteína HSA, com distanciamento em Å. a) Interação LH, b) Interações vdw e π	77
Figura 42. Resultados do NCIplot da interação entre o RB aos aminoácidos do sítio FA1 obtidos pelo estudo de <i>docking</i> molecular no software GOLD, com distanciamento em Å. a) Arginina 117. b) Tirosina 138. c) Arginina 145. d) Arginina 186.	78
Figura 43. Resultados de <i>docking</i> do corante RB ao sítio Sudlow II da proteína HSA. a) Confômeros de RB na proteína HSA. b) Poses dos confômeros de RB obtidas nos estudos de <i>docking</i> molecular.	80
Figura 44. Representação da estrutura cristalográfica da proteína HSA obtidas no PDB de código 2BXF, e a representação do ligante Diazepam.	82
Figura 45. Sobreposição das estruturas HSA do PDB 2BXE ao PDB 2BXF.	82
Figura 46. Resultados de <i>docking</i> do corante RB ao sítio Sudlow II da proteína HSA, utilizando o PDB 2BXF. a) Confômeros de RB na proteína HSA.	

b) Poses dos confôrmeros de RB obtidas nos estudos de <i>docking</i> molecular.....	84
Figura 47. Confôrmero RB obtido nos estudos de <i>docking</i> molecular no sítio FA6 da proteína HSA.....	85
Figura 48. Mapa de interação do confôrmero RB ao sítio FA6 da proteína HSA, com distanciamento em Å. a) Interação LH, e interação entre o átomo de hidrogênio ao átomo iodo, b) Interações π	86
Figura 49. Resultados do NCIplot da interação entre o RB aos aminoácidos do sítio FA6 obtidos pelo estudo de <i>docking</i> molecular no software GOLD, com distanciamento em Å. a) Asparagina 324. b) Lisina 351.	87
Figura 50. Estruturas dos confôrmeros obtidos nos estudos de <i>docking</i> molecular ao sítio Sudlow I pelos softwares Autodock (roxo) e GOLD (azul). .	89
Figura 51. Confôrmeros obtidos nos estudos de <i>docking</i> molecular no sítio Sudlow I da proteína HSA, e a localização dos aminoácidos (amarelo): Lys199, Phe211, Trp214, Ala215, Arg218 e Leu238. a) softwares Autodock (roxo). b) software GOLD (azul).	90
Figura 52. Estruturas dos confôrmeros obtidos nos estudos de <i>docking</i> molecular ao sítio FA1 pelos softwares Autodock (roxo) e GOLD (azul).	91
Figura 53. Confôrmeros obtidos nos estudos de <i>docking</i> molecular no sítio FA1 da proteína HSA. a) softwares Autodock (roxo). b) software GOLD (azul).	92
Figura 54. Estruturas dos confôrmeros obtidos nos estudos de <i>docking</i> molecular ao sítio FA6 pelos softwares Autodock (roxo) e GOLD (azul).	93
Figura 55. Confôrmeros obtidos nos estudos de <i>docking</i> molecular no sítio FA6 da proteína HSA. a) softwares Autodock (roxo). b) software GOLD (azul).	94
Figura 56. Espectros de absorvância no visível. (a) linhas contínuas - corante RB (2,5 a 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). (b) linhas tracejadas – RB com HSA ([RB] = 2,5 a 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).	94
Figura 57. Espectro de UV-vis do RB com a adição da proteína HSA (0 a 6 μL).	95
Figura 58. Gráfico para determinar o valor da constante de associação entre o corante RB à proteína HSA.	95
Figura 59. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Varfarina.	97

- Figura 60. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Varfarina (azul) e sem fármaco (vermelho). 98
- Figura 61. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ibuprofeno. 100
- Figura 62. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Ibuprofeno (verde) e sem fármaco (vermelho). 101
- Figura 63. Sítios preferenciais de ligação de alguns fármacos (Fonte: GHUMAN *et al.*, 2005 -modificado). 102
- Figura 64. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ibuprofeno. c) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diflunisal. 103
- Figura 65. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Diflunisal (roxo), Ibuprofeno (verde) e sem fármaco (vermelho).... 104
- Figura 66. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ibuprofeno. c) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diflunisal. d) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diazepam. 106
- Figura 67. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Diazepam (dourado), Diflunisal (roxo), Ibuprofeno (verde) e sem fármaco (vermelho). 107
- Figura 68. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Digitoxina. 108
- Figura 69. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Digitoxina (azul claro) e sem fármaco (vermelho). 109
- Figura 70. Geometria espacial da conformação estrutural. a) Rosa de Bengala. b) Digitoxina. 110
- Figura 71. Estrutura Molecular do fármaco Biliverdina. 111

- Figura 72. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Biliverdina. 112
- Figura 73. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[\text{HSA}]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Biliverdina (verde claro), Digitoxina (azul claro) e sem fármaco (vermelho). 113
- Figura 74. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ácido Linoleico. 114
- Figura 75. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[\text{HSA}]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Ácido Linoleico (preto) e sem fármaco (vermelho). 114
- Figura 76. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Biliverdina. c) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência de todos os fármacos. 116
- Figura 77. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[\text{HSA}]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Todos os Fármacos (verde esmeralda) e sem fármaco (vermelho). 117
- Figura 78. Resultado do Teste de Job`s Plot do corante RB na proteína HSA. a) Espectros de absorvância obtidos no UV-vis. b) Valores referentes da absorvância em 563nm referente aos valores das frações molares do corante RB. 120
- Figura 79. Espectros de absorvância no visível dos resultados dos estudos em diferentes polaridades do meio reacional. a) Resultados experimentais. b) Normalização dos resultados experimentais..... 122
- Figura 80. Espectros de absorvância no visível das análises do RB sob a influência da variância do valor de pH (3,7; 5,7; 6,2; 7,4 e 8,0) do meio reacional..... 125
- Figura 81. Espectros de absorvância no visível obtidos das análises dos estudos de interação do corante RB à proteína HSA em diferentes valores de acidez do meio reacional. a) pH 3,7. b) pH 5,7. c) pH 7,4. d) pH 8,0. 126

- Figura 82. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ sob a influência de diferentes valores de acidez do meio reacional: pH 3,7 (azul), pH 5,7 (verde), pH 7,4 (vermelho) e pH 8,0 (roxo)..... 127
- Figura 83. Espectros de absorvância no visível dos resultados da análise da interação do corante RB à proteína HSA sob a influência dos metais. a) Cu^{+2} . b) Ni^{+2} . c) Pb^{+2} . d) Zn^{+2} . e) sem influência de metais 129
- Figura 84. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ sob a influência de diferentes metais: Níquel (preto), Cobre (azul), Chumbo (verde), Zinco (roxo) e HSA_{nativa} (vermelho)..... 130
- Figura 85. Espectros de absorvância no visível dos resultados da análise da interação do corante RB à proteína HSA sob a influência da temperatura. a) 20,1 °C. b) 40,3 °C. c) Temperatura ambiente. 132
- Figura 86. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ sob a influência de diferentes valores de temperatura: 20,1 °C (roxo), 40,3 °C (verde) e Temperatura ambiente (vermelho)..... 133
- Figura 87. Estágios da glicação não enzimática das proteínas (Fonte: BEM *et al.*, 2006). 136
- Figura 88. Resultados de fluorescência das $HSA_{controle}$ (preto) e $HSA_{glicada}$ (vermelho) com concentrações de 40 $\mu mol.L^{-1}$. a) excitação em 295 nm, e sensibilidade 50. b) excitação em 350 nm, e sensibilidade 100. 137
- Figura 89. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu mol.L^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA_{nativa} . b) Interação do corante RB à proteína $HSA_{glicada}$ 138
- Figura 90. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência da $HSA_{glicada}$ (roxo) e HSA_{nativa} (vermelho). 139
- Figura 91. Resultados de interação do corante RB em diferentes estruturas da proteína HSA. a) HSA oxidada por HOCl. b) HSA oxidada por HOBr. c) HSA_{nativa} 141
- Figura 92. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência da $HSA_{oxiHOCl}$ (preto), $HSA_{oxiHOBr}$ (azul) e HSA_{nativa} (vermelho)..... 142
- Figura 93. Espectro de fluorescência na identificação de proteína desnaturada sob a análise de Tioflavina T, tendo como resultados de $HSA_{controle}$ em azul e $HSA_{desnaturada}$ em verde. 144
- Figura 94. Resultados dos espectros no visível do corante RB na presença da proteína HSA (0 a 6 $\mu mol.L^{-1}$). a) $HSA_{desnaturada}$. b) HSA_{nativa} 145

- Figura 95. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência da $HSA_{desnaturada}$ (verde) e $HSA_{controle}$ (vermelho)..... 146
- Figura 96. Filbras amiloidais e suas representações (FALCÃO, 2015)..... 146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coordenadas da Caixa utilizadas no estudo de <i>docking</i> cego	36
Tabela 2. Coordenadas da caixa no <i>docking</i> molecular ao sítio Sudlow I.....	37
Tabela 3. Coordenadas da caixa no <i>docking</i> molecular ao sítio Sudlow II.....	38
Tabela 4. Coordenadas da caixa no <i>docking</i> molecular ao sítio FA1	39
Tabela 5. Coordenadas da caixa no <i>docking</i> molecular ao sítio FA6.....	40
Tabela 6. Valores da concentração do corante RB com seu respectivo volume e volume adicionado de tampão fosfato.	45
Tabela 7. Diferentes concentrações das soluções HSA e RB e valores da fração molar de RB.	49
Tabela 8. Códigos de PDBs com a localização dos ligantes e valor de resolução.	69
Tabela 9. Valores energéticos das dez estruturas melhores estruturas obtidas nos estudos de <i>docking</i> molecular.	79
Tabela 10. Valores de RMSD e Diedro dos resultados obtidos nos estudos de <i>docking</i> molecular das estruturas de RB.	81
Tabela 11. Valores energéticos das dez estruturas melhores estruturas obtidas nos estudos de <i>docking</i> molecular para a estrutura PDB 2BXF.	83
Tabela 12. Resultados obtidos nos estudos de <i>docking</i> molecular utilizando o software Autodock e NCIplot.	88
Tabela 13. Resultados obtidos nos estudos de <i>docking</i> molecular utilizando o software GOLD e NCIplot.	88
Tabela 14. Valores dos desvios padrões, constantes de ligação e a média da interação da RB com HSA.....	96
Tabela 15. Ligantes específicos de cada sítio de ligação na proteína HSA.	97
Tabela 16. Valores das constantes de associação entre o corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Varfarina, com seus respectivos valores de coeficiente de correlação e a média dos valores de Ka com o desvio padrão.	99
Tabela 17. Valores da constante de associação (Ka) do corante RB.	118
Tabela 18. Propriedades características dos solventes: índice de refração (n), momento dipolo (μ), constante dielétrica (ϵ) e energia de transição normalizada (<i>ETN</i>). (FILHO, 2010; REICHARDT <i>et al.</i> , 2011).....	122
Tabela 19. Resultados das análises do gráfico ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ para determinar os valores das constantes de associação das amostras em diferentes meios reacionais de acidez.	128

Tabela 20. Resultados das análises do gráfico ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ para determinar os valores das constantes de associação das amostras nos diferentes metais.....	131
Tabela 21. Resultados das análises do gráfico ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ na determinação dos valores das constantes de associação das amostras sob a influência da temperatura.	134
Tabela 22. Resultados termodinâmicos (Entalpia, Gibbs e Entropia) do processo de interação entre o corante RB à proteína HSA nas temperaturas de 20,1 °C e 40,3°C.	135
Tabela 23. Valores dos resultados dos coeficientes (lineares e angulares), coeficiente de correlação linear (R^2) e constantes de associação (K_a) para HSA_{nativa} , $HSA_{oxiHOCl}$ e $HSA_{oxiHOBr}$	142

1. INTRODUÇÃO

A interação entre macromoléculas biológicas como, as proteínas e o DNA com fármacos, são uma das áreas de pesquisa de grande importância no campo das ciências da vida. (GUIDO *et al.*, 2010). Antes de planejar novos fármacos, deve ser ampliado o conhecimento sobre a biomolécula alvo. (MOREIRA *et al.*, 2015).

Para entender a formação de complexos proteína-ligante, iniciamos o estudo da proteína albumina sérica humana (HSA), responsável por diversas funções biológicas, como a manutenção do volume plasmático circulante, o controle da pressão osmótica, a solubilidade de diversos íons metálicos, o efeito de tamponamento em situações de acidose e a formação alcalose metabólica. A HSA é uma proteína de transporte de vários ligantes exógenos e endógenos. (GUIZADO, 2008; GUNDRY *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2015).

O ligante escolhido para esse estudo foi o corante Rosa de Bengala (RB). A escolha dessa sonda se deve às suas propriedades, como a de gerar oxigênio molecular singlete (1O_2) (ZHENG *et al.*, 2019), permitindo aplicações muito interessantes na área da fotoquímica e fotobiologia e em diversas áreas (PRIETO-MONTERO *et al.*, 2020; TURBAY *et al.*, 2014).

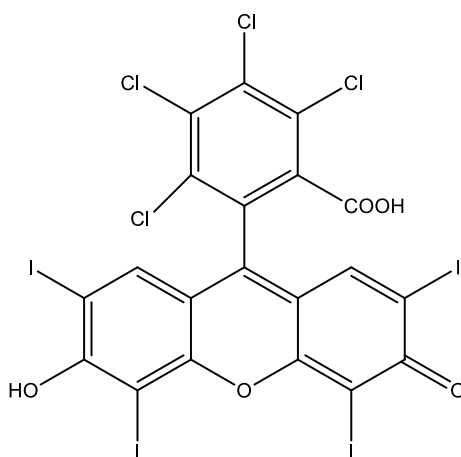


Figura 1. Estrutura molecular do corante Rosa de Bengala no formato em 2D realizado no software Chemdraw.

Rosa de bengala tem sido usada na medicina, em diagnósticos oftalmológicos como, por exemplo, na identificação da enfermidade conhecida como “olho seco” (HOLLAND *et al.*, 2019). Esse corante está sendo utilizado

também nos estudos de tratamentos e diagnósticos de células cancerígenas (QIN *et al.*, 2017).

Nas forças armadas americanas há estudos utilizando o RB para identificação de contaminantes como: agentes de guerra química, pesticidas e produtos químicos industriais, pois, estes possuem uma característica ácida, e o corante nesse meio reacional perde a sua coloração avermelhada, identificando a presença desses compostos (OWENS, 2020). Outras pesquisas utilizam o RB em células solares para aumentar a eficiência e diminuir custos de produção de placas solares (KHADTARE *et al.*, 2019).

Estudos dos complexos entre estruturas moleculares do ligante (sonda) à proteína *Albumina do Soro Humano* (HSA) foram realizados por meio de estudos experimentais e simulações computacionais. Os estudos espectroscópicos, UV-visível, foram realizados com RB e HSA, da interação com uma ampla variedade de ligantes (HU *et al.*, 2010). Os estudos de determinação de característica da HSA de acomodar sondas em locais específicos são cruciais para a elucidação dos mecanismos moleculares entre a sonda e a proteína. (BALAEI *et al.*, 2019; CARUSO *et al.*, 2014).

Para realizar estudos dos complexos proteína-ligante, a principal técnica utilizada foi a de *Docking* Molecular (MORGON *et al.*, 2019).

O *docking* molecular portanto é um arcabouço atraente para entender as interações biomoleculares de fármacos, bem como no estudo mecanístico, colocando uma molécula (ligante) no local de ligação preferido da região específica do DNA/proteína (receptor), formando desse modo, um complexo estável não covalente (DAR *et al.*, 2017). Porém esse processo de ligação envolve duas etapas básicas: *a previsão da conformação do ligante*, bem como sua posição e orientação dentro desses locais (geralmente referido como pose) e *avaliação da afinidade de ligação* (MENG *et al.*, 2011).

Os softwares empregados nos estudos de *docking* utilizam normalmente a mecânica molecular nos seus estudos, portanto, a descrição de um sistema poliatômico é baseada na física clássica, que fornecem os parâmetros como cargas, ângulos de torção, geometrias, energia de ligação, energia livre e estabilidade dos complexos (DAR *et al.*, 2017; LOPES, *et al.*, 2014).

2. PROTEÍNA ALBUMINA DO SORO HUMANO

2.1 Propriedades estruturais

O nome albumina deriva da palavra alemã *albumen*, e este é derivado do latim (*albus*) que significa branco. Essa proteína faz parte de um grupo heterogêneo de proteínas como, por exemplo, a albumina sérica (AS) albumina do leite, proteínas presentes na urina e entre outras. Porém a AS é um membro de uma família de proteínas homólogas por possuir características estruturais distintas e propriedades peculiares de ligação ao ligante (FANALI *et al.*, 2012).

Nos seres humanos podemos encontrar diversas proteínas na corrente sanguínea, porém o foco do estudo será na albumina do soro, devido a suas propriedades e por representar cerca de 60% das proteínas totais séricas (da SILVA, 2017; RABBI *et al.*, 2015). Contudo o seu alto valor de representatividade no sangue faz com que a sua concentração seja em torno de 34 a 54 g.L⁻¹, e possui também um tempo de vida circulatório de dezenove dias (LI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2019).

A proteína Albumina Sérica Humana (HSA) é originada no fígado e sofre modificações pós-translacionais no complexo de Golgi. Algumas de suas características são: peso molecular em torno de 66,5 kDa; pH em torno de 7,35 a 7,45; ponto isoelétrico (P.I) igual a 4,7 e altamente solúvel em água (AL-HARTHI *et al.*, 2019; SRIVASTAVA *et al.*, 2020).

A estrutura da HSA é constituída por uma sequência primária de uma única cadeia de aminoácidos com 585 resíduos, 17 pontes dissulfetos, um grupo tiol livre (Cys34), um único triptofano localizado na posição 214, 18 resíduos de tirosina, 06 resíduos de metionina e 59 resíduos de lisina (BERTOZO *et al.*, 2018). É composta ainda por três domínios estruturalmente semelhantes, porém assimétricos, denominados como: I (resíduos 1-195), II (resíduos 196-383) e III (resíduos 384-585), sendo que cada domínio ainda é dividido em dois subdomínios: A e B (RABBANI *et al.*, 2019). Com o auxílio da Figura 2 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** podemos verificar que os 06 subdomínios são compostos aproximadamente por 67% de α -hélices, 23% de loops (rotações) e 10% turns (voltas) (ASCENZI *et al.*, 2015; BOS *et al.*, 1990; CHOI *et al.*, 2002; COLMENAREJO, 2003; PETERS, 1996).

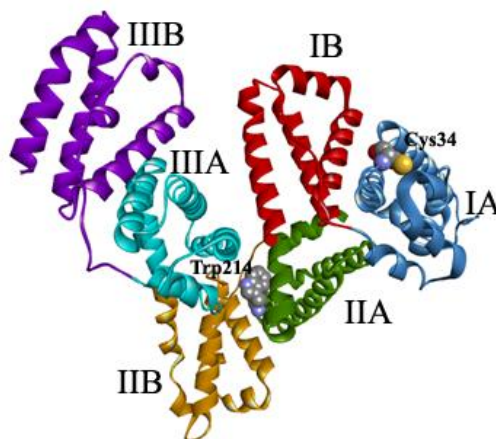


Figura 2. Estrutura da proteína HSA com seus respectivos domínios e subdomínios.

Entre algumas das funções da HSA estão regular a pressão osmótica, e principalmente realizar transportes de substâncias no organismo humano. Essa proteína pode carrear diversas substâncias (ligantes) endógenos e exógenos, tais como drogas, ácidos graxos, hormônios, aminoácidos, fármacos entre outros. Devido a essa característica ela é empregada como modelo de proteínas em estudos de biofísica e bioquímica, explorando desse modo, a sua capacidade de interagir com diversos ligantes (AL-HARTHI *et al.*, 2019; da SILVA, 2017).

2.1.1 Propriedades dos complexos da Proteína Albumina do Soro Humano com ligantes.

Devido a proteína possuir a função transportadora, os estudos envolvendo essa habilidade tem sido enorme no campo de pesquisas a décadas, sendo relacionada principalmente ao fator da eficiência na afinidade de ligações (NARWAL *et al.*, 2018).

Relembrando que as albuminas são consideradas como modelos de proteínas na área de bioquímica e biofísica, há uma grande diversidade de estudos envolvendo a capacidade desta de interagir com diversos ligantes devido aos fatores como adsorção, distribuição, metabolismo e excreção dependerem do grau de interações (da SILVA, 2017; RABBI *et al.*, 2015).

O complexo fármaco-proteína pode atuar como um sistema de reservatório, ou seja, quando os fármacos estão na sua forma livre, começam a ser metabolizados ou excretados, ocasionando a liberação das sondas das

proteínas plasmáticas. Portanto isso ocasiona a redução da intensidade do efeito farmacológico, mas há o prolongamento da ação desse fármaco (ASCENZI *et al.*, 2015; RIBEIRO, 2015).

Relatando de uma forma mais simples, quando uma molécula de proteína (P) e uma molécula de ligante (L) com afinidade mútua interagem no mesmo sistema, forma desse modo, um complexo proteína-ligante (PL), na qual este é dependente do tempo. E como esse processo é reversível, logo o equilíbrio reacional se dá pela Equação 1 (da SILVA, 2017):



A interação do complexo proteína-ligante envolvendo duas ou mais moléculas ou então íons, está relacionada com as forças intermoleculares. Sendo que essas forças podem ser por pareamento iônico (interações eletrostáticas), ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações π -ácido para π -base, ligações metal-ligante, forças de atração de van der Waals e estrutura do solvente (HAJ-ZAROUBI, 2002; da SILVA, 2017).

As interações da HSA são reversíveis, assim de acordo com o trabalho de Sudlow e seus colaboradores (1975), determinou que os fármacos ligam-se ao local (sítio de ligação) para o qual têm maior afinidade, e ainda ressaltou que a maioria dos fármacos pode-se interagir com elevada afinidade não apenas em uma região, mas também pode ocorrer em duas ou mais (RIBEIRO, 2015).

2.1.2 Mapeamento dos Sítios de interação na Proteína Albumina do Soro Humano

A organização de múltiplos domínios da HSA está na raiz de sua extraordinária habilidade e capacidade de se ligar a sonda (ASCENZI *et al.*, 2015). As regiões que hospedam os ligantes como por exemplo o grupo heme, ácidos graxos, bilirrubina e drogas são conhecidos como sítios de ligação (AL-HARTHI *et al.*, 2019). Na qual essas regiões de interações são classificadas principalmente de duas formas, a primeira envolvendo os estudos com os ácidos graxos (FA), e a segunda com fármacos.

2.1.2.1 Classificação dos Sítios de Interações por Ácido Graxos.

Os ácidos graxos (FA) desempenham funções em todo o corpo humano e possuem baixa solubilidade em água, logo são considerados como os principais ligantes fisiológicos da HSA (AL-HARTHI *et al.*, 2019).

Os estudos com os FAs verificou que nove estruturas equivalentes de cadeia longa, podem interagir em diferentes regiões, resultando desse modo em valores variáveis de afinidades, e também arranjos assimétricos dispersos na HSA (AL-HARTHI *et al.*, 2019; ASCENZI *et al.*, 2015; BHATTACHARYA *et al.*, 2000; SIMARD *et al.*, 2006). Essas regiões são representadas pela grafia FA e acompanhado da numeração em algarismos indo-arábicos, como apresentados na Figura 3.

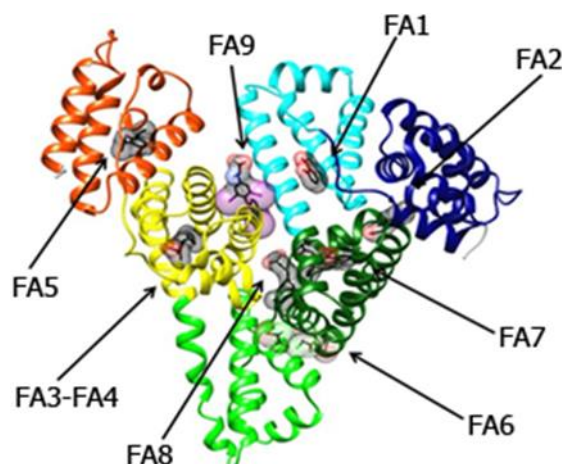


Figura 3. Classificação dos sítios de interações em base aos ácidos graxos (Fonte: ASCENZI *et al.*, 2015).

O primeiro sítio de ligação conhecido como FA1, está localizado na região do subdomínio IB, e é considerado como a terceira maior região de interações, desse modo possui grandes afinidades a diferentes estruturas de ligantes (ASCENZI *et al.*, 2017; ZSILA, 2013). O grupo carboxilato da FA interage realizando ligação de hidrogênio (LH) com o aminoácido Arg117 e também a uma molécula de água e LH com os átomos de oxigênio da estrutura fenoxila e carbonila dos aminoácidos Tyr161 e Leu182 (ASCENZI *et al.*, 2017; BHATTACHARYA *et al.*, 2000). Desse modo, podendo ocasionar uma alteração na estrutura conformacional da proteína HSA, resultando assim em uma deformação nos subdomínios IA, IIA e IIB (ASCENZI *et al.*, 2017; BHATTACHARYA *et al.*, 2000; CURRY *et al.*, 1999; GHUMAN *et al.*, 2005;

ZSILA, 2013). E uma característica importante dessa região é que devido a presença do aminoácido Tyr411, pode modificar pseudo-enzimaticamente os ligantes, porque esta tirosina atua como um nucleófilo (ASCENZI *et al.*, 2015, ASCENZI *et al.*, 2017).

A segunda região de interação é conhecida como FA2, e este está localizado entre os subdomínios IA, IB e IIA. Nesse caso o grupo carboxilato da FA interage com os aminoácidos Tyr150, Arg257 e Ser287, enquanto a sua cauda metileno fica localizada numa região hidrofóbica entre os subdomínios IA e IIA, ocasionando uma estabilização na proteína HSA a conformação β e agindo desse modo como modulares alostéricos (ASCENZI *et al.*, 2017; BHATTACHARYA *et al.*, 2000; FANALI *et al.*, 2012).

A próxima região de interação é um acoplamento de duas localizações, FA3-FA4. A fenda desse sítio está localizada no subdomínio IIIA, e apresenta uma importante propriedade de atrair carboxilatos, principalmente aromáticos com uma conformação estrutural estendida (Ibuprofeno) (ASCENZI *et al.*, 2017; CURRY *et al.*, 1999; FANALI *et al.*, 2012; GHUMAN *et al.*, 2005; SUDLOW *et al.*, 1975).

Já em relação aos ácidos graxos, quando estes estão interagindo na região do FA3, o grupo carboxilato se liga aos aminoácidos Ser342 e Arg348 (IIB) e Arg485 (IIIA). E quando estão localizados no FA4, o grupo carboxilato possui afinidades aos aminoácidos Arg410, Tyr411 e Ser489 (IIIA), e a sua cauda hidrofóbica fica disposta no subdomínio IIIA (ASCENZI *et al.*, 2017; BHATTACHARYA *et al.*, 2000).

O FA5 está localizado no subdomínio IIIB, e quando a estrutura do ácido graxo está interagindo a essa região, o seu grupo carboxilato possui afinidades aos aminoácidos Tyr 401 e Lys525 (ASCENZI *et al.*, 2017; BHATTACHARYA *et al.*, 2000; FANALI *et al.*, 2012).

A sexta região de interação é denominada como FA6, e este está localizada entre os subdomínios IIA e IIB. O grupo carboxilato FA quando está interagindo a essa região, possui afinidades aos aminoácidos Arg209, Lys351 e Ser480. Enquanto a sua cauda de metileno se aproxima aos aminoácidos Arg209, As324 e Glu354 (ASCENZI *et al.*, 2017; BHATTACHARYA *et al.*, 2000; FANALI *et al.*, 2012).

A FA7 é a sétima região de interação e está localizada no subdomínio IIA, representa uma importante localização de interação à fármacos, principalmente aos compostos heterocíclicos (FANALI *et al.*, 2012; GHUMAN *et al.*, 2005; ZUNSZAIN *et al.*, 2008). E quando o ácido graxo está interagindo a essa região, o grupo carboxilato é ligado ao aminoácido Arg257 por ponte salina. Por fim, a proteína HSA pode alterar os ligantes dessa região, devido à presença do aminoácido Lys199, que atua como um nucleófilo (ASCENZI *et al.*, 2017; LIM *et al.*, 2007).

Os últimos locais de interações FA8 e FA9 estão localizados na base e na região superior da lacuna, desse modo, estão delimitadas pelos subdomínios IA, IB e IIA por um lado, e os subdomínios IIB, IIIA e IIIB do outro lado. Essa região possui uma afinidade maior aos FAs que possuem cadeias curtas, devido à sua restrição de volume, portanto, os aminoácidos Lys195, Lys199, Arg218, Asp451 e Ser454 estão envolvidos na interação do grupo carboxilado (pertencente a estrutura do ácido graxo) na região do FA8. Enquanto na região do FA9, estão envolvidos os aminoácidos Glu187 e Lys432 (ASCENZI *et al.*, 2017; BHATTACHARYA *et al.*, 2000).

2.1.2.2 Classificação dos Sítios de Interações por Fármacos

A segunda classificação dos sítios de interações da HSA é realizada a partir de estudos utilizando o fármaco, porém em concentrações terapêuticas pois apenas poucas regiões são ocupadas pelos fármacos (YASSEEN *et al.*, 2016). As regiões ocupadas, nesse caso, são denominadas com numeração em algarismos romanos.

No trabalho de Sudlow e seus colaboradores (1975) utilizou dois compostos para determinar o sítio de ligação na proteína HSA: Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNSA) e Dansil-Sarcosina (DS). A DNSA possui uma semelhança com os compostos varfarina, ácido dansilcisteína, dansil-L-arginina dansil-L-glutamina, enquanto a DS há uma semelhança com os compostos ácido dansil- α -amino-n-butírico, dansilhidroxi-L-prolina, ANS e dansil-L-prolina.

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que o composto DNSA interage melhor na região FA7, entretanto, Sudlow reclassificou essa região como Sítio I ou sítio da Varfarina. Já para o composto DS obteve uma alta afinidade nas regiões FA3 e FA4, e então determinou que essa região seria o

Sítio II ou sítio da Benzodiazepina (ASCENZI *et al.*, 2015; BHATTACHARYA *et al.*, 2000; KHAIBRAKHMANOVA *et al.*, 2020; YAMASAKI *et al.*, 2017).

E nos trabalhos de Carter e seus colaboradores (1839) e Peters (1996) sugeriram a existência de mais uma região de interação, denominado como sítio III (sítio da Digitoxina). Sendo que essa região só foi confirmada como um novo local de interação dos fármacos depois de vinte anos dos estudos de Sudlow, denominando então assim, como a terceira região mais importante para os estudos de interações com os fármacos (ASCENZI *et al.*, 2015; BHATTACHARYA *et al.*, 2000; YAMASAKI *et al.*, 2017).

Na Figura 4 podemos observar que o sítio I é uma região bem volumosa, e está localizada no subdomínio IIA, mais precisamente entre os aminoácidos Ser192 – Glu292. O sítio II já uma região considerada bem menor que o sítio I, e os aminoácidos envolvidos a essa região são Pro384 – Leu491, na qual estão situados no subdomínio IIIA. Por fim o sítio III tem um formato da letra “D”, possuindo desse modo, uma grande abertura na sua entrada, e esta região está localizada no subdomínio IB, entre os aminoácidos Asp107 – Lys195 (AL-HARTHI *et al.*, 2019; GHUMAN *et al.*, 2005).

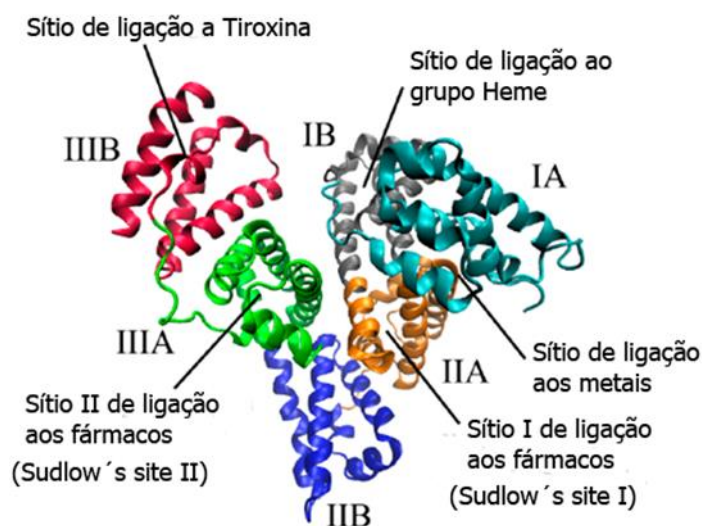


Figura 4. Classificação dos sítios de interação (Fonte: KHAIBRAKHMANOVA *et al.*, 2020 - modificado).

2.1.2.2.1 Sítio de ligação Sudlow I

Sudlow e seus colaboradores determinaram nos seus estudos que o Sítio Sudlow I possui a mesma localização das regiões 7 e 8 com os ácidos graxos

(FA7 e FA8), situada no subdomínio IIA. Este representa uma importante região de interação as drogas, devido que há afinidades preferencialmente a compostos heterocíclicos, como por exemplo a Varfarina (ASCENZI *et al.*, 2015).

A região do sítio Sudlow I compreende seis hélices do subdomínio e um recurso de loop-hélice (resíduos de Tyr148 a Leu154) contribuídos pelo subdomínio IB. O seu interior é hidrofóbico, delimitado pelos resíduos Trp214, Leu219, Phe223, Leu238, His242, Leu260, Ile264, Ser287, Ile290 e Ala291 (ABBOUD *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2014). Porém com os estudos mais detalhados, revelam que os locais de interações podem não ser simplesmente determinadas, mas podem consistir em regiões sobrepostas, ou então colocadas próximas umas das outras (MATSUDA, 2015; SUN *et al.*, 2019; YAMASAKI *et al.*, 2004).

Recorrendo ao trabalho de Krag-Hansen (1988) o sítio I é considerado como “uma região grande e flexível” devido a sua diversidade de ligantes aceitáveis, e também pela aparente capacidade de acomodar mais de um ligante por vez com interferência significativa (PETERS, 1996; YAMASAKI *et al.*, 2017). E nos estudos de Fehske e seus colaboradores (1979) propuseram que esse sítio é composto por duas regiões de interações diferentes, porém sobrepostas, resultando desse modo em dois aglomerados de resíduos polares, um em direção ao fundo do sítio (Tyr150, His242, Arg257) e o outro em direção a entrada do sítio (Lys195, Lys199, Arg218 e Arg222) (AL-HARTHI *et al.*, 2019; PETERS, 1996; YAMASAKI *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2014).

Nos dias atuais há uma remodelação do sítio Sudlow I, porém suportam fortemente os modelos demonstrados anteriormente (grande, flexível e possuir regiões sobrepostas). Portanto, o sítio foi dividido em três subcâmeras hidrofóbicas denominadas como Ia, Ib e Ic (Figura 5), resultando assim numa sobreposição entre os locais Ia e Ib, e também entre Ia e Ic. Sendo assim, a região Ia está localizada adjacente às outras subcâmeras, fazendo com que as subcâmeras Ib e Ic estejam bem separadas, ocasionando assim as interações simultaneamente do ligante a essas regiões de uma maneira independente (YAMASAKI *et al.*, 1996; YAMASAKI *et al.*, 2017).

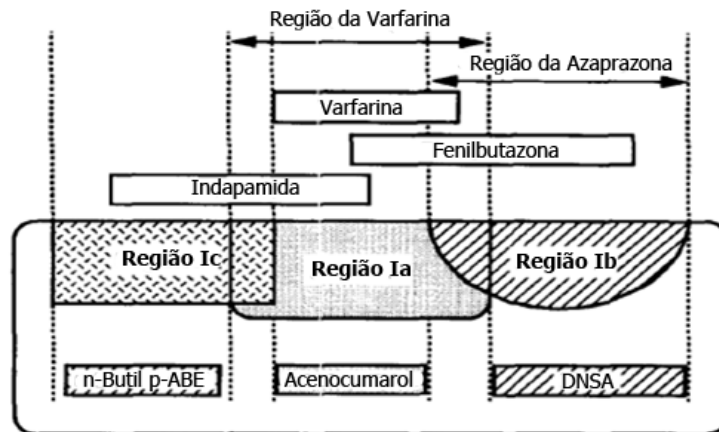


Figura 5. Região do sítio Sudlow I da proteína HSA. (Fonte: YAMASAKI *et al.*, 1996 - modificada).

As três subcâmaras hidrofóbicas no sítio Sudlow I estão dispostas na proteína HSA conforme demonstrada na Figura 6. Duas subcâmaras hidrofóbicas Ia e Ib são divididas pelo aminoácido Ile264, assim uma região fica a esquerda e a outra a direita da isoleucina. Enquanto a terceira subcâmara (Ic) se projeta a frente do sítio, delineada pelos aminoácidos Phe211, Trp214, Ala215, Leu238, e também por uma porção alifática de Lys199 e Arg218 (ABBOUD *et al.*, 2017; GHUMAN *et al.*, 2005).

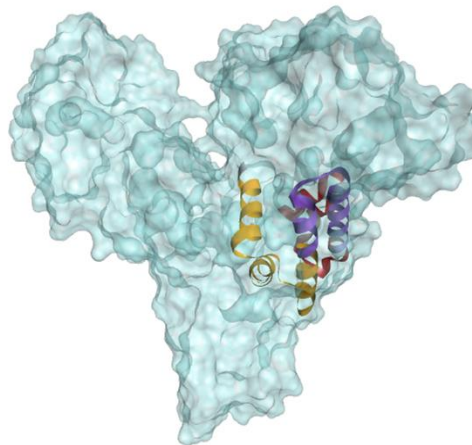


Figura 6. Localização do sítio Sudlow I na proteína HSA, representada pelos aminoácidos no formato de α -hélices.

2.1.2.2.2 Sítio de ligação Sudlow II

O sítio Sudlow II é composto por todas as seis hélices pertencentes ao subdomínio III A, e apresenta em seu interior cadeias laterais hidrofóbicas. Essa região possui uma semelhança topológica em relação ao sítio Sudlow I, porém

há dois principais diferenças entre elas (ABBOUD *et al.*, 2017; AL-HARTHI *et al.*, 2019; GHUMAN *et al.*, 2005):

- A região de interações do sítio Sudlow II é menor que o sítio Sudlow I.
- O sítio Sudlow II possui apenas um sub-compartimento de resíduo polar, localizado próximo a entrada (Arg410, lys414 e Ser489) e centrado no aminoácido Tyr411, na qual a sua hidroxila está voltado para o interior do sítio.

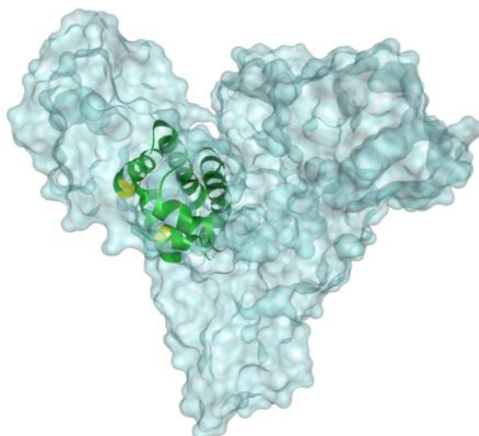


Figura 7. Localização do sítio Sudlow II na proteína HSA, representada pelos aminoácidos no formato de α -hélices.

Os ligantes que possuem afinidade a essa região são os ácidos carboxílicos aromáticos, na qual possuem um grupo ácido carregado negativamente no final da molécula, como por exemplo: ibuprofeno, ácido flufenâmico, diflunisal e diazepam (ABBOUD *et al.*, 2017; PENG *et al.*, 2012).

2.1.2.2.3 Sítio de ligação III para fármacos ou Sítio 1 para ácidos graxos

O sítio III é a mesma região da FA1, assim, fica localizada no subdomínio IB, possui um formato estrutural parecido com a letra “D”, e o seu sítio de ligação é considerado relativamente aberto, ocasionando desse modo uma acessibilidade do solvente à região (AL-HARTHI *et al.*, 2019; ASCENZI *et al.*, 2017).

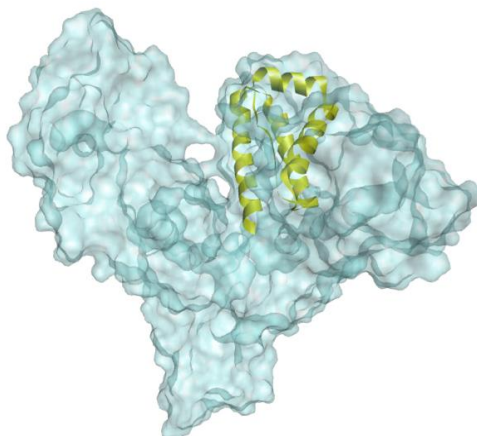


Figura 8. Localização do sítio FA1 na proteína HSA, representada pelos aminoácidos no formato de α -hélices.

Como já mencionado essa é uma região onde diferentes ligantes possuem afinidades, como por exemplo: heme, bilirrubinas, FAs e compostos exógenos (AL-HARTHI *et al.*, 2019; ASCENZI *et al.*, 2017). Alguns estudos cristalográficos mostram ainda que essa região de interações possa abrigar ligações secundárias para alguns compostos (ZSILA, 2013).

Devido a facilidade ao acesso a essa região, Carter e seus colaboradores (1839) realizaram avaliações cristalográficas de raios-X de 142 complexos ligante-HSA. Foi revelado que 49% de todos os compostos estudados possuem pelo menos um local de ligação dentro do subdomínio IB. E entre os 105 compostos que exibiram um único local de ligação na HSA, 39% representam o subdomínio IB, 19% representam o subdomínio IIA e 27% representam o subdomínio IIB (ZSILA, 2013).

Em alguns casos pode ocorrer o efeito alostérico quando esse sítio for preenchido por algum ligante, entretanto, esse efeito é a mudança(s) conformacional(is) de outras regiões. Sendo assim, quando o sítio FA1 for preenchido, poderá afetar as estruturas dos subdomínios IA, IIA e IIB (ASCENZI *et al.*, 2017).

2.2 Corante Xantênico

A estrutura dos compostos xantenos são cíclicos que apresentam três anéis aromáticos num arranjo linear, e no seu anel central há um átomo de oxigênio

(Figura 9) como por exemplo as estruturas de Fluoresceína, Eosina Y, Eritrosina B e a Rosa de Bengala (BUCK *et al.*, 2017; SILVA, 2018).

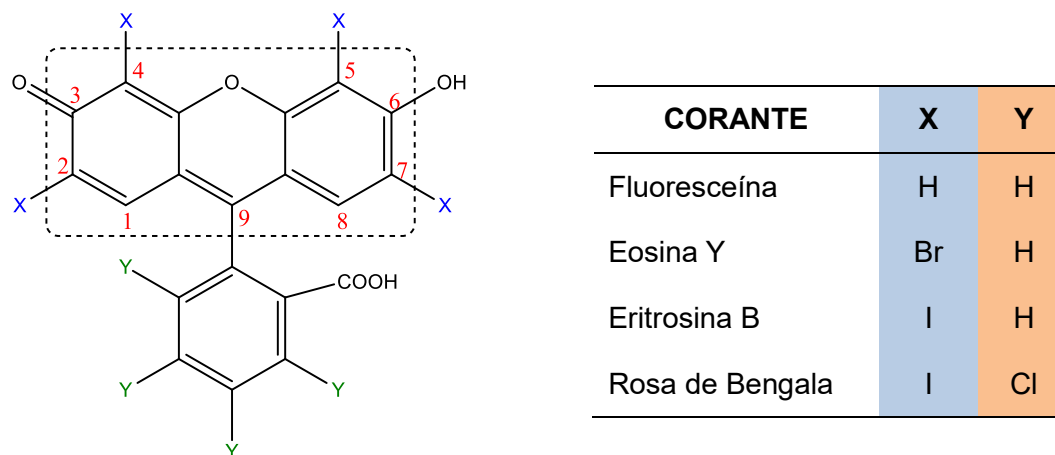


Figura 9. Representação esquemática genérica para corantes xantênicos. No destaque, estrutura do anel xantênico (Fonte: PEREIRA, 2013 - modificado).

A disposição espacial do anel xanteno e benzeno possuem um ângulo diedro aproximadamente de 90° , indicando desse modo, que os anéis são ortogonais. Sendo assim haverá a inexistência do efeito de conjugação entre as duas partes, devido a dificuldade da combinação dos orbitais moleculares. O fato do ângulo do diedro ser próximo de 90° , restringe também a conjugação no xanteno, de forma que o elétron excitado fica confinado nessa estrutura com baixa dissipação energética, porém resulta num alto rendimento de fluorescência. Portanto, quando houver alterações na região do anel benzóico, isso não afetará no rendimento quântico (1O_2) (BATISTELA *et al.*, 2010; SILVA, 2018; ZHANG *et al.*, 2010).

A estrutura do corante de fluoresceína consiste em uma estrutura conjugada com 6-hidroxixanten-3-ona (6-hidroxifluorona), na qual é responsável pelas propriedades da coloração e também da fluorescência do corante (CHRISTIANSON, 2017). Desse modo, o composto xantenico pode ser encontrado em algumas colorações correspondendo ao tipo de estrutura que o composto apresenta: **Quinóide**, **Zwitteriônica** e **Lactônica** (Figura 10) (GERASIMOVA *et al.*, 2020).

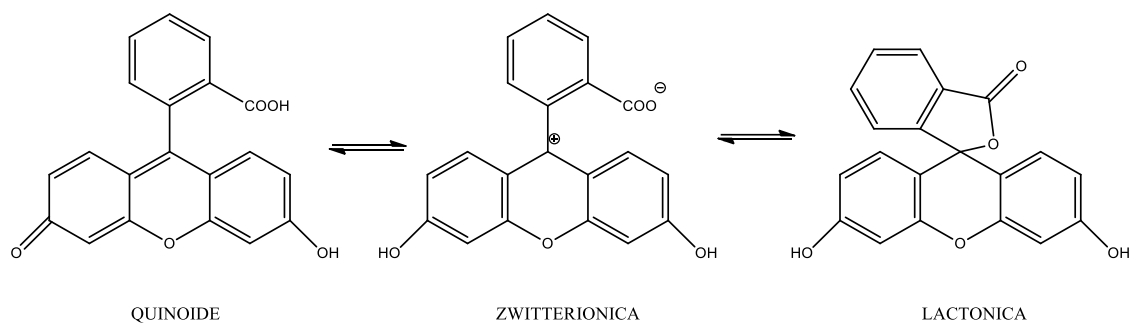


Figura 10. Equilíbrio entre as formas quinoide, zwitteriônica e lactônica da estrutura xantêmica (GERASIMOVA *et al.*, 2020; LAMBERTS *et al.*, 1984 - modificados).

A conformação Quinóide é a estrutura aberta que possui em C-9 um grupo 2'-carboxifenil, e este apresenta uma coloração avermelhada. A segunda conformação estrutural é a Zwitteriônica, este possui uma coloração amarelada, e o seu núcleo, mais precisamente o C-9, é positivamente polarizado ocasionando a reatividade do grupo carboxila, sendo que esta será limitada para nucleófilos, portanto, não atacará o grupo carbonila mas atuará como uma base e abstrairá um dos prótons fenólicos levando à formação do monoânion carboxilato.

A última estrutura é conhecida como Lactônica que ocorre uma ressonância entre os anéis, ocasionando uma quebra de ligação π , devido à mudança de hibridização de sp^2 para sp^3 do C-9. Com esse fechamento da estrutura, ocasionará uma perda da coloração, resultando numa substância incolor (CHRISTIANSON, 2017; LAMBERTS e NECKERS, 1984; PELLOSI, 2012; PIETRANCOSTA *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2020)

A alteração da conformação estrutural dos xantenos está correlacionado com a alteração do valor do pH do meio. Portanto a modulação do pKa pode ser alcançada pela modificação do xanteno com grupos de retiradas de elétrons. Assim numa solução de pH ácido tende a formação da conformação lactônica, ocasionando a perda da coloração da solução. Enquanto no pH fisiológico a maioria dos derivados xantênicos são encontrados na forma tautomérica carboxílica, devido a desprotonação dos grupos carboxílicos e fenólicos, resultando assim na conformação Zwitteriônica (GERASIMOVA *et al.*, 2020; MÉNDEZ-ARDOY *et al.*, 2020; PIETRANCOSTA *et al.*, 2010).

2.2.1 Corante Rosa de Bengala

O xanteno corante Rosa de Bengala (RB) é um derivado de tetraiodado e tetraclorado de fluoresceína ($C_{20}H_2Cl_4I_4O_5$). Esse composto possui quatro átomos de iodo substituído diretamente na estrutura xantênica e quatro átomos de cloro ligado ao anel benzóico, como demonstrado na Figura 11 (SILVA, 2018).

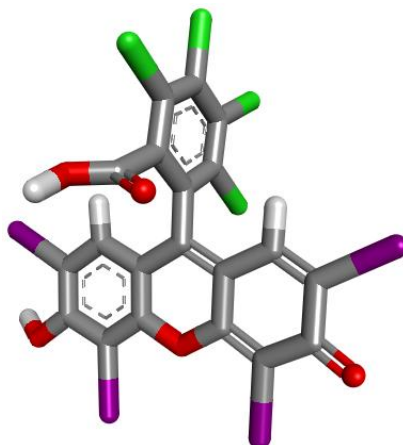


Figura 11. Estrutura molecular do corante Rosa de Bengala em 3D obtido no site Pubchem e visualizado no Discovery Studio Visualizer 2019.

O corante RB é conhecido também como Ácido Vermelho 94, e foi sintetizada por Gnehm em 1884, para ser utilizado como um corante vermelho nos tecidos da cidade de Bengala, situada na Índia. A sua nomenclatura está correlacionada ao fato das mulheres bengalis utilizarem manchas avermelhadas em seus cabelos, para simbolizar o comprometimento ao matrimônio (NECKERS, 1989; SILVA, 2018).

Esse composto é considerado como fotossensibilizador pois ativa o oxigênio molecular através da absorção da luz visível em um determinado comprimento de onda, originando assim, uma banda de absorção máxima em 550 nm associada a formação do estado singleto excitado. Em seguida pode sofrer uma transição para o estado tripleto excitado de longa duração, gerado através do cruzamento eficiente de intersistemas, com um rendimento quântico próximo de 1,0 (em água). E este pode então sofrer reações fotoquímicas produzindo espécies reativas (Figura 12). Sendo que as espécies reativas podem ser produzidas de duas formas (ABRAHAMSE *et al.*, 2017; ALEXANDRINO, 2016; BUCK *et al.*, 2017; FUENTES-LEMUS *et al.*, 2019; SILVA, 2018):

- **Transferência de elétrons:** há a transferência do elétron para o oxigênio molecular (O_2), produzindo superóxidos, peróxidos de hidrogênio e radicais hidroxilas.
- **Transferência de energia:** há transferência de energia para o oxigênio molecular, resultando assim na formação do oxigênio singleto (1O_2).

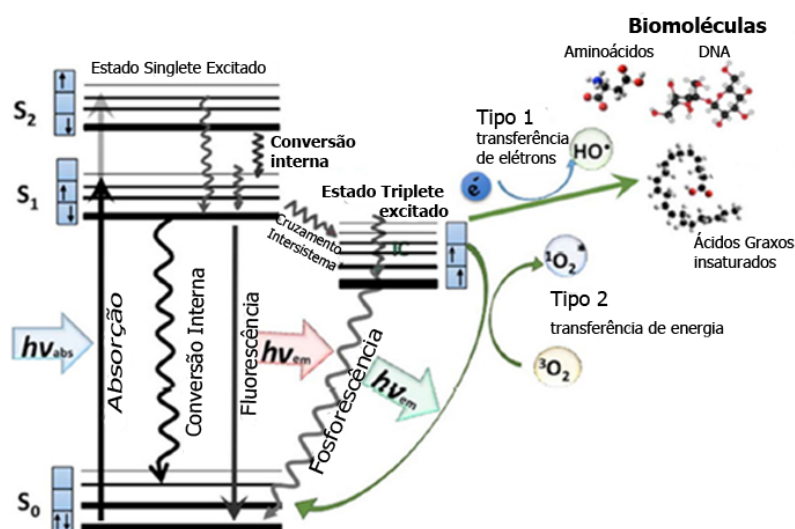


Figura 12. Diagrama de Jablonski (Fonte: ABRAHAMSE *et al.*, 2017 - modificado).

O RB é considerado um excelente fotossensibilizador dentre a classe dos xantenos, pois apresenta algumas propriedades com fatores elevados: *coeficiente de absorvidade molar*, *rendimento quântico do estado tripleto* e *rendimento na supressão do estado tripleto pelo oxigênio molecular*. Devido a essas características o RB é considerado como a substância que possui o maior rendimento quântico de oxigênio singleto (1O_2). Sendo que o seu mecanismo fotodinâmico consiste na formação de 80% de oxigênio singleto e 20% de ânion superóxido, através da absorção da luz numa faixa compreendida entre 450-600 nm de extensão (ALEXANDRINO, 2016; BUCK *et al.*, 2017; da COSTA *et al.*, 2010; SILVA, 2018).

Esse xanteno apresenta outras propriedades fotoquímicas e fotofísicas muito interessantes, como um baixo valor na taxa de fotobranqueamento em solventes polares próticos, indicando desse modo que o composto não degrada facilmente na presença de luz. A segunda propriedade é em relação ao alto

caráter hidrofílico, indicando que há uma baixa afinidade em membranas biológicas, pois este apresenta uma natureza lipídica, ocasionando assim maior afinidade com compostos mais hidrofóbicos, salvo os efeitos de carga em fosfolipídios aniônicos, onde as forças eletrostáticas modulam a interação droga-membrana (BEZKROVNAYA *et al.*, 2006; BUCK *et al.*, 2017; PEREIRA, 2013; SILVA, 2018).

2.2.1.1 Aplicações

Devido à riqueza em suas propriedades, tem assumido um papel peculiar em diferentes campos de disciplinas, como aplicações em área médica, forças armadas, e também em células solares (ZEYADA *et al.*, 2017).

2.2.1.1.1 Medicina

Na medicina o corante RB é muito utilizado na área da oftalmologia, para realizar diagnósticos da patologia “olho seco”. Nesse caso o corante não cora células normais, saudáveis, mas sim, células mortas, degeneradas, além de muco. Sendo assim, o médico aplica a solução no olho do paciente, e aguarda por 15 segundos para realizar o diagnóstico. A conjuntiva é examinada por iluminação através de um filtro verde, para averiguar os danos à superfície ocular ocasionado por células mortas e degeneradas, diagnosticando assim, a patologia (WANG *et al.*, 2019).

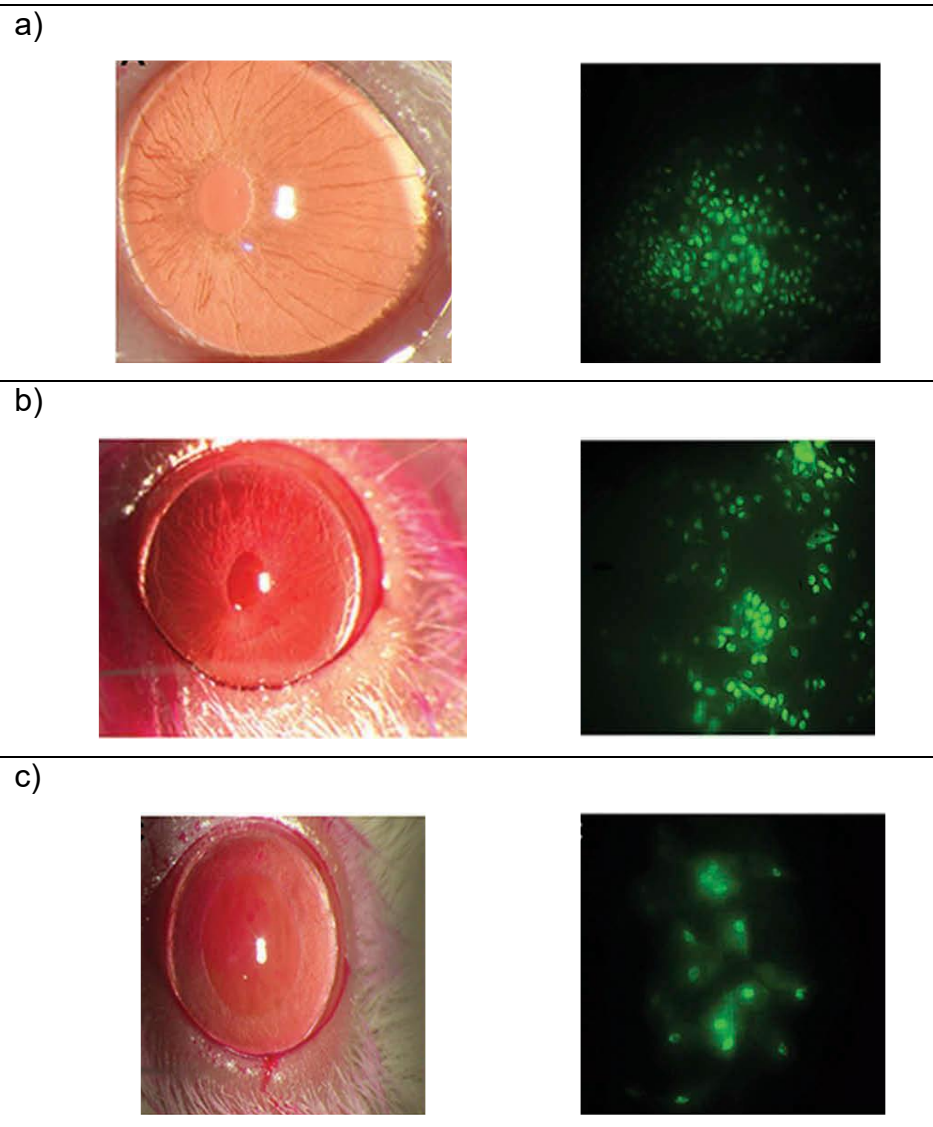


Figura 13. Imagens da patologia "olho seco" sob a análise do corante Rosa de Bengala. a) Olho sem patologia. b) Olho com grau moderado da patologia. c) Olho com grau severo da patologia (WANG *et al.*, 2019).

Nos dias atuais, o RB está sendo muito pesquisado para diagnosticar e tratar o câncer, como é o caso do trabalho de Qin e seus colaboradores (2017), que utilizam o corante no tratamento do câncer de cólon. Nesse trabalho relatou que o corante em baixas concentrações possui um caráter tóxico para as células malignas, induzindo alguns danos nos padrões moleculares. Tendo essa perspectiva dessa propriedade, foi investigado o potencial do RB como imunomodulador no câncer de cólon. Os resultados obtidos nesse estudo foram bem favoráveis, devido que houve uma regressão do tumor como demonstrado na Figura 14.

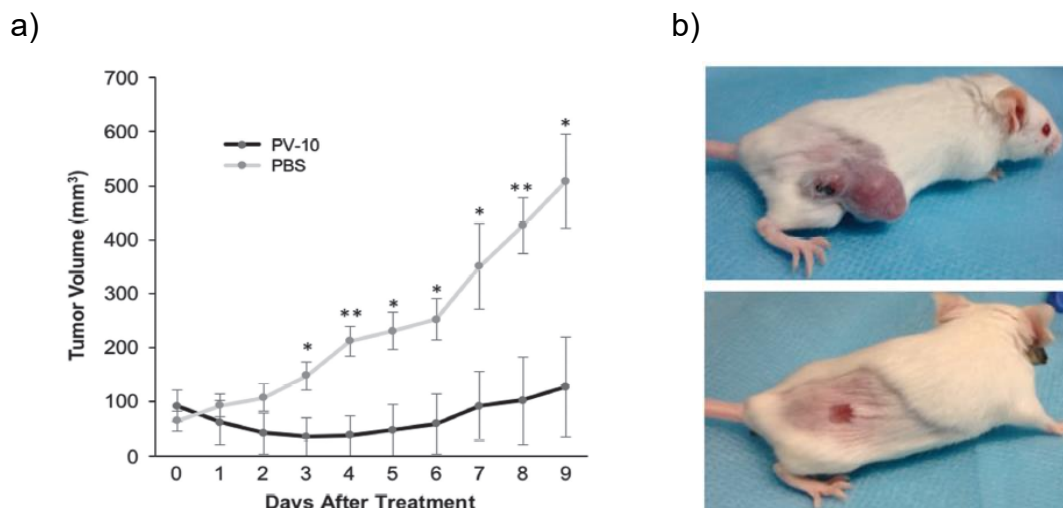


Figura 14. Resultados da regressão volumétrica do tumor no decorrer dos dias ao tratamento com o corante Rosa de Bengala. a) Gráfico da relação do volume do tumor em mm^3 por dia de tratamento. b) Imagem da redução volumétrica do tumor, obtida nas análises experimentais (QIN *et al.*, 2017).

2.2.1.1.2 Armamentos Químicos

Vivemos hoje a era pós Guerras Mundiais sob a segurança da comunidade internacional, pois esta está preocupada e se dedicando a evitar que novos confrontos possam surgir. E com o auxílio do Direito Internacional foi regulamentado e definido os crimes de guerra, sendo que um dos aspectos importantes dessa lei é a proibição do uso de armas químicas (TADJBAKHS, 2005).

Mesmo com a regulamentação dos Direitos Internacionais em relação ao armamento químico das nações, há uma grande preocupação dos países em relação a essa temática, sendo assim, muitos realizam pesquisas para se precaverem no futuro (THEE, 2016; GSDR, 2019). Com essa preocupação, as forças armadas dos Estados Unidos, mais especificamente a força aérea, realizou estudos com o corante RB para detectar agentes de guerra química. A pesquisa foi relacionada a geometria estrutural do corante, sendo que quando o substrato é exposto ao agente de guerra química, há o aparecimento da coloração rósea.

A alteração da geometria do corante se deu pelo fato que a maioria dos contaminantes como por exemplo agentes de guerra química, possuem um caráter ácido. Sendo assim, a perda da coloração rósea se deu pelo fato de

houver a alteração da estrutura conformacional do RB da forma quinóide (pH neutro) para lactônica (pH ácido), sendo que as conformações estruturais podemos verificar na Figura 10 (OWENS, 2020).

2.2.1.1.3 Células Solares

O sol é considerado como a principal fonte de energia gratuita e inesgotável no planeta Terra, desse modo, hoje em dia há vários estudos para aperfeiçoar as tecnologias (dispositivos de células solares eficientes) para utilizar a energia solar como fonte de eletricidade (IBN-MOHAMMED *et al.*, 2017; KABIR *et al.*, 2018).

A captação dessa fonte de energia é através de painéis fotovoltaicos, na qual é considerada um dos mercados mais promissores no domínio das energias renováveis. Pois há altos investimento envolvidos nessa área, na qual proporciona uma perspectiva de crescimento bem rápido (SAMPAIO *et al.*, 2017).

As células à base de silício alcançaram grande atração ao fato de possuir intervalo de banda estreito, porém o seu procedimento de preparação é caro e complicado (KHADTARE *et al.*, 2019; SHAH, 2017). Para solucionar esses problemas, os materiais semicondutores são processados como solução e são explorados como camada ativa nas células solares. A classificação dessas células solares são (IBN-MOHAMMED *et al.*, 2017; KHADTARE *et al.*, 2019):

- Células solares sensibilizadas com corante (DSSCs),
- Células solares sensibilizadas com pontos quânticos,
- Células solares híbridas,
- Células solares de perovskita

O trabalho de Khadtare e seus colaboradores (2019) realizaram uma nova abordagem para a sensibilização dupla de DSSCs e fotoeletrodo de ZnO, utilizando AgNPs e o corante RB. A pesquisa demonstra que o desempenho do DSSC é aprimorado quando AgNPs e RB são empregados como um sensibilizador duplo para fotoanodo ZnO. E também a eficiência de conversão de energia (PCE) obteve uma melhora de 2,1 para 3,8% quando AgNPS são empregados junto com o RB.

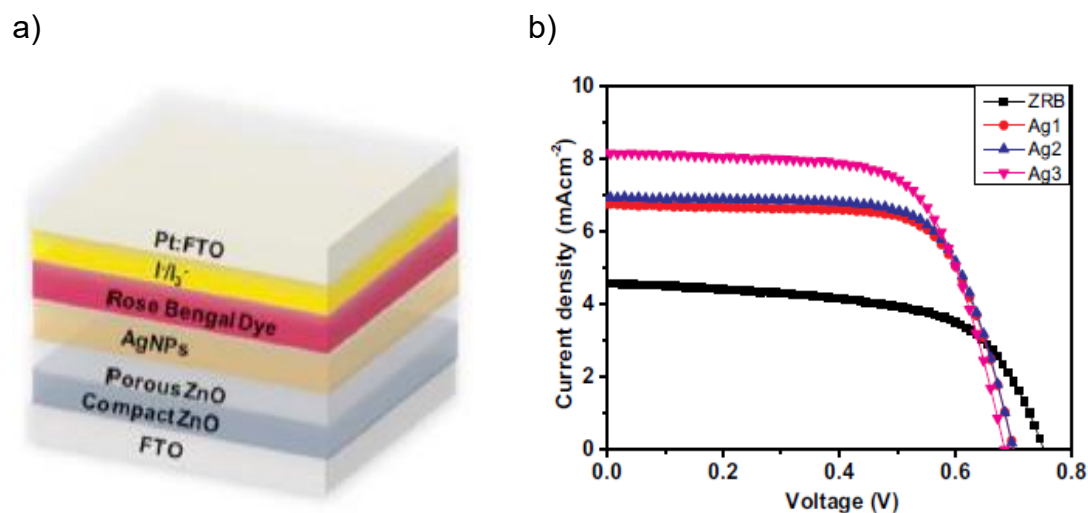


Figura 15. Utilização do corante Rosa de Bengala nas células solares. a) Esquema da composição da célula solar. b) Gráfico das análises dos resultados experimentais (KHADTARE *et al.*, 2019).

2.3 Técnicas utilizadas na metodologia de investigação da interação entre corante Rosa de Bengala e proteína HSA.

A obtenção da melhor compreensão sob a interação do corante RB à proteína HSA necessita adotar excelentes metodologias de investigação. A integração de métodos experimentais e computacionais tem enorme importância na identificação e no desenvolvimento de novas moléculas bioativas, e também pode auxiliar na melhor compreensão da interação entre estas à substância alvo (GUIDO *et al.*, 2010; JARDINE *et al.*, 2014; MORGON *et al.*, 2019).

A metodologia teórica é baseada na simulação computacional, e este é conhecida como Modelagem Molecular (MM), assim a sua característica principal é o caráter preditivo das propriedades eletrônicas e moleculares dos sistemas. Esse estudo tende a oferecer uma percepção transdisciplinar de aspectos relacionados a sequências de nucleotídeos e aminoácidos, dinâmica de proteínas, e também a interação proteína-proteína, proteína-DNA, proteína-ligante, a partir de ferramentas oferecidas pela Ciência da Computação, Matemática Aplicada e Estatística (GENHEDEN *et al.*, 2017; HAZARIKA *et al.*, 2020; MORGON *et al.*, 2019; VANOMMESLAEGHE *et al.*, 2014).

Como a metodologia da MM envolve cálculos matemáticos para a obtenção dos seus resultados, logo, estes podem ser baseadas em estudos semi-empíricos (física clássica) e/ou *ab initio* (cálculos quânticos), na qual podem ser

relativamente custosos, do ponto de vista computacional, ou seja, envolvem muito tempo para a conclusão dos cálculos (GENHEDEN *et al.*, 2017; MORGON *et al.*, 2019).

Os estudos experimentais de identificação dos sítios ativos para a estrutura de RB, envolvem a compreensão dos fatores que determinam a funcionalidade destes na proteína. E possuem a característica de serem muito complexos, pois dependem de sua estrutura tridimensional, e também das propriedades bioquímicas e biofísicas. Porém os sítios funcionais podem ser entendidos como uma redondeza física, química e físico-química que acompanha uma função, em contraposição a um grupo de resíduos fixos que não participam diretamente, porém, providenciam o arcabouço estrutural (JARDINE *et al.*, 2014).

Com o auxílio das Figura 3 e Figura 4 pode-se averiguar que há diferentes ambientes de interações dos fármacos na proteína HSA, e de acordo com alguns trabalhos como de Al-harhi e seus colaboradores (2019) e Ghuman e seus colaboradores (2005) e entre outros, relatam que muitos fármacos ocupam o mesmo microambiente proteico, como por exemplo, Subdomínio IIA: *Azaprazona, Indometacina, Iodopamida, Oxifenilbutazona, Fenilbutazona, Varfarina, Diflunisal*. Sendo assim, a absorção e a biodisponibilidade do fármaco em relação aos demais ocorrem via mecanismo de competição pela região de ligação da HSA (NETO *et al.*, 2020).

De acordo com a literatura a distribuição, ação e eliminação dos fármacos no organismo humano dependem da força de ligação desses derivados com a cadeia polipeptídica da biomolécula, na qual pode ser inferida a partir dos valores da constante de ligação (NETO *et al.*, 2020). Um dos métodos para calcular esse parâmetro está baseado na espectroscopia ultravioleta na região do visível.

2.3.1 *Docking* Molecular

O *docking* molecular envolve estudos para a formação de complexos proteína-ligante.

Uma analogia das teorias envolvidas para explicar a atividade farmacológica das drogas sustenta-se no paradigma conhecida como “chave-fechadura”. Normalmente a proteína é tratada como rígida em um sistema de coordenadas tridimensionais, enquanto o ligante pode ser flexível. Portanto a “fechadura” é a representação do receptor molecular, geralmente uma biomacromolécula, e

estes interagem com as moléculas bioativas, consideradas como a “chave”, tendo a idéia de que encontrar a orientação relativa correta da "chave" que abrirá a "fechadura". (BARREIRO *et al.*, 1997; MUKHOPADHYAY, 2014).

O *docking* molecular está relacionada com a otimização do ligante, que é a orientação de "melhor ajuste" deste ao se ligar a uma determinada proteína de interesse. Desse modo o mecanismo de "chave e fechadura" que serviu como uma explicação do substrato no sítio ativo da enzima desenvolveu-se gradualmente para o conceito de "mão e luva", pois agora leva em conta a flexibilidade da proteína e a adaptabilidade mútua do receptor e ligante. Pois nos estudos de *docking* molecular o ligante e a proteína ajustam sua conformação para atingir um "melhor ajuste", portanto tanto o ligante quanto a proteína são flexíveis, assim uma analogia "mão e luva" é mais apropriada do que "chave e fechadura" (MUKHOPADHYAY, 2014; ŠLEDŽ *et al.*, 2018).

As ferramentas de *docking* amplamente utilizadas empregam algoritmos de busca, como algoritmos genéticos, algoritmos baseados em fragmentos, algoritmos de Monte Carlo e algoritmos de dinâmica molecular. Existem algumas ferramentas como AutoDock, GOLD, FlexX e ICM que são usadas principalmente para simulações de *docking* de alto rendimento. Os estudos de *docking* podem ser realizados com receptor e ligante rígidos, receptor rígido e ligante flexível ou os dois flexíveis. O procedimento adotado nos estudos de *docking* molecular envolvem alguma etapas, e estes estão representadas na Figura 16 (JARDINE *et al.*, 2014).

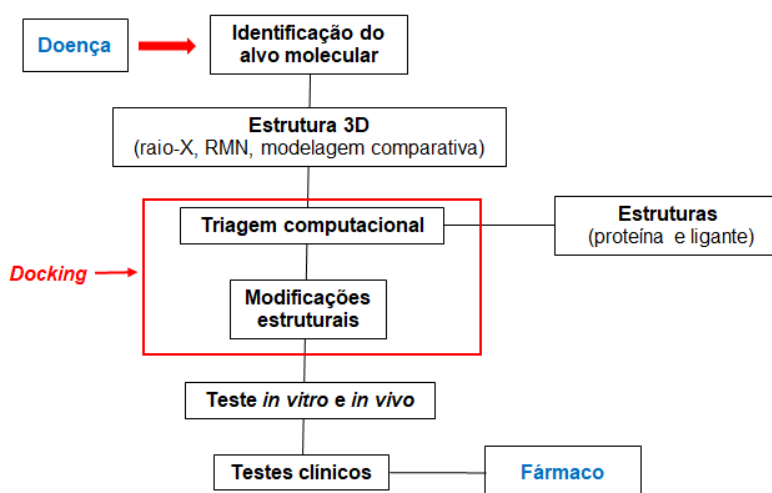


Figura 16. Fluxograma com as etapas básicas do desenho racional de fármacos baseado em estrutura. (Fonte: JARDINE *et al.*, 2014 – modificado).

Focando apenas na parte dos estudos envolvendo *docking* molecular, a Figura 16 nos mostra três processos: Banco de Compostos → Triagem Computacional → Modificações Estruturais.

- **Estruturas (proteína e ligante):** Nesse processo ocorre a escolha adequada da proteína que será utilizada nos estudos. Assim, recorre-se a um banco de dados de estruturas tridimensionais de proteínas, sendo que o mais conhecido é o *Protein Data Bank* (PDB). E estes serão avaliados computacionalmente, sendo que a melhor classificação são identificados como compostos de sucesso potencial para bioensaio posterior. Para a obtenção da estrutura do ligante podem ser utilizadas moléculas cristalográficas, utilização de bancos de dados de pequenas moléculas por exemplo o PubChem, ou modelagem molecular. (DAR *et al.*, 2017; YE *et al.*, 2020).
- **Triagem Computacional:** Esse processo também é conhecido como *Virtual Screening* (VS). Dependendo de diferentes pontos de partida, o VS pode ser categorizado em dois tipos: ***triagem virtual baseada em ligante*** usam a informação presente em ligantes ativos conhecidos, em vez da estrutura de uma proteína alvo para identificação e otimização (HAMZA *et al.*, 2012) e ***triagem virtual baseada em estrutura*** a partir da estrutura tridimensional (3D) cristalina do alvo de interesse. A confiabilidade de um programa de *docking* depende amplamente da eficiência do algoritmo de pesquisa conformacional e da qualidade de sua função de pontuação (Scoring Function - SF), em que o primeiro é projetado para a geração de conformações de ligante e o último para calcular a afinidade proteína-ligante das conformações correspondentes (YE *et al.*, 2020).
- **Modificações Estruturais:** consiste em analisar e identificar as alterações que serão necessárias na molécula para se obter a resposta biológica desejada. Modificações subsequentes são realizadas para aprimorar a molécula ligante e torná-la mais específica para um determinado alvo e ajustes farmacocinéticos como absorção, distribuição, metabolismo e eliminação. Nessa fase são utilizadas metodologias de *docking* mais acuradas, para a identificação da conformação de ligação das moléculas selecionadas

e a otimização dos compostos modificados estruturalmente por proposição do especialista (JARDINE *et al.*, 2014).

2.3.2 Espectroscopia de UV-vis

A absorção de radiação eletromagnética na região do visível (400-800 nm) por parte de moléculas, átomos ou íons estão normalmente associadas a transições eletrônicas. Sendo que estas, ocorrem por interações de radiações eletromagnéticas, na qual o elétron é promovido de um estado eletrônico de baixa energia para outro de maior energia (GAUGLITZ, 2017; MARTINHO, 1994).

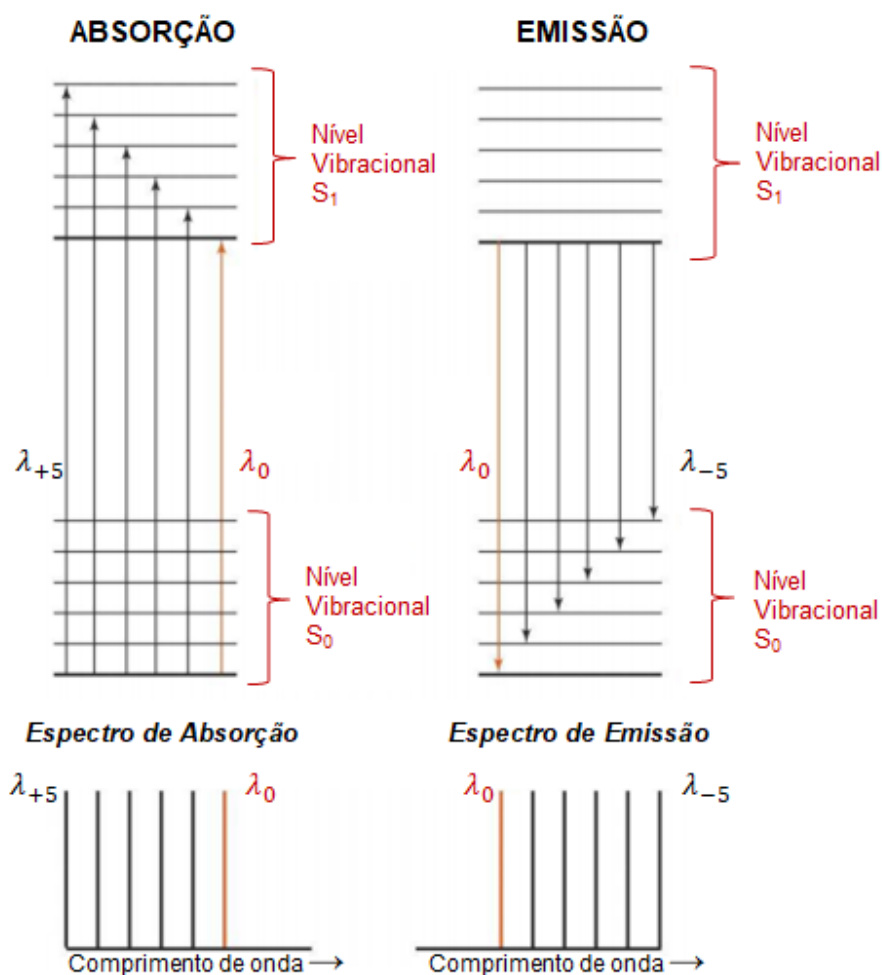


Figura 17. Espectro de Absorção e Emissão no Uv-vis. (Fonte: site mnstate.edu, 2016 – modificado).

A quantidade de luz absorvida quando um feixe de radiação monocromática atravessa o meio absorvente depende da concentração, desde que as

propriedades físicas e químicas não se alterem. Desse modo o comprimento do caminho óptico longo e as seções transversais de absorção fortes estão geralmente associados à alta sensibilidade, porém pode ocasionar a saturação do sensor afetando a sensibilidade e linearidade do sensor (KHAN *et al.*, 2019).

O estudo da sua variação com a concentração permite: **i) a determinação quantitativa de um grande número de substâncias químicas e biológicas; ii) o estudo cinético de reações lentas em solução; iii) a determinação de curvas de titulação.** Por outro lado, a compilação de espectros de absorção (representação gráfica do coeficiente de absorção molar em função do comprimento de onda) sob a forma de atlas ou bases de dados é usada para: **i) identificação e verificação do grau de pureza de compostos; ii) cálculo da diferença de energia entre estados eletrônicos e do momento dipolar da transição** (MARTINHO, 1994).

2.3.2.1 Lei de Beer-Lambert

As Leis de Lambert e Beer relacionam o poder radiante em um feixe de radiação eletromagnética, geralmente luz comum, ao comprimento do caminho do feixe em um meio absorvente e à concentração das espécies absorventes.. E ainda realizaram as seguintes observações (SKOOG *et al.*, 2016; SWINEHART, 1962):

- A quantidade de luz monocromática absorvida por uma substância é proporcional à intensidade da luz incidente, a proporção da intensidade da luz transmitida e incidente é constante.
- A intensidade da luz transmitida diminui exponencialmente quando a espessura da substância, por onde a luz está passando, aumenta linearmente.

$$A = -\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = a.b.c \quad (2)$$

Sendo que:

- A = Absorbância, anteriormente chamada de densidade óptica;
- P = Poder radiante, anteriormente chamado de intensidade;
- a = Absortividade, anteriormente chamada de coeficiente de extinção;
- b = Comprimento da viga no meio absorvente;

- c = Concentração das espécies absorventes.

A compreensão dessa lei fornece uma descrição precisa dos efeitos decorrentes da interação entre a luz e a matéria, sendo que qualquer desvio é geralmente interpretado como variação das interações químicas na amostra, ou então uma mudança na estrutura molecular no nível de uma célula unitária. Sendo assim, os efeitos normalmente resultariam em uma diferença de energia alterada entre os estados eletrônicos vibracionais. Porém infelizmente a interpretação correta dos espectros de absorção não é tão simples, pois basicamente há vários fatores que influenciam diretamente na posição, altura e forma da banda (MAYERHÖFER *et al.*, 2020).

2.3.3 Constante de Associação ou Constante de Interação ou Constante de Afinidade ou Constante de Ligação.

A afinidade de ligação de uma interação descreve a força entre uma molécula alvo e seu ligante, sendo que esta afinidade de ligação é geralmente relatada como a constante de ligação (K_a). Essa constante pode ser calculada matematicamente pela razão entre o equilíbrio da fração molar do alvo ligado (L_B), à fração molar do alvo não ligado, conhecido também como livre (Equação 3) (MALVERN PANALYTICAL (2019); WANG *et al.*, 2019).

$$K_a = \frac{[L_B]}{[L_F]} \quad (3)$$

Nos estudos de descoberta de novos fármacos, a utilização da metodologia para determinar os valores das afinidades são muito importantes, sendo que estes auxiliam na compreensão da eficácia dos medicamentos, que estão relacionadas com o grau de afinidade pelo alvo. Caso a afinidade de ligação for muito baixa, o fármaco será liberado nos tecidos adjacentes de forma descontrolada, o que acaba produzindo efeitos tóxicos, e se for muito alto, uma quantidade insuficiente de medicamento será liberada dentro de um período de tempo necessário (PRABAHARAN, 2016; VIANA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019).

Na metodologia de competição de sítios (regiões) de interações, onde dois ligantes com potenciais disponíveis para se ligarem a uma única molécula alvo, em concentrações semelhantes, com afinidades relativas de cada um para as

biomoléculas ditarão qual se liga preferencialmente. Portanto, o compostos que apresentar o maior valor de afinidade (K_a mais baixo), se ligará preferencialmente. A modulação das afinidades para os dois ligantes pode alterar os complexos que se formam (LAUGHLIN-TOTH, 2016; WANG *et al.*, 2019).

2.3.4 Método de Benesi-Hildebrand

A determinação experimental do valor de K_a referente aos estudos da interação entre a sonda ao hospedeiro, tem sido tradicionalmente baseada no uso da análise da metodologia de Benesi-Hildebrand (WAGNER-WYSIECKA *et al.*, 2020).

O método, como o própria nomenclatura diz, foi proposto por Benesi e Hildebrand em 1949, e desde então se tornou um método muito popular para determinar a constante de equilíbrio (K_a) a partir da estequiometria de interações de ligações. A metodolgia tem sido amplamente utilizado em muitos aspectos relativos a uma variedade de sistemas bastante diferentes, e através de várias técnicas espectroscópicas (UV-Vis, fluorescência, infravermelho, NMR, etc) podem ser utilizados no cálculo para determinar o valor correspondente de K_a (WANG, 2007).

A equação de Benesi-Hildebrand (Equação 4) nos auxila a obter o valor da constante de associação entre o ligante à proteína, desse modo, essa equação envolve valores de absorbancias obtidas experimentalmente sob a análise de técnicas espectroscópicas, e a concentração da proteína utilizada no experimento.

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{A_\infty - A_0} + \frac{1}{K_a(A_\infty - A_0)} \cdot \frac{1}{[\text{Proteína}]} \quad (4)$$

Para se obter o valor de K_a é necessário realizar um gráfico daEquação 4, na qual o eixo das coordenadas representa a relação $\frac{1}{A - A_0}$ e no eixo das abscissas a relação $\frac{1}{[\text{Proteína}]}$. A partir dos resultados do gráfico (valores dos coeficientes angular e linear) é possível então calcular o valor respectivo da constante de associação da interação ligante-proteína.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Identificar os sítios de ligação da molécula RB com a proteína HSA utilizando os estudos experimentais (técnica de espectroscopia de ultravioleta/visível), e também os estudos teóricos (*docking* molecular).

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar os valores das constantes de associação para a formação do complexo RB-HSA utilizando a equação de Beer-Lambert.
- Identificar a formação do complexo RB-HSA e averiguar qual polaridade se assemelha a essa interação.
- Realizar os estudos termodinâmicos (ΔH , ΔS , ΔG_m) da interação entre o corante RB à proteína HSA.
- Estudar a formação de complexos HSA-RB, por meio de *docking* molecular; identificar quais os possíveis sítios de ligação da RB na proteína HSA.
- Verificar se a variação do valor do pH influencia na formação do complexo HSA-RB.
- Verificar se a presença de metais bivalentes influenciam na interação entre o corante RB à proteína HSA.
- Averiguar se o corante RB possui afinidades a diferentes estruturas da HSA (desnaturada, protonada e oxidada) ocasionada por alguma patologia como Diabetes, Alzheimer e Parkinson.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Softwares

Os softwares utilizados nesse trabalho são: Genetic Optimization for Ligand *Docking* 5.5 (GOLD), Discovery Studio Visualizer 2019 (DS), Autodock, OriginPro 8, GraphPad Prism 5 e VMD 1.9.3.

4.2 Reagentes

Os compostos químicos que foram utilizados nesse trabalho são: Rosa Bengala (RB), albumina de soro humano (HSA), ibuprofeno 98% ($C_{13}H_{18}O_2$), varfarina ($C_{19}H_{16}O_4$), diflunisal ($C_{13}H_8F_2O_3$), diazepam ($C_{16}H_{13}ClN_2O$), digitoxina ($C_{41}H_{64}O_{13}$), biliverdina ($C_{33}H_{34}N_4O_6$), ácido linoleico ($C_{18}H_{32}O_2$), tetraidrofurano (C_4H_8O), acetonitrila (C_2H_3N), dimetilformamida (C_3H_7NO), acetona (C_3H_6O), metanol (CH_3OH), glicose ($C_6H_{12}O_6$), azida de sódio (NaN_3), borato de sódio ($Na_2[B_4O_5(OH)_4].8H_2O$), dodecil sulfato de sódio ($NaC_{12}H_{25}SO_4$), metionina ($C_5H_{11}NO_2S$), ácido hipocloroso ($HClO$), ácido hipobromoso ($HBrO$), ortoftaldeído (C_2H_5OH), 2-mercaptoetanol (C_2H_6OS), tioflavina T ($C_{17}H_{19}ClN_2S$), ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$), nitrato de níquel ($NiNO_3.6H_2O$), sulfato de cobre ($CuSO_4$), acetato de chumbo ($(PbAc)_2.3H_2O$), sulfato de zinco ($ZnSO_4.H_2O$), metilglioxical ($C_3H_4O_2$), todos da Sigma-Aldrich Chemical Co (St. Louis, MO, EUA) e álcool etílico 99% (C_2H_6O) da J. T. Baker Chemical Company (Phillipsburg, New Jersey).

4.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nesse trabalho são: espectrofotômetro UV-vis (Cary 8454 - Agilent Technologies) acoplado ao equipamento de agitação (R1 – Grant) , balança analítica (AG245 – Mettler Toledo), fluorescência (Synergy H1 Hybrid Reader - Biotek), pipetas (LabMate Soft), medidor de pH (300 Digital – Analyser), agitador de microtubos com aquecimento (AG100 - Agimaxx), equipamento de fluorescência de multidetector adaptado para microplacas. (Molecular Devices Spectra Max M2 - Sunnyvale, CA, EUA), agitador de microtubos com aquecimento (Accublock Digital Dry Bath – Labnet)

4.4 Preparo de Soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. A água foi purificada e deionizada em um sistema de purificação Milli-Q, M Millipore, Simplicity (Darmstadt, Germany). Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram usados tal como fornecidos sem purificação adicional.

4.4.1 Tampão Fosfato

No preparo do tampão fosfato (PBS) de 50,0 mM foram pesado 3,55 g de fosfato dibásico, e diluído em 500,0 mL de água. E pesados 3,45 g de fosfato

monobásico e diluí-o em 500,0 mL. Num béquer, foram adicionados 250,0 mL da solução fosfato monobásico de sódio, e em seguida foi adicionado 320,0 mL da solução fosfato dibásico de sódio resultando numa solução de pH 7,0, sendo que para esse processo foi necessário o auxílio de um medidor de pH.

4.4.2 Tampão Citrato

Na preparação do tampão citrato (CIS) de 50,0 mM foram pesado 0,9608 mg de ácido cítrico, e diluído em 500,0 mL de água. E pesados 1,4707 g de citrato de sódio e diluí-o em 500,0 mL. Em um béquer, foram adicionados 100,0 mL da solução ácido cítrico, e em seguida foi adicionado outros 100,0 mL da solução fosfato citrato de sódio resultando numa solução de pH 3,7, sendo que para esse processo foi necessário o auxílio de um medidor de pH.

4.4.3 Corante Rosa de Bengala

Na preparação da solução de RB a uma concentração de 10 mM, diluiu-se 10,20 mg do corante RB, na qual possui uma massa molar de $1017,60 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, em 1 mL de etanol. A partir dessa solução realizou as diluições necessárias para cada experimento.

4.4.4 Proteína Albumina do Soro Humano

A solução da HSA foi preparada diluindo 33,25 mg dessa proteína, sendo que possui uma massa molar de 66000 Dalton, em 500 μL de uma solução tampão fosfato (50,0 mM de pH 7,0) para se obter uma concentração final de 1,0 mM, e a partir dessa solução realizou as diluições necessárias para cada experimento.

4.4.5 Varfarina

Para o preparo da solução de varfarina de concentração de 10 mM, foram pesados 3,09 mg e diluído em 1,0 mL de etanol, sendo que a massa molar da varfarina é de $308,33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. A partir dessa solução realizou as diluições necessárias para cada experimento.

4.4.6 Ibuprofeno

Para o preparo da solução de ibuprofeno de concentração de 10 mM, foram pesados 2,06 mg e diluído em 1,0 mL de etanol, sendo que a massa molar do ibuprofeno é de 206,28 g.mol⁻¹. A partir dessa solução realizou as diluições necessárias para cada experimento.

4.4.7 Diflunisal

Para o preparo da solução de diflunisal de concentração de 10 mM, foram pesados 2,50 mg e diluído em 1,0 mL de etanol, sendo que a massa molar do diflunisal é de 250,20 g.mol⁻¹. A partir dessa solução realizou as diluições necessárias para cada experimento.

4.4.8 Diazepam

Para o preparo da solução de diazepam de concentração de 10 mM, foram pesados 2,85 mg e diluído em 1,0 mL de etanol, sendo que a massa molar do diazepam é de 284,74 g.mol⁻¹. A partir dessa solução realizou as diluições necessárias para cada experimento.

4.4.9 Digitoxina

Para o preparo da solução de digitoxina de concentração de 10 mM, foram pesados 7,66 mg e diluído em 1,0 mL de etanol, sendo que a massa molar da digitoxina é de 764,94 g.mol⁻¹. A partir dessa solução realizou as diluições necessárias para cada experimento.

4.4.10 Biliverdina

O preparo da solução de Biliverdina 1mM, foi realizado a partir da diluição de uma solução já preparada de concentração 4,0 mM.

4.4.11 Ácido Linoleico

Foi utilizada uma solução preparada de concentração 1,0 mM.

4.4.12 Glicose

Foi preparado solução de glicose de concentração de 2,0 M⁻¹, sendo que a massa molar desse composto é de 180,156 g.mol⁻¹, pesou-se então 1,80 g deste e dilui-o em 5,0 mL de tampão fosfato de concentração 50,0 mM de pH 7,0.

4.4.13 Azida de Sódio

Na preparação da solução de azida de sódio 2% (m/v), pesou-se inicialmente 0,02 g do composto e diluiu em 1,0 mL na água.

4.4.14 Borato de Sódio

Para o preparo da solução de borato de sódio de concentração de 0,10 M, foram pesados 61,83 mg e dilui em 100 mL na água.

4.4.15 Dodecil Sulfato de Sódio

Na preparação da solução de dodecil sulfato de sódio 20% (m/v), pesou-se inicialmente 2,0 g do composto e diluiu em 10,0 mL na água.

4.4.16 Metionina

Na preparação da solução de 40 mM de metionina, pesou-se inicialmente 2,98 mg do composto, sendo que a massa molar é 149,21, e diluiu em 0,50 mL de tampão fosfato de concentração 50,0 mM de pH 7,0.

4.4.17 Ácido Hipocloroso

O ácido hipocloroso foi preparado através da diluição de uma solução concentrada de 1,53 mol.L⁻¹, sendo assim, diluiu 66 µL do ácido em 934 µL de água, para então obter uma solução de concentração de 0,1 mol.L⁻¹.

4.4.18 Ácido Hipobromoso

Preparou inicialmente uma solução de brometo de sódio 0,2 mol.L⁻¹, na qual foram utilizados 103,1 mg desse sal para ser diluído em 5 mL de água. A seguir a obtenção da solução de ácido hipobromoso (HOBr) foi através da combinação entre as soluções de HOCl 0,01 mol.L⁻¹ e NaBr 0,2 mol.L⁻¹.

4.4.19 Tioflavina T

Para o preparo da solução estoque de Th-T 0,01 M foram pesados 3,18 mg de Th-T, sendo que a massa molar é de 318,86 g.mol⁻¹, e diluído em 1 mL de solução tampão fosfato (50,0 mM de pH 7,0) em um tubo de microcentrifugação

de 1,5 mL e a partir desta fizeram-se as diluições necessárias para cada experimento.

4.4.20 Nitrato de Níquel

O preparo da solução de nitrato de níquel de concentração de 10 mM, na qual possui massa molar de $290,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, foi utilizado 2,90 mg da solução e diluiu-o em 1,0 mL de água. E a partir dessa solução realizou as diluições necessárias para cada experimento.

4.4.21 Sulfato de Cobre

O preparo da solução de sulfato de cobre de concentração de 10 mM, na qual possui massa molar de $159,6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, foi utilizado 1,60 mg da solução e diluiu em 1,0 mL de água. E a partir dessa solução realizou as diluições necessárias para cada experimento.

4.4.22 Acetato de Chumbo

O preparo da solução de acetato de chumbo de concentração de 10 mM, na qual possui massa molar de $379,33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, foi utilizado 3,79 mg da solução e diluiu em 1,0 mL de água. E a partir dessa solução realizou as diluições necessárias para cada experimento.

4.4.23 Sulfato de Zinco

O preparo da solução de zinco de concentração de 10 mM, na qual possui massa molar de $179,47 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, foi utilizado 1,80 mg da solução e diluiu em 1,0 mL de água. E a partir dessa solução realizou as diluições necessárias para cada experimento.

4.5 Metodologia

4.5.1 *Docking* Molecular

Antes de iniciar os estudos de *docking*, foi necessário obter as coordenadas tridimensionais do receptor, no caso presente a HSA, que foi selecionada do PDB. Também é necessário ter as coordenadas tridimensionais do ligante. E o software que promoverá os estudos da possível formação dos complexos.

Também foi necessário o acompanhamento do processo por meio de um programa gráfico para analisar os resultados em cada etapa.

4.5.1.1 Software Autodock 4.2.6

4.5.1.1.1 Conformação estrutural da proteína HSA cristalográfica

A escolha da estrutura cristalográfica da HSA para os estudos de *docking* molecular, deve conter apenas a estrutura da proteína, sendo assim, o PDB escolhido não apresenta nenhum ligante complexado a ele. Desse modo, a escolha da estrutura cristalográfica da proteína no PDB possui o código 1AO6 (SUGIO *et al.*, 1999), e este apresenta uma resolução de 2,50 Å.

4.5.1.1.2 *Docking* Cego

Com o auxílio do software DS foram eliminadas as moléculas de água que continham na proteína HSA (PDB 1AO6).

Com o auxílio do Autodock tools, foram adicionados os átomos de hidrogênios polares na estrutura da HSA.

Em seguida determinou os parâmetros da caixa para realizar os estudos de *docking* cego, sendo assim, as coordenadas que foram utilizadas deveriam envolver toda a estrutura da proteína HSA. Então os parâmetros da caixa que foram utilizadas estão representadas na Tabela 1, aplicando uma malha de afinidade de resolução de 0,375 Å.

Tabela 1. Coordenadas da Caixa utilizadas no estudo de *docking* cego

Coordenadas	Nº de pontos	Centro da Caixa	Deslocamento
x	126	29,535	0
y	126	31,826	0
z	126	23,5	0

O parâmetro de algoritmo utilizado nesse estudo foi o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), com o tamanho populacional de 150 indivíduos, um número máximo de gerações em 27.000, com uma avaliação máxima de energia em 2,5 milhões em 100 corridas. Foi utilizado também o Auto-Grid4 junto ao programa

Autodock 4.2.6, para determinar os confôrmeros e seus respectivos valores energéticos.

Durante todo o procedimento do *docking* cego, o ligante foi tratado como uma estrutura flexível, e a proteína como rígida.

4.5.1.1.3 Procedimento de *docking* molecular no software Autodock 4.2.6

4.5.1.1.3.1 Sítio de Sudlow I

A estrutura da proteína HSA utilizada nos estudos de *docking* molecular possui o código 1AO6, sendo que esta foi obtida no site do PDB. Em seguida realizou os procedimentos de preparação da estrutura da proteína, utilizando os softwares DS e as ferramentas do software Autodock.

No software DS, retirou todas moléculas de água presentes na estrutura da HSA, e em seguida com o Autodock tools, realizou a adição de hidrogênios polares a essa estrutura.

O estudo do *docking* molecular ao sítio Sudlow I, foi realizado em 100 corridas, utilizando os parâmetros LGA, com tamanho populacional de 150 indivíduos, em um número máximo de gerações em 27.000, e com uma avaliação máxima de energia em 2,5 milhões. O Auto-Grid 4 foi utilizado para calcular os valores energéticos das possíveis poses no sítio de ligação.

Nesse estudo os parâmetros da caixa que foram utilizadas estão representadas na Tabela 2, com uma malha de afinidade de resolução em 0,375 Å.

Tabela 2. Coordenadas da caixa no *docking* molecular ao sítio Sudlow I.

Coordenadas	Nº de pontos	Centro da Caixa	Deslocamento
x	46	30,373	0,833
y	68	32,244	0,417
z	64	34,403	10,861

4.5.1.1.3.2 Sítio de Sudlow II

O estudo de *docking* molecular para o sítio Sudlow II, foram realizados sob a estrutura criatlográfica de código 1AO6, obtida no PDB. A essa estrutura foram

analisadas pelo software DS e com as ferramentas do software Autodock, e em seguida realizadas os protocolos para o estudo de *docking* utilizando o software Autodock.

No software DS a proteína foi averiguada se haveria alguma ausência de aminoácidos em sua estrutura, e também retirar as prováveis moléculas de água. E com as ferramentas do software Autodock foram realizadas a adição de hidrogênios polares.

O estudo do *docking* molecular ao sítio Sudlow II, foi realizado em 100 corridas, utilizando os parâmetros LGA, com tamanho populacional de 150 indivíduos, em um número máximo de gerações em 27.000, e com uma avaliação máxima de energia em 2,5 milhões. O Auto-Grid 4 foi utilizado para calcular os valores energéticos das possíveis poses no sítio de ligação.

Nesse estudo os parâmetros da caixa que foram utilizadas estão representadas na Tabela 3, com uma malha de afinidade de resolução em 0,375 Å.

Tabela 3. Coordenadas da caixa no *docking* molecular ao sítio Sudlow II.

Coordenadas	Nº de pontos	Centro da Caixa	Deslocamento
x	50	15,388	-14,139
y	100	27,694	-4,111
z	44	18,635	-4,889

4.5.1.1.3.3 Sítio III de fármacos ou Sítio FA1

A estrutura da proteína HSA utilizada nos estudos de *docking* molecular foi obtida no site do PDB, como citado anteriormente, e esta estrutura cristalográfica não apresenta nenhuma interação com ligantes. Em seguida, realizou os procedimentos de preparação da proteína, utilizando os softwares DS e as ferramentas do software Autodock.

No software DS, retirou todas moléculas de água presentes na estrutura da HSA, e em seguida com o Autodock tools, realizou a adição de hidrogênios polares a essa estrutura.

O estudo do *docking* molecular ao sítio III, foi realizada em 100 corridas, utilizando os parâmetros LGA, com tamanho populacional de 150 indivíduos, em

um número máximo de gerações em 27.000, e com uma avaliação máxima de energia em 2,5 milhões. O Auto-Grid 4 foi utilizado para calcular os valores energéticos das possíveis poses no sítio de ligação.

Nesse estudo os parâmetros da caixa que foram utilizadas estão representadas na Tabela 4, com uma malha de afinidade de resolução em 0,375 Å.

Tabela 4. Coordenadas da caixa no *docking* molecular ao sítio FA1

Coordenadas	N° de pontos	Centro da Caixa	Deslocamento
x	60	46,151	16,556
y	58	20,315	-11,472
z	40	16,201	-7,278

4.5.1.1.3.4 Sítio FA6

A estrutura da proteína HSA utilizada nos estudos de *docking* molecular possui o código 1AO6, sendo que esta foi obtida no site do PDB. Em seguida realizou os procedimentos de preparação da estrutura da proteína, utilizando os softwares DS e as ferramentas do software Autodock.

No software DS, retirou todas moléculas de água presentes na estrutura da HSA, e em seguida com o Autodock tools, realizou a adição de hidrogênios polares a essa estrutura.

O estudo do *docking* molecular ao sítio FA6, foi realizada em 100 corridas, utilizando os parâmetros LGA, com tamanho populacional de 150 indivíduos, em um número máximo de gerações em 27.000, e com uma avaliação máxima de energia em 2,5 milhões. O Auto-Grid 4 foi utilizado para calcular os valores energéticos das possíveis poses no sítio de ligação.

Nesse estudo os parâmetros da caixa que foram utilizadas estão representadas na Tabela 5, com uma malha de afinidade de resolução em 0,375 Å.

Tabela 5. Coordenadas da caixa no *docking* molecular ao sítio FA6.

Coordenadas	Nº de pontos	Centro da Caixa	Deslocamento
x	44	28,887	-0,694
y	78	33,692	1,861
z	44	39,508	15,917

4.5.1.2 Software GOLD 5.5

A metodologia utilizando o software GOLD 5.5 é diferente do adotado ao software Autodock 4.2.6. Começando pela escolha da proteína, que nesse estudo, a estrutura cristalográfica da HSA deverá possuir ligantes aos sítios que serão estudados. Devido a esse fator, há a necessidade de realizar o procedimento de *redocking* molecular.

4.5.1.2.1 Conformação estrutural da proteína HSA cristalográfica

No PDB verificou que as melhores estruturas para realizar os estudos de *docking* molecular são os que possuem os códigos 2BX8 e 2BXE (GHUMAN *et al.*, 2005).

O código PDB 2bX8 é uma estrutura cristalográfica da HSA que possui o ligante azapropazona no sítio de Sudlow I (IIA), e também no sítio III de fármacos (IB). Esse código de PDB apresenta uma resolução de 2,70 Å. Já o código 2BXE, é uma estrutura da HSA com o ligante diflunisal, e este está presente nos sítios de Sudlow I e II, e também ao sítio FA6. E essa estrutura cristalográfica apresenta uma resolução de 2,95 Å.

As duas estruturas cristalográficas do PDB foram analisadas no software DS, primeiramente verificando se todos os aminoácidos estão presentes nos sítios ativos. Em seguida, foi retirado as estruturas moleculares da água.

4.5.1.2.2 *Redocking* Molecular

O processo de *redocking* molecular é um processo de reconstruir o complexo proteína-ligante que estava na estrutura cristalográfica da HSA.

No software DS, retirou-se todas moléculas de água presentes da estrutura da HSA, e em seguida no GOLD 5.5 realizou a adição dos átomos de hidrogênio.

O estudo do *docking* molecular foram realizados aos PDBs 2BX8 e 2BXE, nos sítios ativos que cada uma das estruturas cristalográficas apresentam. Para cada cálculo de *redocking* molecular foram realizadas em 10 corridas, utilizando os parâmetros chemscore_kinase, a função de pontuação GoldScore, sob um raio de estudo sobre o ligante de 6,0 Å.

Os resultados obtidos do estudo de *redocking* molecular foram analisados no software DS em relação à visualização das poses e também em relação as pontuações energéticas de cada confôrmero.

4.5.1.2.3 Estrutura conformacional do corante Rosa de Bengala

A estrutura do corante RB utilizada nos cálculos de *docking* molecular foi adquirida no banco de dados do site PubChem. A estrutura escolhida possui um CID 25474 e está datada em 26 de Março de 2005 (Figura 18a). Mesmo a estrutura sendo adquirida em um banco de dados confiável, é aconselhável averiguar se a conformação escolhida está adequada, ou então, necessita realizar alguma adequação.

No caso do corante RB, foi verificado no software DS a sua estrutura conformacional, e observou que houve a necessidade em realizar a adequação dos anéis aromáticos, indicando assim a ressonância das ligações no anel, como demonstrado na Figura 18b.

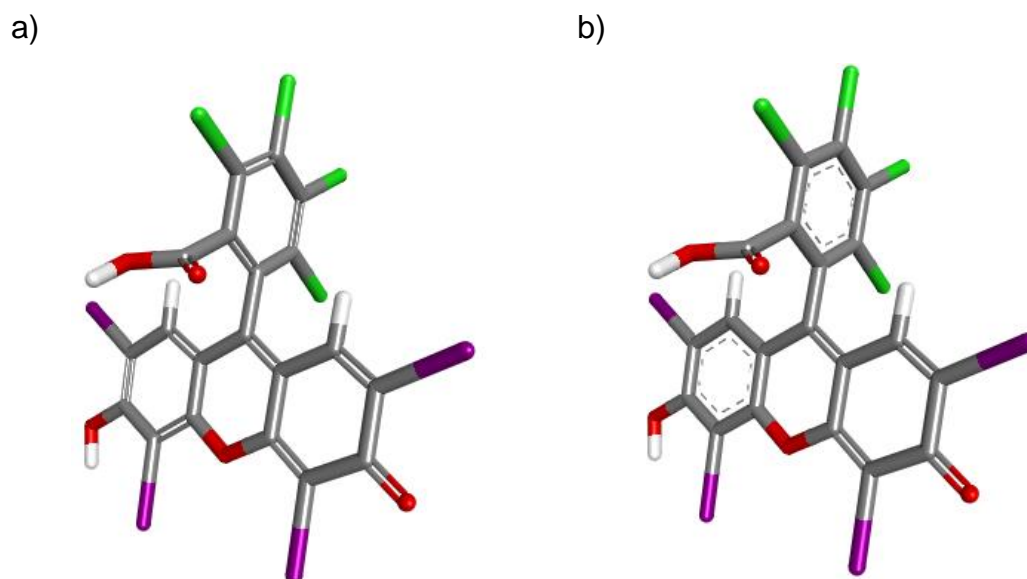


Figura 18. Estrutura do corante RB. a) PubChem, b) alterações no DS.

4.5.1.2.4 Cálculo do *Docking* Molecular

Com os arquivos gerados de cada *redocking* realizou-se então os estudos de *docking* molecular, sendo assim, esses estudos envolvem a colocação do ligante, nesse caso o corante RB, em cada sítio. Então para cada sítio de estudo, foram adicionados os hidrogênios, em seguida selecionou-se a região para os estudos de *docking* molecular e variou o raio em relação ao corante RB à proteína de 6 a 12 Å e a função de pontuação GoldScore.

As análises dos resultados do *docking* molecular foram realizadas em duas etapas, sendo a primeira uma análise dos valores energéticos correspondentes a cada confômero obtido no estudo. E a segunda etapa foi realizada com o auxílio do software DS, na qual, foi analisada as poses obtidas no estudo. E por fim, correlacionou as duas informações para se obter uma melhor compreensão dos resultados.

Com os melhores resultados obtidos pela *docking* molecular, verificou se haverá a possibilidade de melhorá-los, logo envolveu os estudos com os aminoácidos das cadeias laterais de cada sítio de ligação. Sendo que essa prática envolve o processo de protonar, flexibilizar ou rotacionar os aminoácidos que estão sendo envolvidos em cada interação obtidas anteriormente. A esse estudo prevaleceu as mesmas condições dos parâmetros adotados anteriormente.

Com os novos resultados, realizou as mesmas análises de energia e poses. Para então certificar, por análise comparativa, qual foi a melhor condição que obteve os melhores resultados.

4.5.2 Estudos para a determinação das interações atrativas e repulsivas da interação entre o corante RB à proteína HSA

Todos os estudos contidos aqui nessa tese sobre a determinação das forças atrativas e repulsivas da interação do corante RB à proteína, foram realizadas em parceria com a aluna de graduação Giulia Grandini, pertencente ao mesmo grupo de pesquisa que participo, do professor Aguinaldo. E também tive apoio dos alunos Caio e Lucas, pertencentes ao grupo de pesquisa do professor Nelson, que me auxiliaram na compreensão dos resultados obtidos desse estudo.

As interações não covalentes na estabilidade entre uma molécula de interesse e seu(s) sítio(s) ativo(s) na proteína alvo foi investigado, através do software NCIPLOT (BOTO *et al.*, 2020; CONTRERAS-GARCÍA *et al.*, 2012; JOHNSON *et al.*, 2010).

O NCIPLOT utiliza quatro algoritmos que calculam as interações não covalentes baseado na densidade eletrônica (ρ) e seu gradiente reduzido (s) (KOZUCH e MARTIN, 2013). A presença de interação entre fragmentos de moléculas provoca uma mudança no gradiente reduzido, localizado entre os átomos do fragmento, produzindo pontos críticos.

$$s(\rho) = \frac{\nabla\rho}{2(2\pi^2)^{1/3} \cdot \rho^{4/3}} \quad (5)$$

A análise da densidade eletrônica nesses pontos críticos é o que determina o tipo e a natureza da interação. Isso é realizado através do cálculo da segunda derivada da densidade ($\nabla^2\rho$), baseado no Teorema de Divergência, ao longo do eixo de interação. O sinal do $\nabla^2\rho$ indica se o fluxo do gradiente reduzido da densidade está saindo ($\nabla^2\rho > 0$) ou entrando ($\nabla^2\rho < 0$) de um determinado volume em um ponto de referência. Em resumo temos que se $\nabla^2\rho > 0$ indica repulsão e se $\nabla^2\rho < 0$ indica atração.

Para determinar o tipo de interação que está ocorrendo é utilizado a equação laplaciano e expresso em termos do segundo autovalor λ da Matriz Hessiana da densidade eletrônica:

$$\nabla^2\rho = \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 ; \text{ onde } \lambda_1 < \lambda_2 < \lambda_3 \quad (6)$$

O segundo autovalor λ_2 é responsável por determinar qual o tipo de ligação (ligação de hidrogênio, van der waals, etc). Quando $\lambda_2 > 0$ trata-se de repulsão (vermelho), quando $\lambda_2 \sim 0$ trata-se de uma atração fraca (verde) e quando $\lambda_2 < 0$, trata-se de uma atração forte (azul).

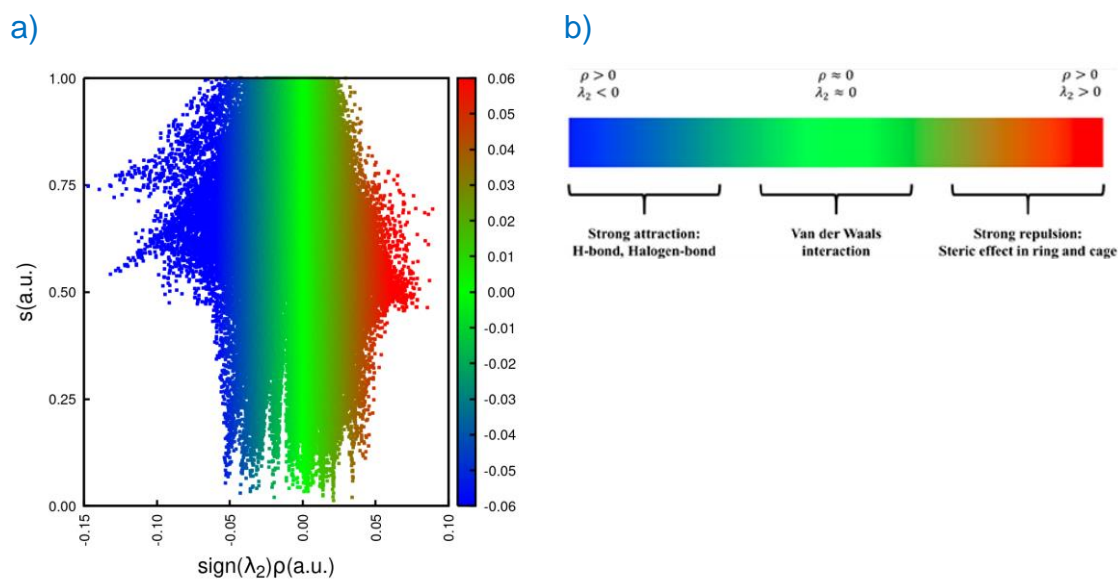


Figura 19. Interação intermolecular para o sítio Sudlow I obtido dos resultados de *docking* molecular pelo software Autodock. a) Diagrama de Scatter. b) Escala de cores do valor da função λ_2 (MU *et al.*, 2019).

Para determinar a densidade eletrônica, o NCIPLOT pode usar dados de funções de onda mecânico-quânticas ou densidades promoleculares, sendo que de acordo com o (BOTELHO *et al.*, 2021) densidades promoleculares são densidade de superposição de todos os átomos neutros esfericamente simétricos, e essas são construídas através das posições atômicas, da proteína e do ligante, informadas no *input*. Embora a densidade promolecular não leve em conta o relaxamento introduzido em cálculos Campo Auto-consistente (SCF), Hartree-Fock e Teoria do Funcional de Densidade (DFT), este é muito útil para sistemas biológicos enormes (CONTRERAS-GARCÍA *et al.*, 2012).

Os *inputs* que foram utilizados nos cálculos são as coordenadas das estruturas da Rosa de Bengala (ligante) e a HSA (proteína), obtidas nos estudos

de *docking* molecular. A *keyword* LIGAND indica o algoritmo que a densidade deva ser obtida em modo promolecular (*promolecular mode*). O NCIplot usa as coordenadas externas do ligante para computar as interações a partir dele, até um raio especificado. No caso desse trabalho o raio usado foi de 5 Å.

O interesse do uso do NCIplot foi de verificar as interações atrativas e repulsivas, de modo que as superfícies foram coloridas apenas de azul (atração) e vermelha (repulsão) sem ênfase no tipo de ligação. Toda a visualização dos resultados foi feita no software VMD (Visual Molecular Dynamics) (HUMPHREY *et al.*, 1996).

4.5.3 Determinação da constante de ligação do corante RB à proteína HSA

O primeiro intuito dessa tese é verificar se há a interação do corante RB à proteína HSA, sendo assim, verificou esse fenômeno utilizando as técnicas espectroscópicas de UV-vis.

Antes de realizar a preparação das amostras, dilui-se a solução inicial de RB (10 mM) para 1,0 mM, e assim essa nova solução foi utilizada para o preparo das soluções desse experimento. Então preparou quatro amostras do corante em diferentes concentrações, sendo que essas concentrações tinham uma variação de 2,5 µM e resultavam num volume total de 2,0 mL, conforme demonstrado na Tabela 6. E então essas amostras foram adicionadas em uma cubeta de quartzo de 3,0 mL, na qual possui um caminho óptico de 10,0 mm, para então realizar as análises espectrais.

Tabela 6. Valores da concentração do corante RB com seu respectivo volume e volume adicionado de tampão fosfato.

AMOSTRA	[RB] (µM)	V _{RB} (mL)	V _{tampão fosfato}
1	2,5	5	1990
2	5,0	10	1985
3	7,5	15	1980
4	10,0	20	1975
5	12,5	25	1970

Em seguida, preparou-se novamente as quatro amostras, porém agora adicionou 20,0 µL da proteína HSA de concentração inicial de 1,0 µM para cada amostra, como citada anteriormente. Tendo as soluções preparadas, realizou-se

as análises espectrais. Para então determinar a constante de associação entre o corante à proteína.

4.5.4 Determinação do sítio de ligação na HSA

Essa técnica para determinar o local preferencial do corante RB à proteína HSA, envolve uma competição entre o fármaco específico de cada sítio e o corante. Sendo assim, foram utilizados os seguintes fármacos: Varfarina (sítio Sudlow I), Ibuprofeno, Diflunisal e Diazepam (Sítio Sudlow II), Digitoxina e Biliverdina (Sítio FA1) e Ácido Linoleico (todos os sítios). Sendo que esses experimentos foram realizados em tampão fosfato de 50,0 mM a um pH 7,0.

Essas soluções foram preparadas a um volume final de 2,0 mL e adicionadas em uma cubeta de quartzo de 3,0 mL, na qual possui um caminho óptico de 10,0 mm, para então serem analisadas no equipamento de UV-vis, a uma temperatura de 25 °C.

4.5.4.1 Ensaio de deslocamento utilizando a Varfarina

Foram adicionados à cubeta de quartzo de 3,0 mL, que possui um caminho óptico de 10,0 mm, 20 µL do corante RB (1,0 mM), e então realizou a análise espectroscópica desse composto, na qual essa solução estava sob agitação. Em seguida houve a adição de 20 µL do fármaco Varfarina (1,0 mM) e adição de 2,5 µL de proteína HSA (200,0 µM) e aguardou o intervalo de dois minutos para realizar novamente a análise espectral. Após esse processo começou a realizar adições da proteína em forma de titulação (adições de 2,5 µL de HSA), e para cada adição aguardava-se por dois minutos para realizar a análise espectral.

4.5.4.2 Ensaio de deslocamento utilizando o Ibuprofeno

Foram adicionados à cubeta de quartzo de 3,0 mL, que possui um caminho óptico de 10,0 mm, 20 µL do corante RB (1,0 mM), e então realizou a análise espectroscópica desse composto, na qual essa solução estava sob agitação. Em seguida houve a adição de 20 µL do fármaco Ibuprofeno (1,0 mM) e adição de 2,5 µL de proteína HSA (200,0 µM) e aguardou o intervalo de dois minutos para realizar novamente a análise espectral. Após esse processo começou a realizar adições da proteína em forma de titulação (adições de 2,5 µL de HSA), e para cada adição aguardava-se por dois minutos para realizar a análise espectral.

4.5.4.3 Ensaio de deslocamento utilizando o Diflunisal

Foram adicionados à cubeta de quartzo de 3,0 mL, que possui um caminho óptico de 10,0 mm, 20 µL do corante RB (1,0 mM), e então realizou a análise espectroscópica desse composto, na qual essa solução estava sob agitação. Em seguida houve a adição de 20 µL do fármaco Diflunisal (1,0 mM) e adição de 2,5 µL de proteína HSA (200,0 µM) e aguardou o intervalo de dois minutos para realizar novamente a análise espectral. Após esse processo começou a realizar adições da proteína em forma de titulação (adições de 2,5 µL de HSA), e para cada adição aguardava-se por dois minutos para realizar a análise espectral.

4.5.4.4 Ensaio de deslocamento utilizando o Diazepam

Foram adicionados à cubeta de quartzo de 3,0 mL, que possui um caminho óptico de 10,0 mm, 20 µL do corante RB (1,0 mM), e então realizou a análise espectroscópica desse composto, na qual essa solução estava sob agitação. Em seguida houve a adição de 20 µL do fármaco Diazepam (1,0 mM) e adição de 2,5 µL de proteína HSA (200,0 µM) e aguardou o intervalo de dois minutos para realizar novamente a análise espectral. Após esse processo começou a realizar adições da proteína em forma de titulação (adições de 2,5 µL de HSA), e para cada adição aguardava-se por dois minutos para realizar a análise espectral.

4.5.4.5 Ensaio de deslocamento utilizando a Digitoxina

Foram adicionados à cubeta de quartzo de 3,0 mL, que possui um caminho óptico de 10,0 mm, 20 µL do corante RB (1,0 mM), e então realizou a análise espectroscópica desse composto, na qual essa solução estava sob agitação. Em seguida houve a adição de 20 µL do fármaco Digitoxina (1,0 mM) e adição de 2,5 µL de proteína HSA (200,0 µM) e aguardou o intervalo de dois minutos para realizar novamente a análise espectral. Após esse processo começou a realizar adições da proteína em forma de titulação (adições de 2,5 µL de HSA), e para cada adição aguardava-se por dois minutos para realizar a análise espectral.

4.5.4.6 Ensaio de deslocamento utilizando a Biliverdina

Foram adicionados à cubeta de quartzo de 3,0 mL, que possui um caminho óptico de 10,0 mm, 20 µL do corante RB (1,0 mM), e então realizou a análise espectroscópica desse composto, sendo que essa solução estava sob agitação. Em seguida houve a adição de 20 µL do fármaco Biliverdina (1,0 mM) e adição

de 2,5 μL de proteína HSA (200,0 μM) e aguardou o intervalo de dois minutos para realizar novamente a análise espectral. Após esse processo começou a realizar adições da proteína em forma de titulação (adições de 2,5 μL de HSA), e para cada adição aguardava-se por dois minutos para realizar a análise espectral.

4.5.4.7 Ensaio de deslocamento utilizando o Ácido Linoleico

Foram adicionados à cubeta de quartzo de 3,0 mL, que possui um caminho óptico de 10,0 mm, 20 μL do corante RB (1,0 mM) e então realizou a análise espectroscópica desse composto, sendo que essa solução estava sob agitação. Em seguida houve a adição de 20 μL do fármaco Ácido Linoleico (1,0 mM) e adição de 2,5 μL de proteína HSA (200,0 μM) e aguardou o intervalo de dois minutos para realizar novamente a análise espectral. Após esse processo começou a realizar adições da proteína em forma de titulação (adições de 2,5 μL de HSA), e para cada adição aguardava-se por dois minutos para realizar a análise espectral.

4.5.4.8 Ensaio de deslocamento utilizando Varfarina, Ibuprofeno, Biliverdina e Ácido Linoleico

Foram adicionados à cubeta de quartzo de 3,0 mL, que possui um caminho óptico de 10,0 mm, 20 μL do corante RB (1,0 mM), e então realizou a análise espectroscópica desse composto, sendo que essa solução estava sob agitação. Em seguida houve a adição de 20 μL de cada fármaco: Varfarina (1,0 mM), Ibuprofeno (1,0 mM), Biliverdina (1,0 mM) e Ácido Linoleico (1,0 mM), nessa solução ainda houve a adição de 2,5 μL de proteína HSA (200,0 μM) e aguardou o intervalo de dois minutos para realizar novamente a análise espectral. Após esse processo começou a realizar adições da proteína em forma de titulação (adições de 2,5 μL de HSA), e para cada adição aguardava-se por dois minutos para realizar a análise espectral.

4.5.5 Determinação da quantidade proporcional entre ligante e proteína

A técnica utilizada para determinar a proporção de corante RB ligada na proteína HSA, foi o Job's Plot, sendo assim, preparou treze soluções variando as concentrações do corante RB e da proteína HSA conforme demonstrado na

Tabela 7. Essa variação das concentrações do ligante e da proteína obedeceu ao requisito de manter constante a soma das concentrações destes em 11,0 mol.L⁻¹.

Essas soluções foram adicionadas em um cubeta de quartzo de 3,0 mL, na qual possui um caminho óptico de 10,0 mm, e então realizou as análises de espectroscopia no equipamento de UV-vis.

Tabela 7. Diferentes concentrações das soluções HSA e RB e valores da fração molar de RB.

Amostra	[HSA]_f (μM)	[RB]_f (μM)	X_{RB}
1	10,00	1,00	0,091
2	9,00	2,00	0,182
3	8,00	3,00	0,273
4	7,00	4,00	0,364
5	6,00	5,00	0,455
6	5,00	6,00	0,545
7	4,00	7,00	0,636
8	3,00	8,00	0,727
9	2,00	9,00	0,818
10	1,00	10,00	0,909
11	0,75	10,25	0,932
12	0,50	10,50	0,955
13	0,25	10,75	0,977

4.5.6 Influência do meio reacional

Os ensaios alterando o meio reacional foram realizadas para a verificação se há ou não uma alteração comportamental na interação do corante RB à proteína HSA, sendo assim, as influências estudadas foram a variação do pH, polaridade e temperatura do meio reacional.

4.5.6.1 Influência da variação do pH do meio reacional

Foram preparadas soluções de tampão em diferentes valores de pH, sendo assim, partindo da solução tampão fosfato citado anteriormente, foram realizadas as adições necessárias de fosfato monobásico para obtenção da solução com pH 6,2. Já para as soluções de pH 3,7 e 5,7 foram utilizados o tampão CIS também citado anteriormente, como esta solução possui um pH 3,7, portanto realizou adições de citrato de sódio para se obter o tampão de pH 5,7. E utilizou-se o tampão TRIS de pH 8,0, também citado anteriormente.

Essas soluções foram adicionadas o corante RB e verificou o comportamento deste nas análises dos espectros de UV-vis, sendo assim, adicionou-se então 20 µL da solução RB 1,0 mM e 1980,0 µL de tampão a uma cubeta de quartzo de 3,0 mL, na qual possui um caminho óptico de 10,0 mm, para ser analisada no espectrofotômetro UV-vis cada amostra.

Em seguida realizou estudos de interação do corante à proteína sob a influência do pH do meio reacional, então foram adicionados 20 µL da solução RB, 1980,0 µL do tampão e adições de 2,5 µL da proteína HSA (200,0 µM) utilizando a metodologia de titulação, em uma cubeta de quartzo de 3,0 mL, na qual possui um caminho óptico de 10,0 mm, para então ser analisadas no espectrofotômetro de UV-vis.

4.5.6.2 Influência da variação da polaridade do meio reacional

Como o intuito desse estudo é verificar se o comportamento do corante à proteína se contrasta a polaridade do meio, logo os solventes selecionados para esse experimento foram: DMF, THF, acetonitrila, metanol e etanol, de concentração analítica. Desse modo, em uma cubeta de quartzo de 3,0 mL, que possui um caminho óptico de 10,0 mm, foi adicionado 20,0 µL da solução de RB 1,0 mM e 1980,0 µL de solvente para então ser analisada no equipamento espectrômetro de UV-vis.

4.5.6.3 Influencia da variação da temperatura no meio reacional

O teste do comportamento da interação do corante RB à proteína HSA em diferente temperatura reacional, foram testadas em dois valores 40,3 °C e 20,1 °C, pois são os valores correspondentes das temperaturas máxima e mínima do corpo humano. Então, em uma cubeta de quartzo de 3,0 mL, que possui um

caminho óptico de 10,0 mm, foram adicionados 20,0 µL do corante RB a uma concentração inicial de 1,0 mM, 1980,0 µL de tampão fosfato (50,0 mM de pH 7,0) e adições de 2,5 µL da proteína HSA (200,0 µM) utilizando a técnica de titulação, e em seguida foram analisadas no espectrofotômetro de UV-vis.

4.5.7 Efeito do íon metálico na interação do corante RB à proteína HSA

Os íons metálicos estão presentes em inúmeras proteínas, enzimas e moléculas ativas biológicas (hemoglobina, citocromos com cofator de ferro, vitaminas e entre outras), e desempenha um papel essencial nos sistemas biológicos (funções celulares e subcelulares), entretanto, os íons metálicos possuem uma grande capacidade de ligação às proteínas; portanto, suas interações com ligantes, estruturas e funções podem ser afetadas (ŚLIWIŃSKA-HILL *et al.*, 2019). Então numa cubeta de quartzo de 3,0 mL, na qual possui um caminho óptico de 10,0 mm, foram adicionados 20,0 µL da solução RB (1,0 mM), 20 µL da solução metálica (1,0 mM), lembrando que cada solução metálica (nitrato de níquel, sulfato de cobre, acetato de chumbo e sulfato de zinco) foi analisada separadamente, e adições de 2,5 µL da solução de HSA (200,0 µM) utilizando a técnica de titulação, para então realizar as análises espectrais no equipamento de UV-vis.

4.5.8 Comportamento do corante RB em diferentes conformações da proteína HSA.

A importância dos estudos das interações de medicamentos com a proteína HSA nos permite compreender a farmacologia, farmacodinâmica e também a relação entre a estrutura e função das drogas (PENG *et al.*, 2012). Portanto continuaram-se estudos para determinar e compreender a interação do corante RB à proteína HSA, porém agora sob a influencia da alteração estrutural da proteína, na qual este passou por processos como glicação, oxidação e desnaturação.

4.5.8.1 Ensaio de Glicação da Proteína HSA

Os estudos de ensaio de glicação da proteína HSA se basearam nos procedimentos descritos nos trabalhos de Harsha *et al.*, 2013 e Ho *et al.*, 2010, e realizaram-se as modificações necessárias. Em um pequeno frasco de vidro

de 2 mL, foi adicionado 600 μL de HSA de concentração de 1 mmol.L^{-1} , 750 μL tampão fosfato 100 mmol.L^{-1} num pH 7,4, 0,02% de azida de sódio e 150 μL de metilglioxal (MGO – concentração de 10 mmol.L^{-1}). Foi preparada também a amostra controle, na qual a este foi substituída a solução de MGO pelo tampão fosfato. Essas soluções ficaram encubadas durante três dias sob a um temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Depois de realizar os ensaios de glicação da proteína, preparou-os para serem analisadas no espectrofotômetro de fluorescência, sendo assim, as soluções foram filtradas no Vivaspin 20 WMCO 10000 (GE Healthcare) e em seguida foi centrifugada a uma rotação de 14000 G, durante o intervalo de tempo de vinte minutos. Para monitorar se o processo de glicação da proteína ocorreu, foram realizadas análises de fluorescência no equipamento multidetector para microplacas, então as amostras foram excitadas em 350 nm e verificou a emissão nos comprimentos de onda entre 400 a 500 nm. As medidas foram realizadas em uma placa 96 poços em PS (Labsystems) preta.

Em seguida realizou o experimento para a determinação da interação do corante RB à proteína, sendo assim, numa cubeta de quartzo foram adicionados 20 μL da solução RB (1 mmol.L^{-1}) e quantidades diferentes da proteína ($0 - 6 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$), sendo que as adições de HSA envolvem 2,5 μL da proteína de concentração de $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ da HSA. Esta solução ficou sob agitação magnética durante 2 minutos antes de cada análise espectroscópica de UV-vis, e o experimento foi realizado a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.5.8.2 Ensaio de Oxidação da Proteína HSA

Para os estudos de ensaio de oxidação da proteína foi utilizado o equipamento de espectroscopia de UV-vis, sendo que para realizar essa análise foi utilizado uma cubeta de quartzo, na qual possui um caminho óptico de 10 nm, sendo que as soluções foram submetidas a agitação magnética de 2 minutos para cada análise, na qual estavam submetidas a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Foram realizados dois experimentos para a obtenção da oxidação da proteína, sendo que no primeiro foi utilizado o agente oxidante ácido hipocloroso (HClO), e no segundo o agente oxidante ácido hipobromoso (HBrO). O preparo dessas soluções utilizou-se o tampão fosfato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de pH 7,0.

4.5.8.2.1 Oxidação da Proteína HSA por Ácido Hipocloroso

Em um tubo de microcentrifugação de 2 mL foram adicionados 377,5 µL de tampão fosfato, 100 µL de proteína HSA 1 mmol.L⁻¹, e 20 µL de ácido hipocloroso 100 mmol.L⁻¹, deixou-a reagindo por um intervalo de tempo de dez minutos sob uma rotação de 300 rpm no equipamento de agitador de placas. Em seguida, adicionou 2,5 µL de metionina de concentração de 40 mmol.L⁻¹, para garantir que todo o agente oxidante tenha sido reagido, então deixou a solução reagindo por cinco minutos no equipamento de agitador de placas, sob as mesmas condições citadas anteriormente.

Depois da preparação da oxidação da proteína HSA, realizou-se então os ensaios para determinar a interação entre o corante RB estrutura proteica oxidada. Sendo assim, numa cubeta de quartzo foram adicionados 20 µL da solução RB (1 mmol.L⁻¹) e quantidades diferentes da proteína (0 – 6 µmol.L⁻¹), sendo que as adições de HSA envolvem 2,5 µL da proteína de concentração de 200 µmol.L⁻¹ da HSA. Esta solução ficou sob agitação magnética durante 2 minutos antes de cada análise espectroscópica de UV-vis, e o experimento foi realizado a uma temperatura de 25 °C.

4.5.8.2.2 Oxidação da Proteína HSA por Ácido Hipobromoso

Em um tubo de microcentrifugação de 2 mL foram adicionados 377,5 µL de tampão fosfato, 100 µL de proteína HSA 1 mmol.L⁻¹, e 20 µL de ácido hipobromoso 100 mmol.L⁻¹, deixou-a reagindo por um intervalo de tempo de dez minutos sob uma rotação de 300 rpm no equipamento de agitador de placas. Em seguida, adicionou 2,5 µL de metionina de concentração de 40 mmol.L⁻¹, para garantir que todo o agente oxidante tenha sido reagido, então deixou a solução reagindo por cinco minutos no equipamento de agitador de placas, sob as mesmas condições citadas anteriormente.

Depois da preparação da oxidação da proteína HSA, realizou-se então os ensaios para determinar a interação entre o corante RB estrutura proteica oxidada. Sendo assim, numa cubeta de quartzo foram adicionados 20 µL da solução RB (1 mmol.L⁻¹) e quantidades diferentes da proteína (0 – 6 µmol.L⁻¹), sendo que as adições de HSA envolvem 2,5 µL da proteína de concentração de 200 µmol.L⁻¹ da HSA. Esta solução ficou sob agitação magnética durante 2

minutos antes de cada análise espectroscópica de UV-vis, e o experimento foi realizado a uma temperatura de 25 °C.

4.5.8.3 Ensaio de Desnaturação da Proteína HSA

Foram encubadas 500 µL das amostras de HSA de concentração inicial de 200 µmol.L⁻¹ em tubos de microcentrifugação de 2 mL, por uma hora, sob agitação contínua de aproximadamente 300 rpm a 70 °C em um agitador de microtubos com aquecimento. Foi preparada também uma amostra controle com mesma concentração de HSA, e mantida a 25 °C. Para monitorar a formação das fibras amiloidais nas amostras foram empregadas ao método com a tioflavina-T, na qual foram analisadas a partir dos resultados de fluorescência com auxílio do equipamento multidetector adaptado para microplacas. Essas amostras então foram monitoradas pela excitação da tioflavina-T em 435 nm, e verificou a emissão de fluorescência nos comprimentos de onda entre 450 a 600 nm. As medidas foram feitas em uma placa 96 poços em PS preta.

Depois do teste para verificar se ocorreu a desprotonação da proteína, realizou-se então os ensaios para determinar se o corante RB interage com essa “nova” estrutura proteica. Sendo assim, numa cubeta de quartzo de 3 mL na qual possui um caminho óptico de 10 nm, foram adicionados 20 µL da solução RB (1 mmol.L⁻¹) e quantidades diferentes da proteína (0 – 6 µmol.L⁻¹), sendo que as adições de HSA envolvem 2,5 µL da proteína de concentração de 200 µmol.L⁻¹ da HSA. Esta solução ficou sob agitação magnética durante 2 minutos antes de cada análise espectroscópica de UV-vis, e o experimento foi realizado a uma temperatura de 25 °C.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como a estrutura da proteína HSA possui várias regiões de ligação e ainda há duas nomenclaturas para determina-las, assim, a Figura 20 demonstra como serão as denominações adotadas para identifica-las.

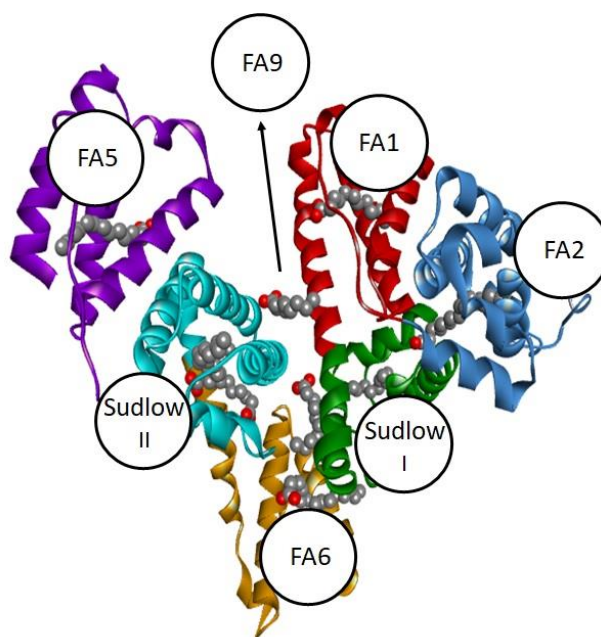


Figura 20. Nomenclatura dos sítios de ligação da proteína HSA.

5.1 *Docking* Molecular

Os estudos de *docking* molecular foram realizados em dois softwares, para realizar uma comparação entre os resultados obtidos, pois como relatado anteriormente, cada software possui o seu cálculo computacional em relação ao valor energético dos confôrmeros obtidos.

Foram também realizadas as análises das interações do complexo proteína-ligante, para esse estudo foi utilizado o software DS. E para complementar esse estudo, realizou as análises das interações atrativas e repulsivas obtidas pelo software NCIplot e analisadas pelo software VMD.

Para auxiliar na compreensão das análises das interações, obtidas pelos estudos de *docking* molecular, entre o confôrmero à proteína, foram numerados, com o auxílio do software DS, os átomos presentes na estrutura do RB (Figura 21).

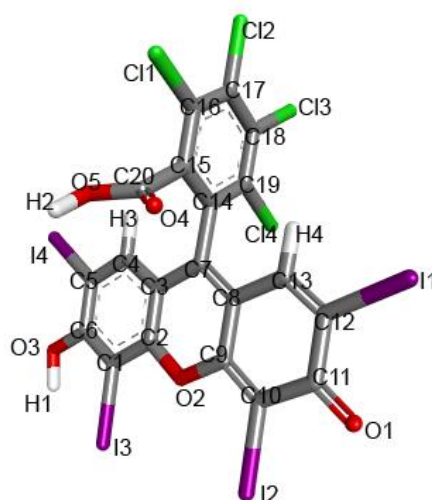


Figura 21. Numeração dos átomos na estrutura do corante RB.

5.1.1 Docking cego

O estudo do *docking* cego é um estudo para identificar os potenciais de interações entre uma determinada proteína e um ligante, desse modo, o *docking* deve ser realizado sob a estrutura da proteína por inteiro, assim com esses resultados indicará quais são as possíveis melhores regiões em que o ligante possui maior afinidades (LIU *et al.*, 2020).

Os cálculos utilizando essa metodologia foi realizado no software Autodock tools, e a estrutura cristalográfica da HSA escolhida para esse estudo foi o PDB 1AO6. Na qual este representa apenas a estrutura cristalográfica da proteína HSA, e possui uma resolução de 2,50 Å.

Na Figura 22 podemos verificar que os confôrmeros do RB estão distribuídos em apenas 5 sítios ativos: sítio Sudlow I (laranja), FA1 (azul), FA6 (amarelo) e FA9 (vinho).

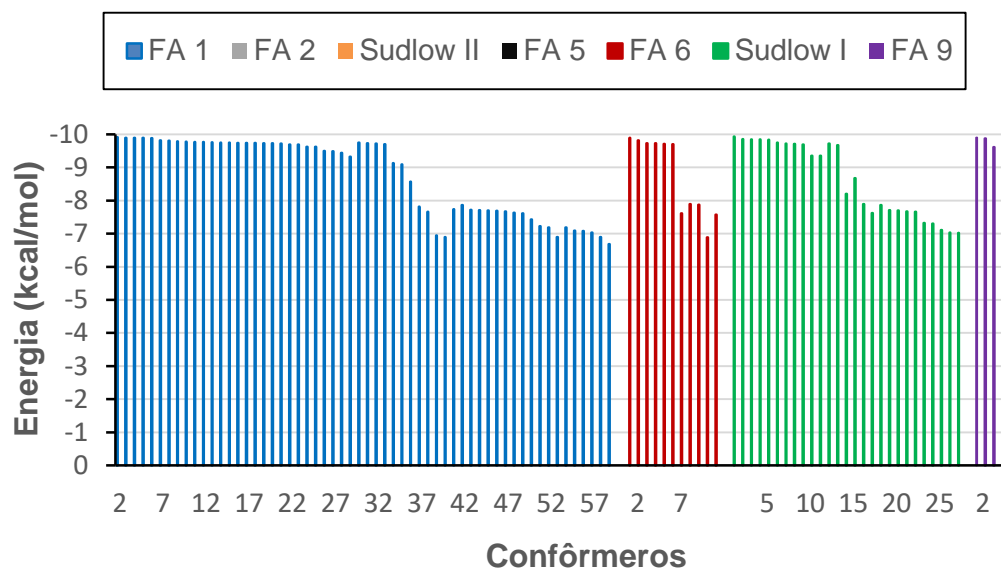


Figura 22. Resultados das energias dos confôrmeros RB obtidos nos estudos de *docking* cego realizados no software Autodock.

Devido a esses resultados obtidos, prosseguiu então com os estudos de *docking* molecular para essas regiões específicas (Sudlow I, FA1 e FA6). Entretanto, os estudos no sítio FA9 não foram realizados, devido ao seu baixo porcentual (3%) de confôrmeros obtidos nos estudos de *docking* cego (Figura 23). Porém ao sítio de Sudlow II foram realizados os estudos de *docking* molecular, mesmo este apresentando nenhum resultado, pois este é considerado uma região importante para as interações.

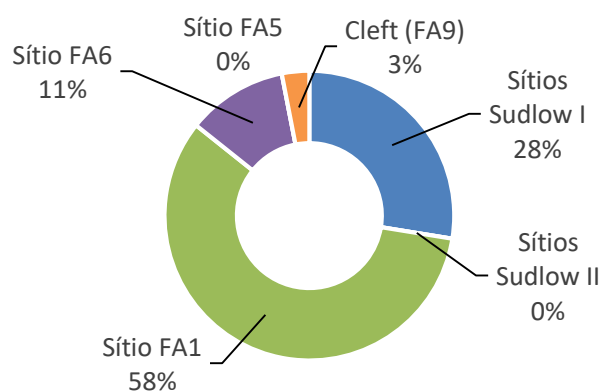


Figura 23. Resultados percentuais dos confôrmeros RB obtidos nos estudos de *docking* cego.

5.1.2 Software Autodock

No trabalho de Morris *et al.* (2012) relata que o software Autodock realiza o cálculo do campo de força incluindo seis pares em avaliações (V) e uma estimativa para a entropia conformacional perdida na ligação (ΔS):

$$\Delta S = (V_{(l)}^{L-L} - V_{(nl)}^{L-L}) + (V_{(l)}^{P-P} - V_{(nl)}^{P-P}) + (V_{(l)}^{P-L} - V_{(nl)}^{P-L} + \Delta S_{\text{conf}}) \quad (7)$$

Sendo que:

- (l) = ligado
- (nl) = não ligado
- L = Ligante
- P = Proteína

Cada um dos termos dos pares inclui avaliações para dispersão e repulsão, LH, eletrostática e solvatação.

A avaliação de dispersão e repulsão são parâmetros baseados no campo de força AMBER. As LH são direcionais, assim, há uma função que fornece a direção com base no ângulo da geometria da LH ideal e com os seus respectivos valores energéticos. A avaliação eletrostática está correlacionada com o potencial de Coulomb. E por fim, a solvatação leva em conta o potencial da dissolução baseado no volume de átomos (V) que circulam um dado átomo e o protegem do solvente.

5.1.2.1 Sítio Sudlow I

Os resultados dos estudos de *docking* molecular para o sítio Sudlow I indicam que o corante RB possui afinidade a essa região, como podemos verificar na Figura 24. O confômero do corante RB na interação com a estrutura da proteína HSA, obteve um valor energético de $-2,34 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

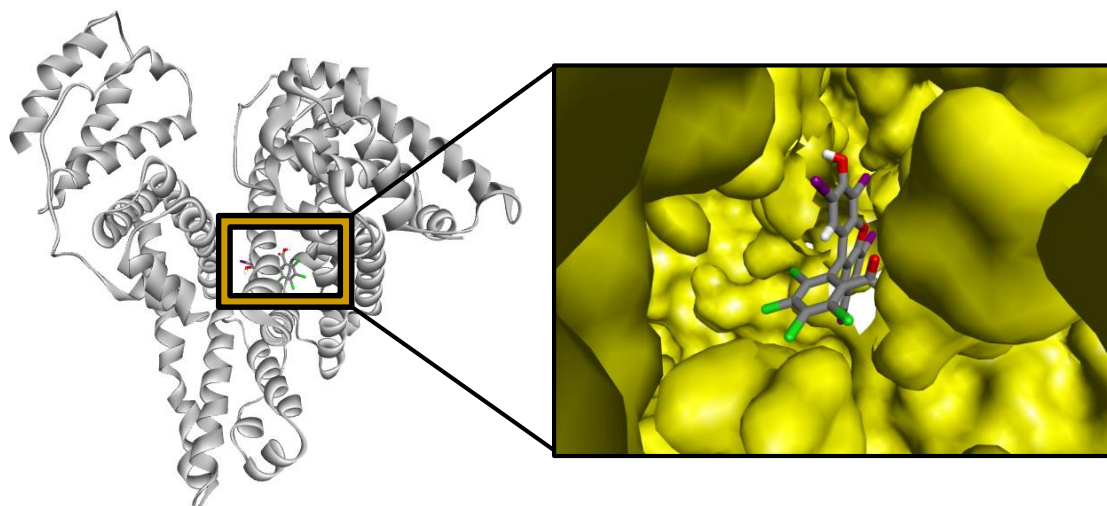
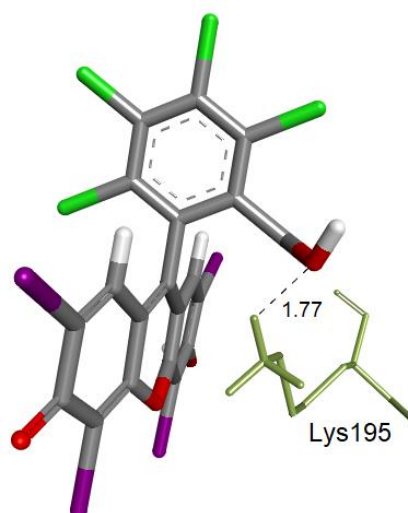


Figura 24. Confômero RB obtido nos estudos de *docking* molecular no sítio Sudlow I da proteína HSA.

Os estudos das prováveis interações que esse confômero RB realiza nesse sítio de ligação, foi realizado primeiramente no software DS. Na Figura 25a observamos que o corante RB faz 1 ligação de hidrogênio (LH), sendo uma entre o átomo oxigênio (O5) do RB ao átomo hidrogênio (HZ1) do aminoácido lisina 195, e este possui um distanciamento de 1,77 Å.

As outras interações podemos visualizar na Figura 25b, sendo que 2 são de Van der Waals (vdw) e 4 são interações π . As vdw ocorrem ente o átomo de cloro (Cl3) pertencente ao corante, até ao átomo de hidrogênio (HH22) do aminoácido arginina 222, na qual este possui um distanciamento de 2,39 Å. A segunda interação de vdw ocorre entre o átomo de iodo (I1) do RB ao átomo de hidrogênio do aminoácido valina 293, com um distanciamento de 2,50 Å. E as interações π ocorrem em: Lys195:NZ-RB (3,50 Å), Lys199:HZ1-RB (2,40 Å), RB:I3-Lys199 (3,63 Å) e RB-Lys195 (3,83 Å).

a)



b)

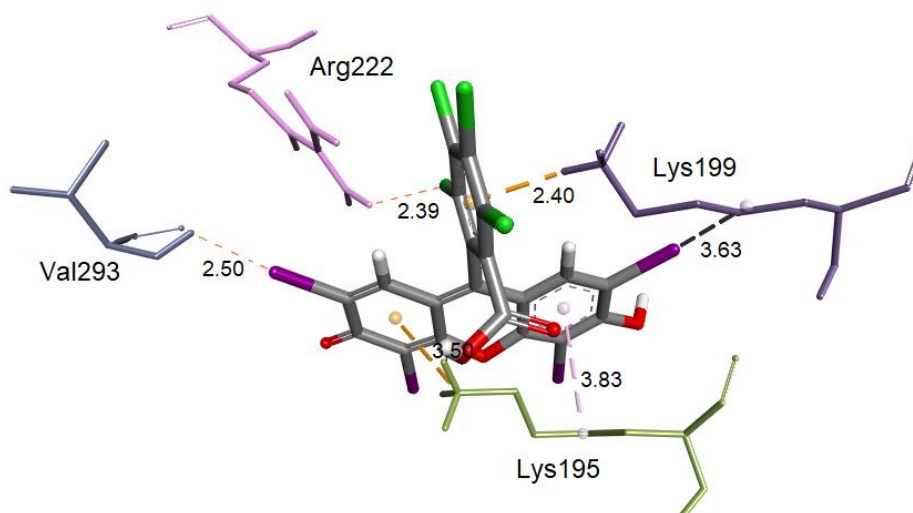


Figura 25. Mapa de interação do confômero RB ao sítio Sudlow I da proteína HSA com a distância em Å. a) Interação LH, b) Interações vdw e π .

Com os resultados e análises dos estudos de interações obtidas pelo software DS foi necessário averiguar se estas possuem caráter atrativa e/ou repulsiva. Desse modo, realizou estudos utilizando o software NCIplot.

Os resultados do NCIplot estão representadas na Figura 26, e nos revelam que a interação de LH com o aminoácido lisina 195 (1,77 Å) possui um caráter atrativa (coloração azulada), indicando que essa interação auxilia na formação do complexo.

Com relação as outras interações encontradas no software DS (Figura 25b) havia um equilíbrio entre as forças atrativas e repulsivas nos resultados pelo software NCIplot, resultando então que as interações π (aminoácidos lisina 195 e lisina 199), juntamente com a interação de vdw (aminoácido arginina 222) não auxiliam na formação do complexo.

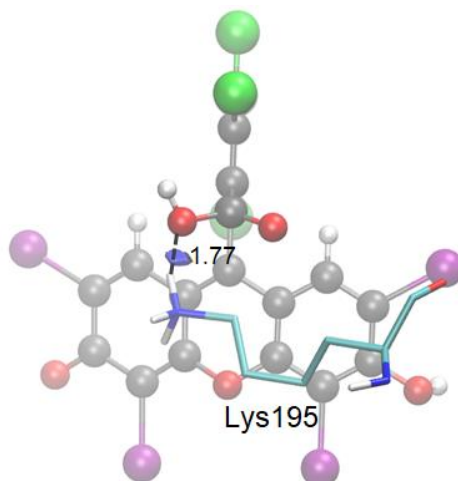


Figura 26. Resultados do NCIplot da interação entre o RB ao aminoácido lisina 195 do sítio Sudlow I obtidos pelo estudo de *docking* molecular no software Autodock, com a distancia em Å.

5.1.2.2 Sítio Sudlow II

Os estudos para o sítio Sudlow II nos mostraram que o corante RB possui baixa afinidade a essa região. As 100 corridas realizadas no estudo nos mostram que os valores energéticos estão dispersos, na qual variam de -1,80 kcal/mol até 525,54 kcal/mol (**Figura 27**).

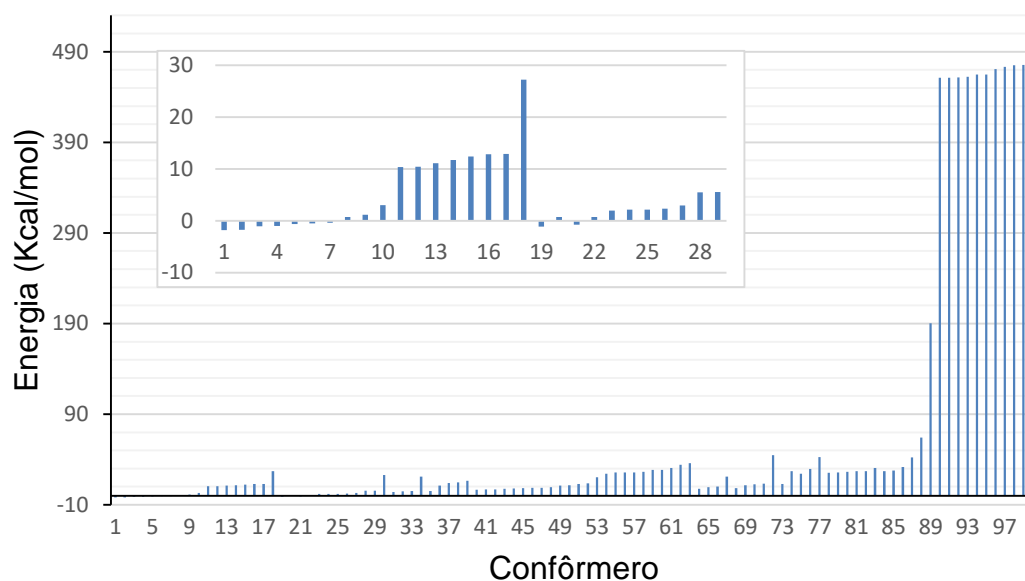


Figura 27. Resultados energéticos (kcal/mol) dos conformeros obtidos nos estudos de *docking* cego.

Realizou também uma análise das poses dos confôrmeros obtidos nesse estudo, desse modo podemos observar que estes ficaram dispersos em 3 regiões na região do subdomínio IIIA, como demonstrado na Figura 28.

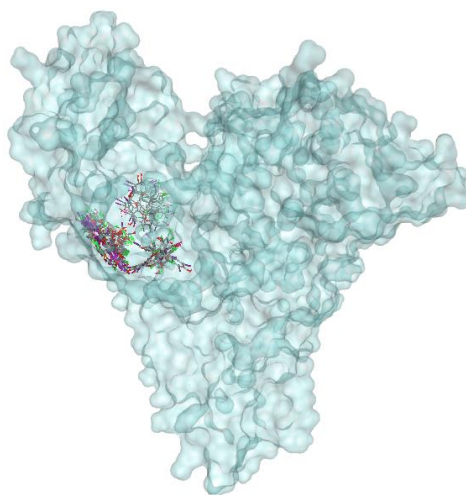


Figura 28. Poses dos confôrmeros obtidos no estudo de *docking* ao sítio de Sudlow II.

5.1.2.3 Sítio FA1

Os resultados de *docking* molecular realizados para o sítio FA1, localizado no subdomínio IB, indicam que o corante RB possui afinidades a essa região (Figura 29), e o seu valor energético foi calculado em $-2,26 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

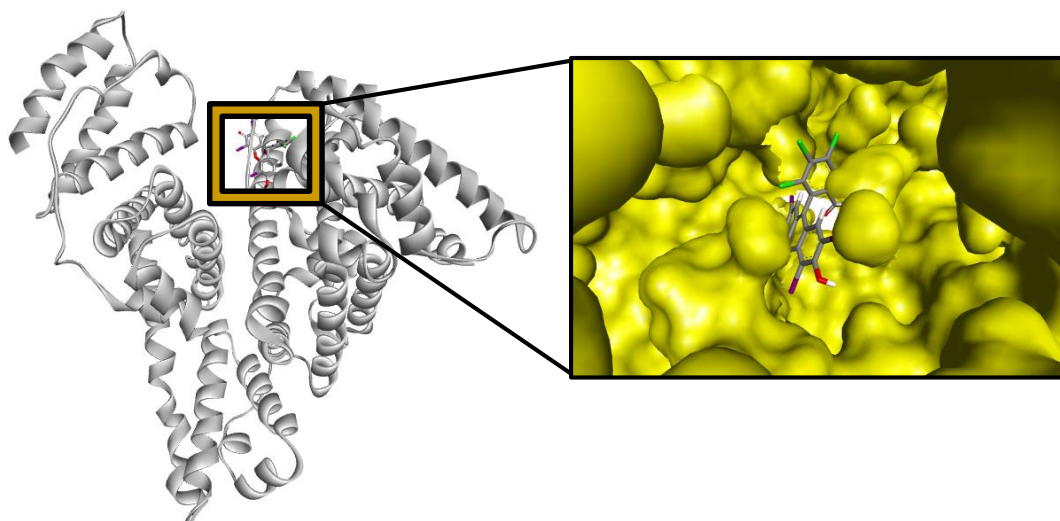


Figura 29. Confômero RB obtido nos estudos de *docking* molecular no sítio FA1 da proteína HSA.

Com o auxílio do software DS, realizou as análises das prováveis interações que possam estar ocorrendo entre o RB à proteína HSA. Desse modo, na Figura 30a observamos que há 4 interações de LH, sendo duas ocorrendo com o aminoácido arginina 114, entre os átomos hidrogênio (HE) do aminoácido ao átomo oxigênio (O1) do corante, a segunda interação é entre o átomo de hidrogênio (HH21) da arginina ao átomo oxigênio (O1) do RB, e estas duas interações possuem um distanciamento de 2,16 Å e 1,88 Å.

As duas outras interações de LH ocorrem entre os aminoácidos arginina 117 e leucina 182. Na arginina ocorre uma interação entre o átomo hidrogênio (HH12) ao átomo oxigênio (O5) do ligante, e este possui um distanciamento de 2,37 Å. E a última interação ocorre entre o átomo de oxigênio da Leu182 ao átomo de hidrogênio (H2) do RB, com um distanciamento de 2,15 Å.

Na Figura 30b observamos que outras interações estão ocorrendo na formação desse complexo a esse sítio de ligação. Há duas interações de vdW ocorrendo no mesmo aminoácido arginina 117, assim, a primeira interação é entre o átomo hidrogênio (HN) deste aminoácido, ao átomo iodo (I1) do corante que possui um distanciamento de 2,45 Å. A segunda interação é entre o átomo hidrogênio (HH11) do mesmo aminoácido ao átomo de cloro (Cl1) do RB, e este possui um distanciamento de 1,93 Å.

Na mesma imagem há ainda 3 interações π , e estas ocorrem entre o corante RB aos aminoácidos lisina 190, isoleucina 142 e arginina 186. A interação com

a Lys190 ocorre entre o átomo iodo (I3) do corante, e este possui um distanciamento de 3,57 Å. E o aminoácido Ile142 está interagindo com o átomo iodo (I4) do RB, a esta interação há um distanciamento de 3,55 Å. Já com o aminoácido Arg186 há uma interação com um dos anéis aromáticos do ligante, e esta possui um distanciamento de 3,91 Å.

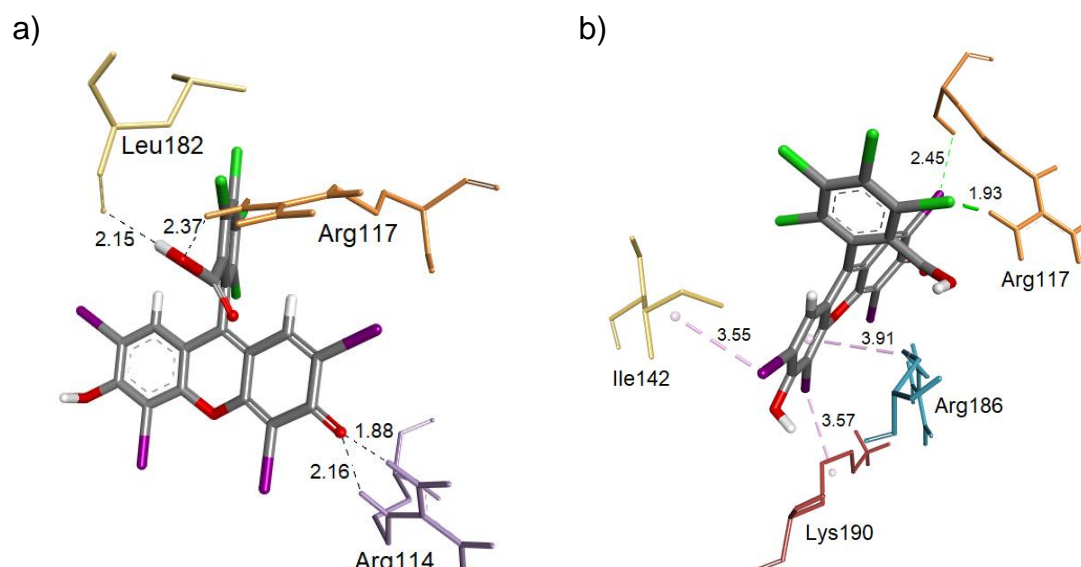


Figura 30. Mapa de interação do confôrmero RB ao sítio FA1 da proteína HSA, com o distanciamento em Å. a) Interação LH, b) Interações vdw e π .

No software NCiplot foram constatadas apenas duas interações ocorrendo na formação do complexo. Na Figura 31 podemos observar que há apenas uma interação do tipo LH que está ocorrendo entre o átomo de oxigênio (O1) do corante ao átomo de hidrogênio do aminoácido arginina 114, e que apresenta um distanciamento de 1,88 Å.

A segunda interação é do tipo vdw, e esta ocorre entre os átomos de cloro (Cl1) do RB ao átomo de hidrogênio do aminoácido arginina 117, com um distanciamento de 1,93 Å.

Os outros aminoácidos (Ile142, Leu182, Arg186 e Lys190) que estão representados na Figura 30 também foram analisadas no software NCiplot, e averiguou que eles não possuem uma interação de caráter atrativo, desse modo esses aminoácidos não auxiliam na formação do complexo.

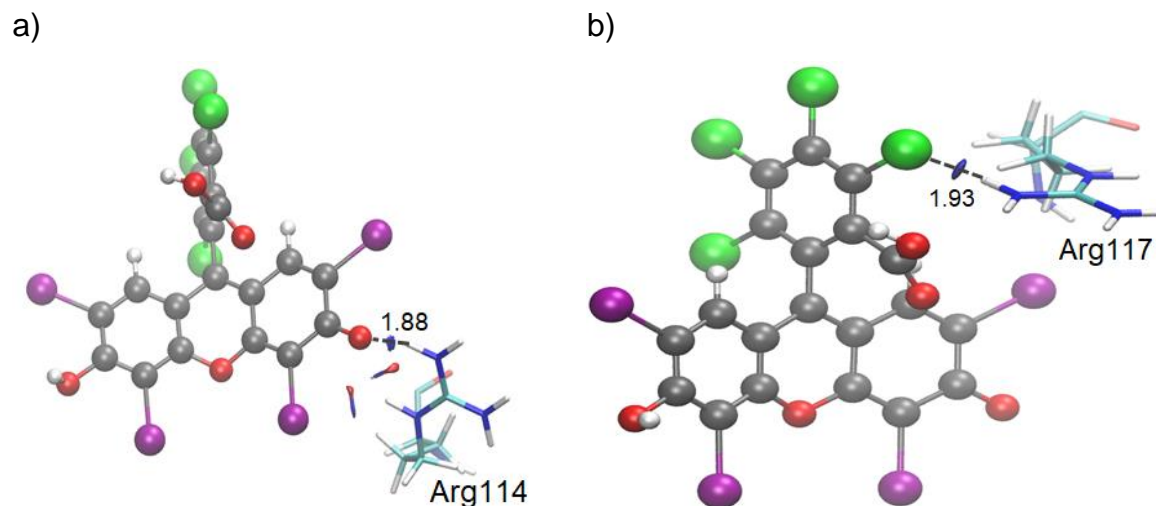


Figura 31. Resultados do NCiplot da interação entre o RB aos aminoácidos do sítio FA1 obtidos pelo estudo de *docking* molecular no software Autodock, com distanciamento em Å. a) Arginina 114. b) Arginina 117.

5.1.2.4 Sítio FA6

No sítio FA6 podemos observar na Figura 32 que o corante interage na proteína HSA, e esta interação ocorre em uma das entradas do sítio de ligação. Para essa região a formação do complexo obteve um valor energético de $-3,25 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

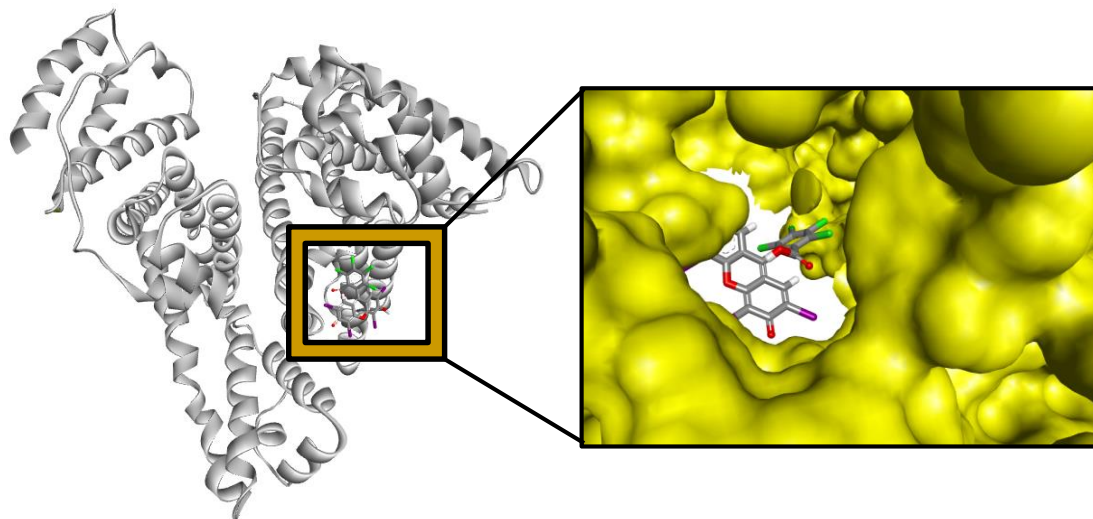


Figura 32. Confômero RB obtido nos estudos de *docking* molecular no sítio FA6 da proteína HSA.

Na Figura 33 podemos observar que o corante RB faz duas interações LH no sítio FA6, sendo que uma das interações ocorre entre o átomo oxigênio (OE1)

do aminoácido ácido glutâmico 208 ao átomo de hidrogênio (H2) do corante, e este possui um distanciamento de 2,28 Å. A outra interação ocorre entre o átomo de hidrogênio (HG1) do aminoácido treonina 243 ao átomo de oxigênio (O5) do RB, sendo que o distanciamento dessa interação é de 2,88 Å.

As interações π também estão presentes na formação desse complexo, e podem ser observadas na Figura 33b. Na imagem podemos analisar que há duas interações do tipo π , sendo que uma acontece entre a estrutura do aminoácido glicina 207 à estrutura do corante, e apresenta um distanciamento de 3,54 Å. Já a outra, ocorre entre a treonina 243 à estrutura do RB, com um distanciamento de 3,58 Å.

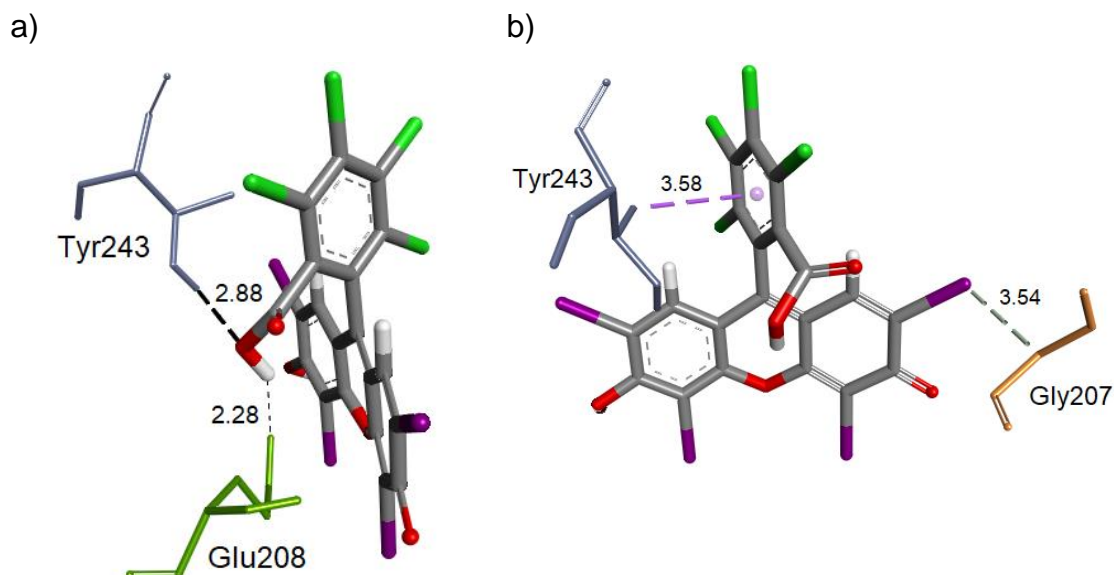


Figura 33. Mapa de interação do conformero RB ao sítio FA6 da proteína HSA, com distanciamento em Å. a) Interação LH, b) Interações π .

Para analisar se as interações obtidas pelo software DS são atrativas ou repulsivas, analisou-se os resultados com o software NCIplot (Figura 34) ocorrendo apenas uma única interação atrativa, sendo esta entre o corante RB e o ácido glutâmico 208 (LH), e com uma distancia de 2,28 Å.

As interações π que foram encontradas na análise com o software DS, foram classificadas como interações que não auxiliam na formação do complexo RB-HSA, pois estas não obtiveram uma *isosurface* atrativa (cor azulada).

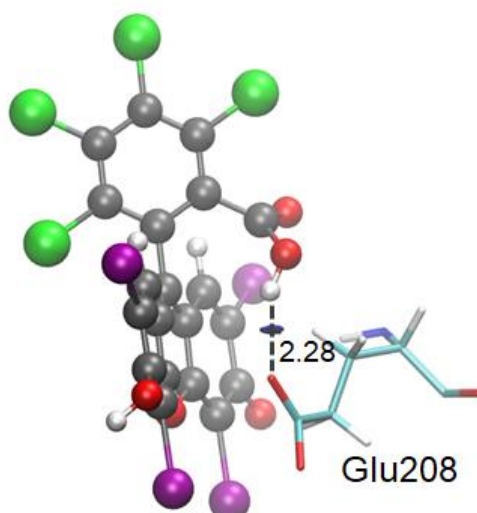


Figura 34. Resultados do NCIplot da interação entre o RB ao aminoácido ácido glutâmico 208 do sítio FA6, obtido pelo estudo de *docking* molecular no software Autodock, com distanciamento em Å.

5.1.3 Software GOLD 5.5

No software GOLD o cálculo dos valores energéticos dos confôrmeros obtidos em cada análise foram baseados na função de ajuste GoldScore, que é calculado pela Equação 8. Onde o $S(\text{hb_ext})$ representa a energia da LH da proteína-ligante, $S(\text{vdw_ext})$ a energia das interações de vdw da proteína-ligante, e $S(\text{int})$ e uma penalidade para não incentivar as interações internas do ligante (CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE SOFTWARE, 2019; SOUZA *et al.*, 2019).

$$\text{Função de ajuste} = S(\text{hb_ext}) + 1,3750 \times S(\text{vdw_ext}) + S(\text{int}) \quad (8)$$

5.1.3.1 Seleção da estrutura da proteína HSA

Os estudos de *docking* molecular utilizando o software GOLD necessita que a estrutura cristalográfica da proteína HSA tenha algum ligante ao sítio de ligação que será estudado. Pois as coordenadas que o ligante possui na proteína é usada para fornecer ao software GOLD os parâmetros para o estudo de *docking* molecular (Cambridge Crystallographic Data Centre Software, 2019). Assim, realizou um levantamento de dados ao site PDB e houve a seleção de algumas estruturas como demonstradas na Tabela 8.

A escolha adequada da estrutura cristalográfica da proteína HSA deve ainda apresentar uma boa resolução, no máximo até 3,5 Å, pois de acordo com os trabalhos de Liu *et al.* (2017), Nozawa *et al.* (2017), Schulte *et al.* (2017) e Wlodawer *et al.* (2017), relatam que as resoluções baixas, em torno de até 3,3 - 3,5 Å das proteínas, ocasiona bons resultados.

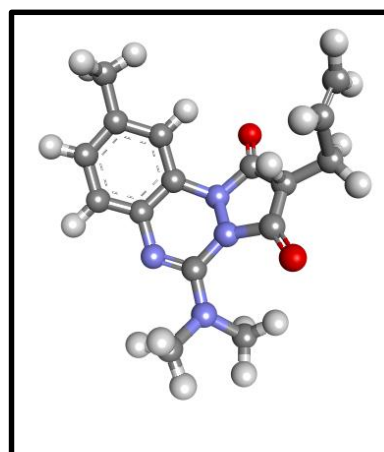
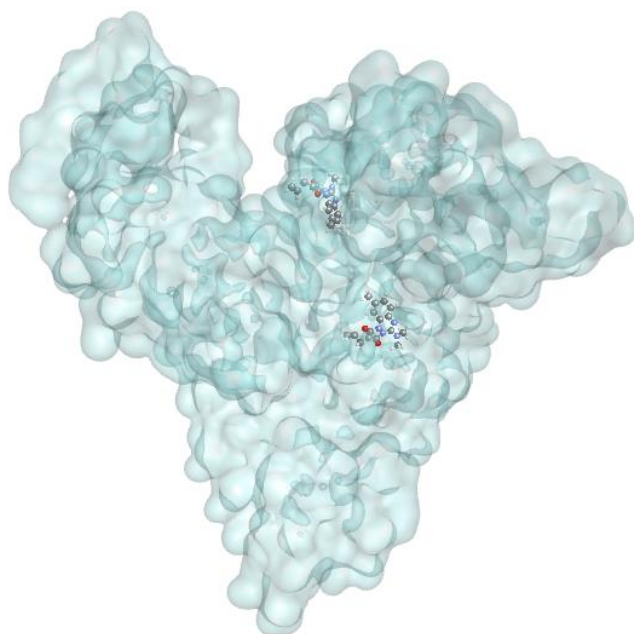
Tabela 8. Códigos de PDBs com a localização dos ligantes e valor de resolução.

PDB	LIGANTE	Resolução (Å)	Sítio	Sítio	Sítio	Sítio	Sítio	Sítio	
			FA2	FA1	Sudlow I	FA6	Sudlow II	FA5	FA9
			IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	FENDA
2VUE	Bilirrubina	2,42		+					
1N5U	Hemina	1,90		+					
2BXE	Diflunisal	2,95			+	+	+		
2BX8	Azapropazona	2,70		+	+				
2BXF	Diazepam	2,95					+		
2BXI	Azapropazona	2,50		+	+				
2VUF	Ácido Fusídico	3,05		+				+	
2BXD	Varfarina	3,05			+				
4LB9	Etoposídeo	2,70			+				
1E7A	Propofol	2,20					+	+	
1O9X	Hemina	3,20		+					
2BXM	Indometacina	2,50		+	+				
1HK4	Tiroxina	2,40							+
2VDB	Naproxeno (S)	2,52		+					
4L8U	9-amino camptotecina	2,01		+					
4LB2	Idarubicina	2,80		++					

Da Tabela 8 foram escolhidas duas estruturas cristalográficas da proteína HSA, devido que não há um único código de PDB que apresentasse as estruturas do ligante em todos os sítios ativos que foram estudados. Também levou-se em conta a não presença de ácidos graxos em sua estrutura, pois desse modo, eliminaria a possível influência deste nos estudos de *docking* molecular. Portanto, a escolha se deu pelos códigos PDB 2BX8 e PDB 2BXE.

O PDB 2BX8 (Figura 35a) é uma estrutura cristalográfica da HSA, com uma resolução de 2,70 Å, e possui as estruturas moleculares de Azapropazona aos sítios ativos FA1 e Sudlow I. Já o PDB 2BXE (Figura 35b) também é uma estrutura cristalográfica da HSA, porém há estruturas de Diflunisal aos sítios Sudlow I, Sudlow II e FA6.

a)



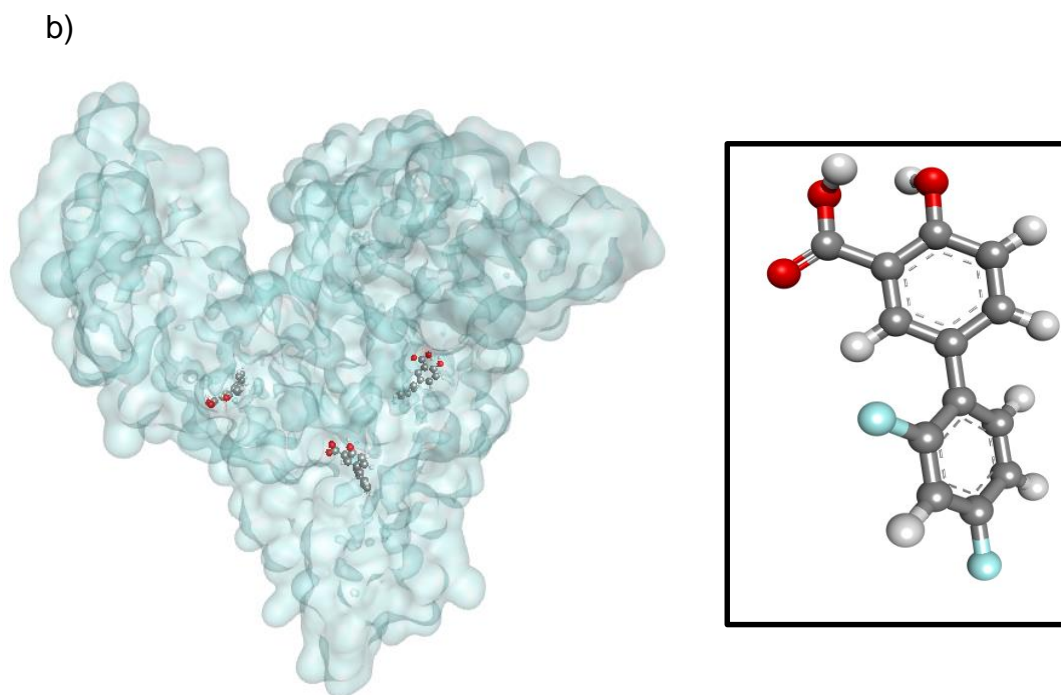


Figura 35. Estruturas cristalográfica da proteína HSA obtidas no PDB. a) PDB 2BX8 e a representação da Azapropazona. b) PDB 2BXE e a representação do Diflunisal.

Como são estruturas de diferentes PDBs, há a necessidade de realizar estudos para certificar se estas são semelhantes, desse modo, realizou-se os cálculos da raiz quadrática do desvio médio (RMSD). Para realizar esse cálculo foi necessário o manuseio do software Chimera 1.15, e assim determinou que as estruturas são semelhantes, pois apresentaram um baixo valor de RMSD de 0,752. Pois de acordo com os trabalhos de Kufareva *et al.* (2012) e Si *et al.*, (2020) o método de RMSD utiliza um mapeamento das estruturas das proteínas, calculando assim, o seu respectivo valor percentual de equivalência, e esta, quando apresenta um valor baixo, em torno de até 3,0 Å, é considerado homólogas.

Para certificar melhor sobre a semelhança das estruturas, a Figura 36 nos revela que há a sobreposição dos PDBs, e podemos ainda verificar essa semelhança na Figura S4, na qual representa o alinhamento das sequencias dos aminoácidos presentes nas estruturas.

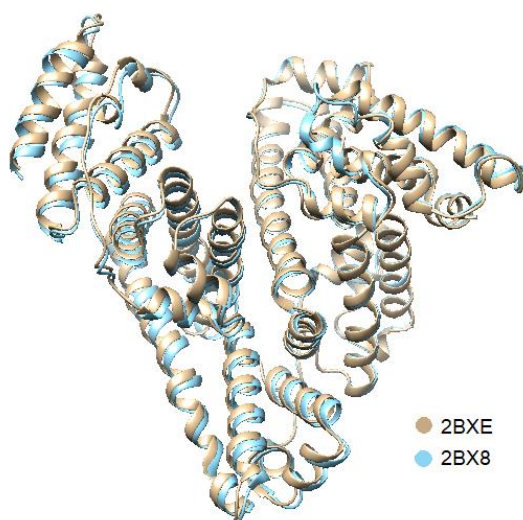


Figura 36. Sobreposição das estruturas PDB 2BX8 e PDB 2BXE realizadas no software Chimera.

Primeiramente as análises foram realizadas utilizando o PDB 2BX8, assim, os resultados de *docking* molecular para essa estrutura serão aos sítios de Sudlow I e também ao FA1. Em seguida, realizou os estudos envolvendo o PDB 2BXE, na qual são as análises dos resultados obtidos aos sítios Sudlow II e FA6.

5.1.3.2 Sítio Sudlow I

Os estudos de *docking* molecular para o sítio Sudlow I foi utilizado o PDB 2BX8, e verificou que as melhores condições para o estudo foram com o raio de 6,0 Å, não havendo a necessidade de alterar os aminoácidos da cadeia lateral no processo de flexibilizar, protonar ou rotacionar (Figura 37). A formação desse complexo obteve um valor energético de $-52,13 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

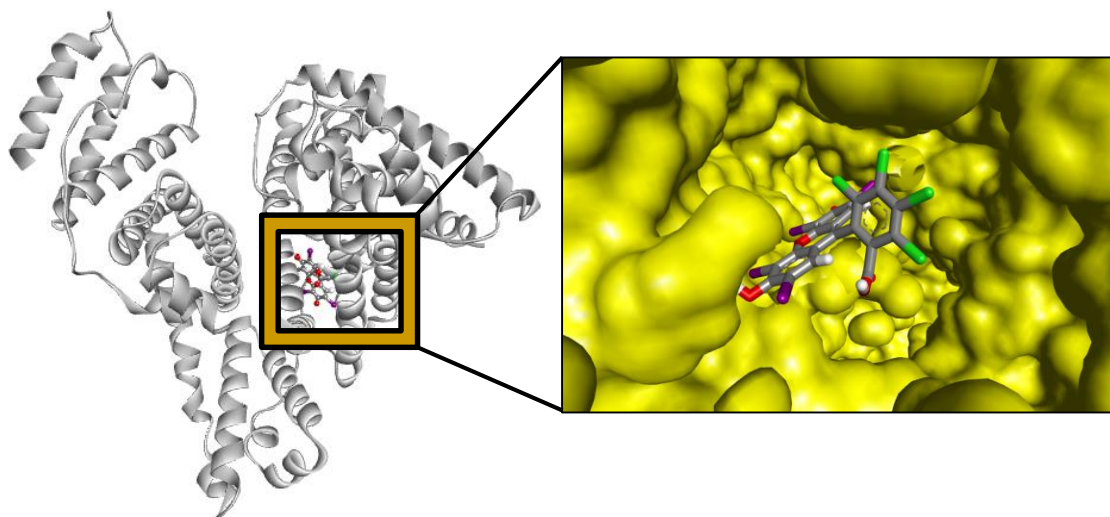


Figura 37. Confômero RB obtido nos estudos de *docking* molecular no sítio Sudlow I da proteína HSA.

Os estudos para analisar as possíveis interações que possam estar ocorrendo entre o confômero RB à proteína HSA, foi realizado no software DS. Na Figura 38 verificamos que há apenas duas interações do tipo ligação de hidrogênio tendo o átomo de oxigênio (O3) do RB interagindo com o átomo de hidrogênio do aminoácido lisina 199, possuindo um distanciamento de 2,21 Å. A segunda interação está entre o átomo de hidrogênio (H1) do corante ao átomo oxigênio (OE2) do aminoácido ácido glutâmico 292, e esta interação possui um distanciamento de 1,86 Å. E ainda há 2 interações do tipo π : His242–RB:Cl33 (2.79 Å), Ala291:HB–RB (2.28 Å).

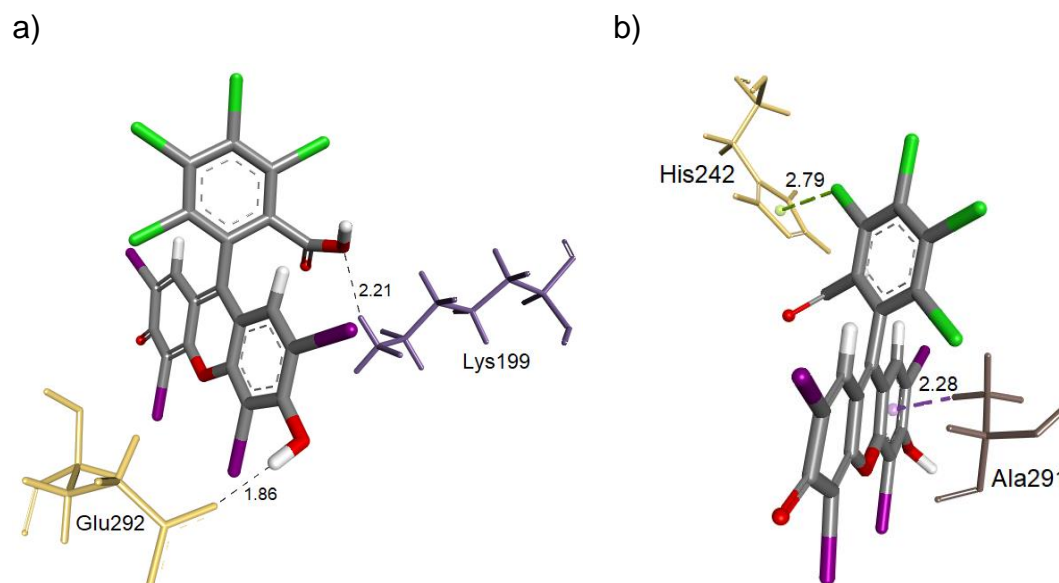


Figura 38. Mapa de interação do conformero RB ao sítio Sudlow I da proteína HSA, com distanciamento em Å. a) Interação LH, b) Interações π .

E em seguida, verificou se as interações encontradas pela análise com o software DS possuem características atrativas ou repulsivas. Então recorreu para os resultados gerados pelo software NCI, e estes foram analisados no software Visual Molecular Dynamics (VMD).

Na Figura 39 podemos observar que há interações com os aminoácidos lisina 199, ácido glutâmico 292 e alanina 291, indicando que o corante possui afinidade a essa região. Sendo que este é um local formado por resíduos polares da subcâmara hidrofóbica Ic, localizada na entrada do sítio (GHUMAN *et al.*, 2005; YAMASAKI *et al.*, 1996).

Os resultados do NCIplot nos mostram que as interações encontradas pelo software DS, nem todas são interações que possam ocasionar a formação do complexo, pois algumas delas não são classificadas como atrativas, e sim em interações com caráter neutro, na qual possuem as forças atrativas e repulsivas em equilíbrio.

Na Figura 39 observamos que há apenas três interações para a formação do complexo, sendo duas interações LH e uma interação π . A primeira interação de LH ocorre entre o corante a lisina 199 (2,21 Å), a segunda ocorre com o aminoácido ácido glutâmico 292 (1,86 Å). A outra interação é do tipo π com o aminoácido alanina 291 (2,01 Å).

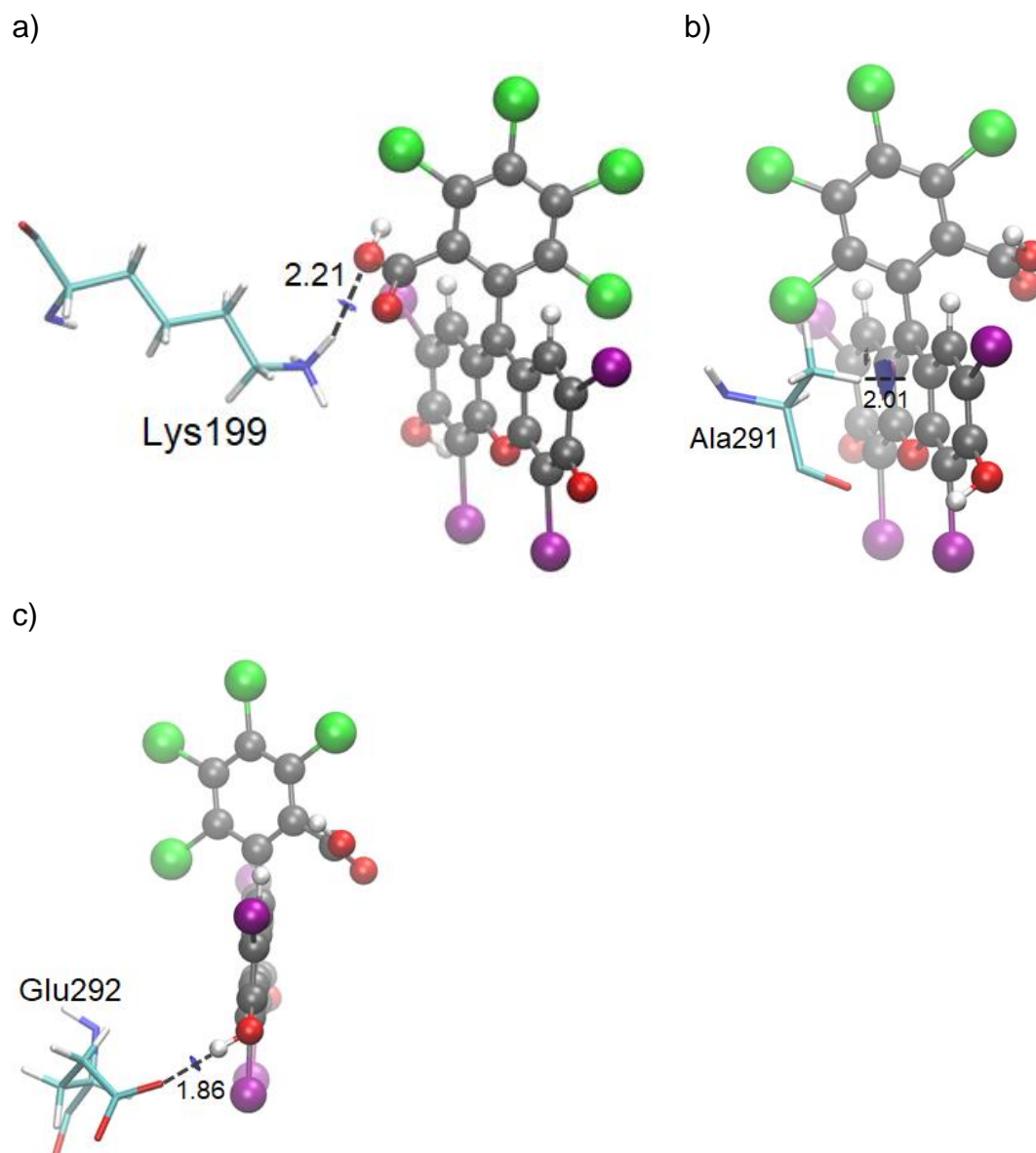


Figura 39. Resultados do NCIplot da interação entre o RB aos aminoácidos do sítio Sudlow I obtidos pelo estudo de *docking* molecular no software GOLD, com distanciamento em Å. a) Ácido glutâmico 292. b) Alanina 291.

5.1.3.3 Sítio FA1

A análise dos resultados das poses e seus respectivos valores energéticos para o sítio FA1 (sítio III de fármaco), verificou que as melhores condições de estudo foram: raio de 5,0 Å sob o ligante, não havendo a necessidade de realizar nenhuma alteração nos aminoácidos da cadeia lateral. E o confômero resultante desse estudo possui um valor energético de $-58,79 \text{ kJ.mol}^{-1}$, um valor próximo ao obtido no estudo do sítio Sudlow I (**Figura 40**).

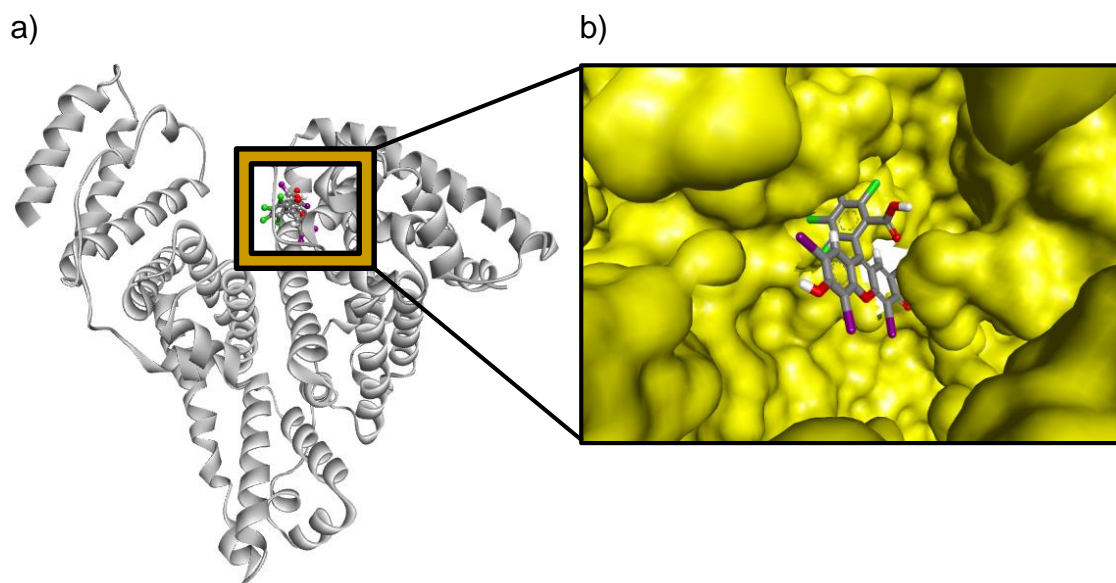


Figura 40. Confômero RB obtido nos estudos de *docking* molecular no sítio FA1 da proteína HSA.

Com a Figura 41 podemos analisar que o corante RB possui apenas uma interação do tipo ligação de hidrogênio, entre o átomo de oxigênio (O4) da estrutura do corante ao átomo de hidrogênio (HH12) do aminoácido arginina 117, e esta possui um comprimento de 2,11 Å. Podemos ainda identificar 4 interações de vdw: Tyr138:HH–RB:I4 (2.48 Å), Arg145:HD1–RB:Cl33 (2.50 Å), Arg186:O–RB:Cl36 (3.15 Å), Ser193:HB2–RB:I3 (3.01 Å). E por fim podemos verificar que há ainda duas interações do tipo π com o aminoácido arginina 186 aos anéis aromáticos do corante RB, e estas apresentam um distanciamento de 3,57Å e 3,48Å. Ao comparar esse resultado ao sítio Sudlow I, percebemos que houve um decréscimo da quantidade dessa interação, isso acontece devido ao fator desse sítio ser relativamente aberto (BHATTACHARYA, *et al.*, 2000).

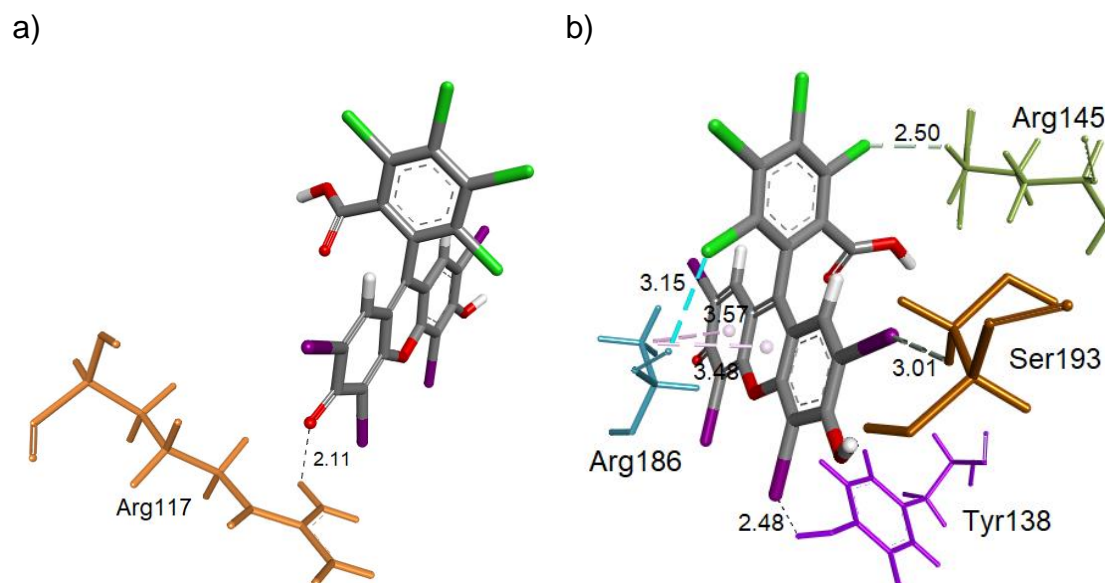


Figura 41. Mapa de interação do confômero RB ao sítio FA1 da proteína HSA, com distanciamento em Å. a) Interação LH, b) Interações vdw e π .

As interações encontradas pelo software DS foram analisadas quanto a seu caráter atrativo ou repulsivo, desse modo, recorreu aos estudos com o software NCIPLOT.

Na Figura 42 observamos que a quantidade de interações encontradas foram distintas em relação às encontradas pelo estudo anterior. Assim, pôde-se verificar que há três interações de LH com os aminoácidos arginina 117 (2,12 Å), arginina 145 (2,07 Å) e arginina 186 (2,26 Å). Na Arg117 ocorre a interação com o átomo oxigênio (O1) do RB ao átomo de hidrogênio do aminoácido. Para a Arg145, verificamos que a interação de LH ocorre entre o átomo de oxigênio (O5) do corante ao átomo de hidrogênio do arginina. E a última interação de LH ocorre entre o átomo hidrogênio do aminoácido ao átomo de oxigênio (O2) do confômero.

Na mesma Figura 42 podemos ainda observar as interações de vdw que estão ocorrendo com as Arg117 (2,88 Å), Tyr138 (2,62 Å), Arg145 (2,50 Å) e Arg186 (2,38 Å). Na arginina 117 a interação ocorre entre o átomo de iodo (I1) do corante ao átomo de hidrogênio do aminoácido. Na tirosina 138, observamos que a interação ocorre entre o átomo de iodo (I5) do RB ao átomo de hidrogênio da Tyr138. A outra interação ocorre entre o átomo de cloro (Cl1) do ligante ao

átomo de hidrogênio da arginina 145. A última interação de vdw é entre o átomo de cloro (Cl4) do corante Rb ao átomo de hidrogênio da Arg186.

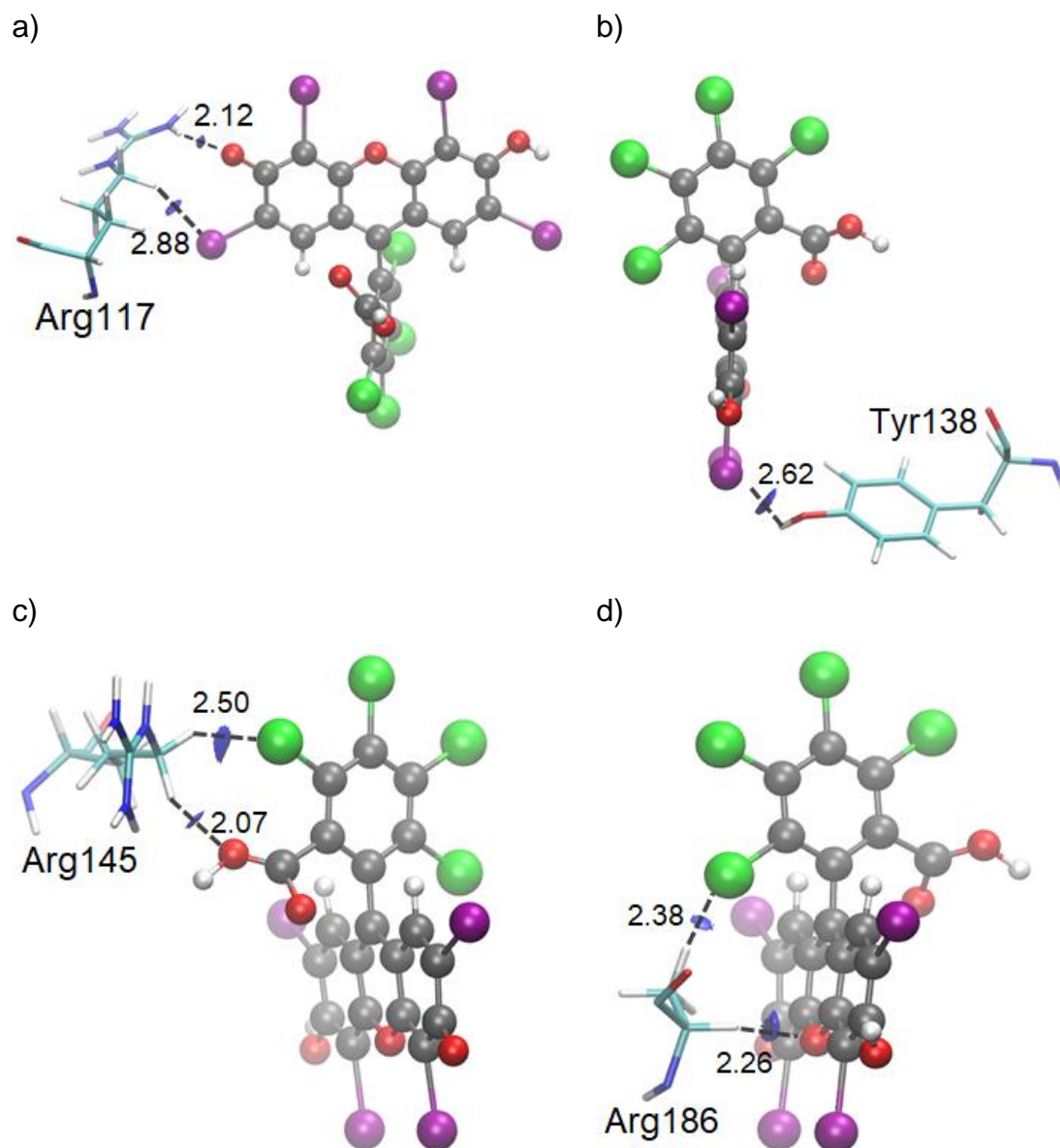


Figura 42. Resultados do NCIplot da interação entre o RB aos aminoácidos do sítio FA1 obtidos pelo estudo de *docking* molecular no software GOLD, com distanciamento em Å. a) Arginina 117. b) Tirocina 138. c) Arginina 145. d) Arginina 186.

5.1.3.4 Sítio Sudlow II

Os estudos de *docking* molecular ao sítio Sudlow II da proteína HSA, obtiveram resultados nada satisfatórios, mesmo realizando as alterações dos prováveis aminoácidos pertencentes às cadeias laterais. Sendo assim,

observamos que as análises dos valores energéticos obtiveram uma variação discrepante entre o maior e o menor valor de energia (

Tabela 9), ocasionando provavelmente um deslocamento da estrutura na região de interação ou então uma variação bem significativa do diedro das estruturas.

Tabela 9. Valores energéticos das dez melhores estruturas de RB obtidas nos estudos de *docking* molecular.

Estrutura (n°)	Energia (kcal.mol ⁻¹)
9	42.88
5	35.41
4	35.20
10	32.45
1	30.54
6	29.76
2	19.88
3	6.63
8	0.52
7	-0.96

Na Figura 43 podemos verificar que a estrutura do corante RB está interagindo na região do sítio Sudlow II, localizado no subdomínio IIIA, porém as poses obtidas nos estudos de *docking* molecular, não apresentam uma semelhança, ocasionando uma variação na coordenação geométrica (x, y e z).

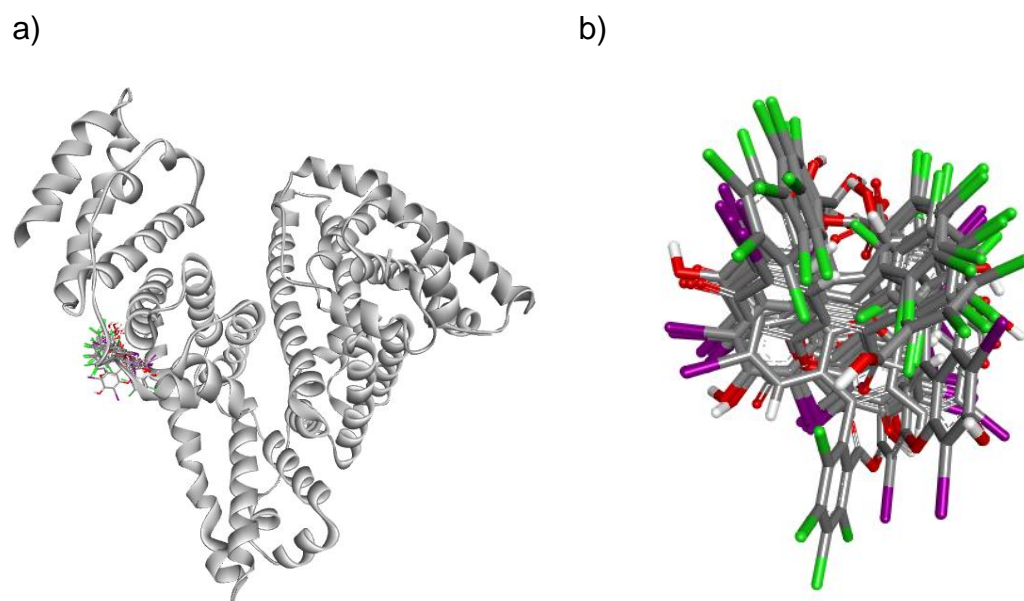


Figura 43. Resultados de *docking* do corante RB ao sítio Sudlow II da proteína HSA. a) Confôrmeros de RB na proteína HSA. b) Poses dos confôrmeros de RB obtidas nos estudos de *docking* molecular.

Como as geometrias obtidas no *docking* molecular apresentaram ser bem diferentes visualmente, realizou então os cálculos dos valores de RMSD no software DS, utilizando como base de referência, o confôrmero de menor energia (Estrutura 4). Observou na Tabela 10, que os valores estão altos, indicando que os confôrmeros não são semelhantes. Para comprovar ainda que os confôrmeros apresentam conformações estruturais diferentes, realizou os cálculos do diedro de cada composto no software DS, sendo assim, na mesma tabela observamos que esses valores são bem distintos entre eles, justificando mais uma vez que os confôrmeros obtidos são distintos.

Tabela 10. Valores de RMSD e Diedro dos resultados obtidos nos estudos de *docking* molecular das estruturas de RB.

Estrutura (n°)	RMSD	Diedro (°)
3	5,7739	+63,33
9	5,8273	-98,88
8	5,2844	-99,87
7	5,2525	+83,21
10	5,7699	+75,70
2	2,6011	+71,90
6	5,7811	-104,61
5	5,7133	+72,93
1	0,5951	-98,95
4	-	+73,06

De acordo com os resultados analisados para o sítio Sudlow II, podemos concluir que o corante RB não possui afinidade a essa região, pois não se obteve uma coerência dos resultados energéticos e das imagens estruturais do ligante. A justificativa para os resultados obtidos está relacionada ao fato do PDB 2BXI possui um grupo ácido graxo de menor volume que o RB, complexado ao sítio de Sudlow II. Sendo assim, realizou-se o estudo de *docking* molecular comparativo, portanto com o auxílio da Tabela 8 escolheu outra proteína cristalográfica.

O PDB escolhido para realizar esse estudo comparativo foi o 2BXF, na qual possui a molécula de Diazepam no sítio Sudlow II da proteína HSA. A escolha desse PDB para realizar o estudo comparativo ao sítio Sudlow II se deve a alguns fatores como: apresentar uma resolução próxima dos PDBs utilizados anteriormente (2,5 Å); e também as dimensões da estrutura do ligante ser um pouco maior que o Diflunisal, mas ainda é um pouco menor que a estrutura do corante RB.

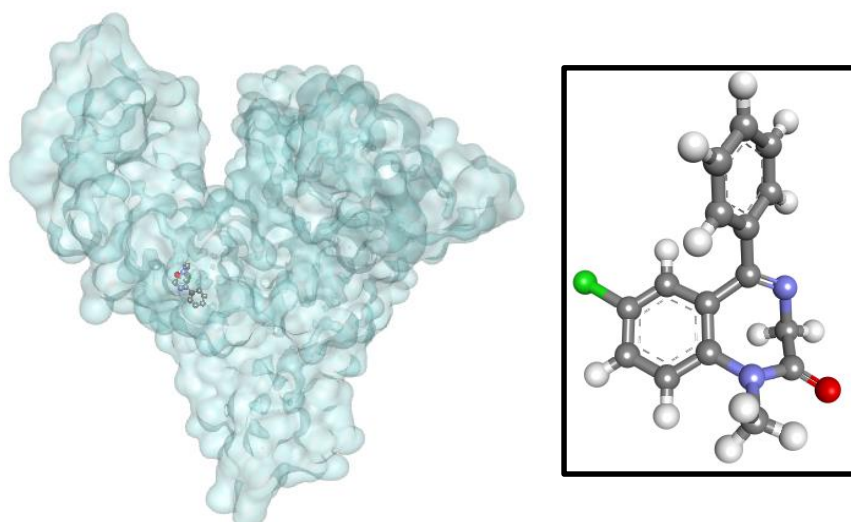


Figura 44. Representação da estrutura cristalográfica da proteína HSA obtidas no PDB de código 2BXF, e a representação do ligante Diazepam.

Verificou se as estruturas são semelhantes, assim, realizou os estudos de RMSD. Inicialmente realizou a sobreposição das estruturas cristalográficas de HSA (PDB 2BXE e PDB 2BXF) no software Chimera (Figura 45), e depois, no mesmo software, obteve o resultado do cálculo de RMSD em 0,772 Å. O valor de RMSD indica que as duas estruturas são semelhantes, como também podemos comprovar com o alinhamento das sequências dos aminoácidos presentes nas estruturas (Figura S7). Portanto, podê-se realizar os estudos de *docking* molecular com a estrutura PDB 2BXF e comparar com os resultados obtidos ao PDB 2BXE.

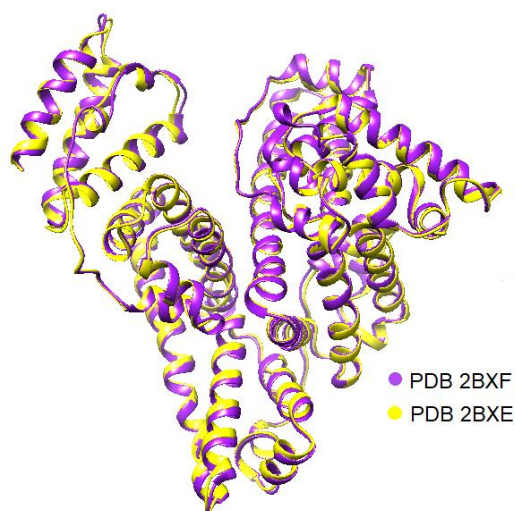


Figura 45. Sobreposição das estruturas HSA do PDB 2BXE ao PDB 2BXF.

Os resultados dos estudos de *docking* para essa proteína cristalográfica apresentou o mesmo comportamento dos estudos com o PDB 2BXE, havendo desse modo a mesma discrepância na variação dos valores energéticos, na qual podemos observar na Tabela 11.

Tabela 11. Valores energéticos das dez melhores estruturas de RB obtidas nos estudos de *docking* molecular para a estrutura PDB 2BXF.

Estruturas (n°)	Energia (kcal.mol⁻¹)
7	57,84
10	55,82
9	28,25
1	27,95
6	17,18
3	0
4	0
8	-15,04
5	-64,08
2	-74,17

Na Figura 46 observamos que os resultados obtidos da estrutura RB no *docking* molecular ficaram parecidos com as imagens analisadas nos estudos com o PDB 2BXE. Sendo assim, com as análises de todos os resultados, tanto para o 2BXE como 2BXF, podemos concluir que o corante RB de fato não possui afinidade ao sítio Sudlow II da proteína HSA. Pois de acordo com os resultados da *docking* molecular, este não conseguiu obter as condições desejáveis para podermos interpretar essa possível afinidade.

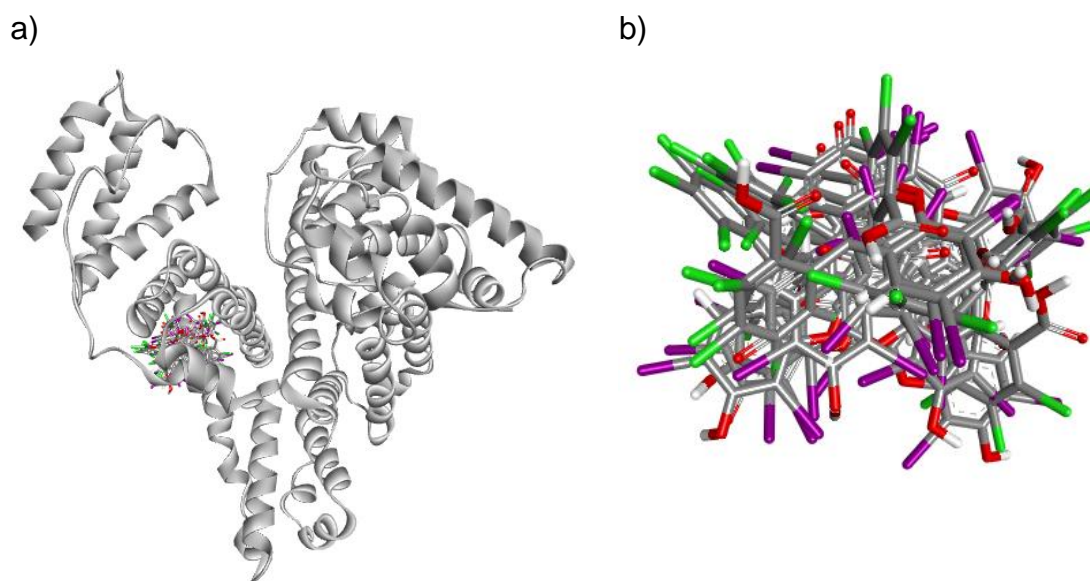


Figura 46. Resultados de *docking* do corante RB ao sítio Sudlow II da proteína HSA, utilizando o PDB 2BXF. a) Confôrmeros de RB na proteína HSA. b) Poses dos confôrmeros de RB obtidas nos estudos de *docking* molecular.

Os resultados obtidos para o sítio Sudlow II são bem diferentes dos obtidos do sítio Sudlow I, pois ao comparar as duas regiões é perceptível que os sítios possuem volumes diferentes, sendo que na região de interação do subdomínio IIIA é menor que o do subdomínio IIA. Sendo assim, esse sítio possui algumas propriedades que dificultam que o corante RB possa se interagir a ele, como possuir a principal região de interação no centro desse sítio, considerada como uma subcâmara hidrofóbica de difícil acesso, pois há a necessidade das cadeias laterais se movimentarem para que o ligante tenha acesso a essa região. Porém esse sítio possui ainda uma região polar na sua entrada, localizado próximos aos aminoácidos Tyr411, Arg410, Lys414 e Ser489 (GHUMAN *et al.*, 2005).

5.1.3.5 Sítio FA6

Os estudos de *docking* molecular para esse sítio, foram utilizados os seguintes parâmetros: raio de interação 10 Å sob o ligante, e houve a necessidade de realizar a flexibilização dos aminoácidos arginina 209, ácido glutâmico 354, e asparagina 483.

Com as análises dos resultados das poses (Figura 47) e seus respectivos valores energéticos, verificou que o melhor confômero para esse sítio de ligação apresenta um valor energético de $-67,55 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

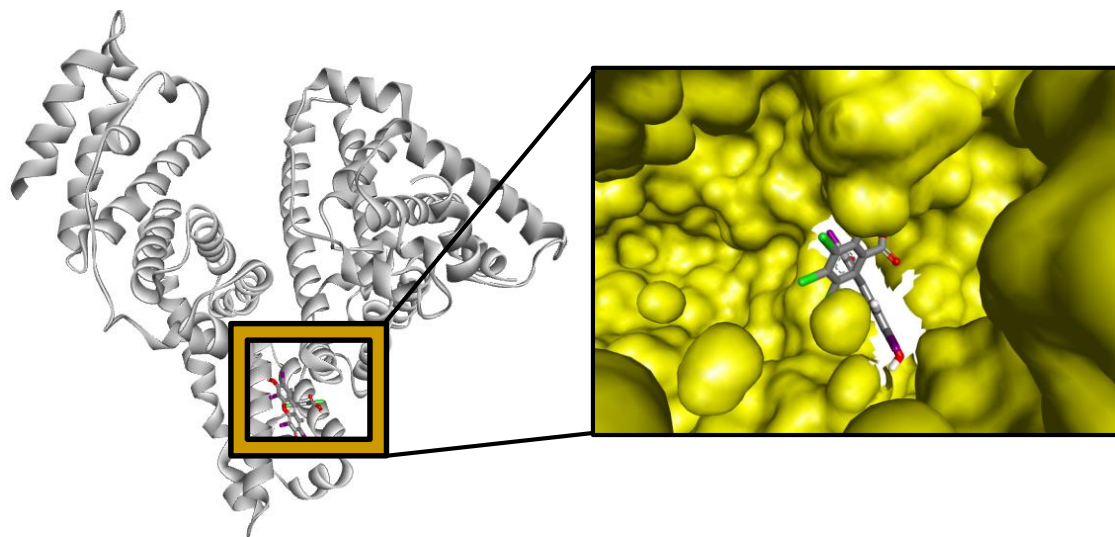


Figura 47. Confômero RB obtido nos estudos de *docking* molecular no sítio FA6 da proteína HSA.

Os estudos para analisar as possíveis interações que possam estar ocorrendo entre o confômero RB à proteína HSA, foi realizado no software DS. Na Figura 48. Mapa de interação do confômero RB ao sítio FA6 da proteína HSA, com distanciamento em Å. a) Interação LH, e interação entre o átomo de hidrogênio ao átomo iodo, b) Interações π .

a verificamos que há 3 interações do tipo ligação de hidrogênio, sendo que uma ocorre entre o átomo de oxigênio (O2) do RB ao átomo hidrogênio (HE) do aminoácido arginina 209, e este possui um distanciamento de $1,48 \text{ \AA}$. A segunda interação está entre o átomo de oxigênio (O1) do corante ao átomo hidrogênio (HZ1) do aminoácido lisina 351, e esta interação possui um distanciamento de $1,58 \text{ \AA}$. A terceira interação encontramos entre o átomo hidrogênio (H49) do corante ao átomo oxigênio (OD2) da asparagina 324, e este apresenta um distanciamento de $1,97 \text{ \AA}$. Há também uma interação entre o átomo de iodo (I2), pertencente à estrutura do RB, ao átomo de hidrogênio (HH1) do aminoácido arginina 209, com um distanciamento de $2,40 \text{ \AA}$.

Na Figura 48b ainda podemos visualizar que há ainda 2 outras interações, sendo que o aminoácido lisina 351 realiza duas interações π com o corante RB, e estes apresentam um distanciamento de $2,78 \text{ \AA}$ e $2,41 \text{ \AA}$.

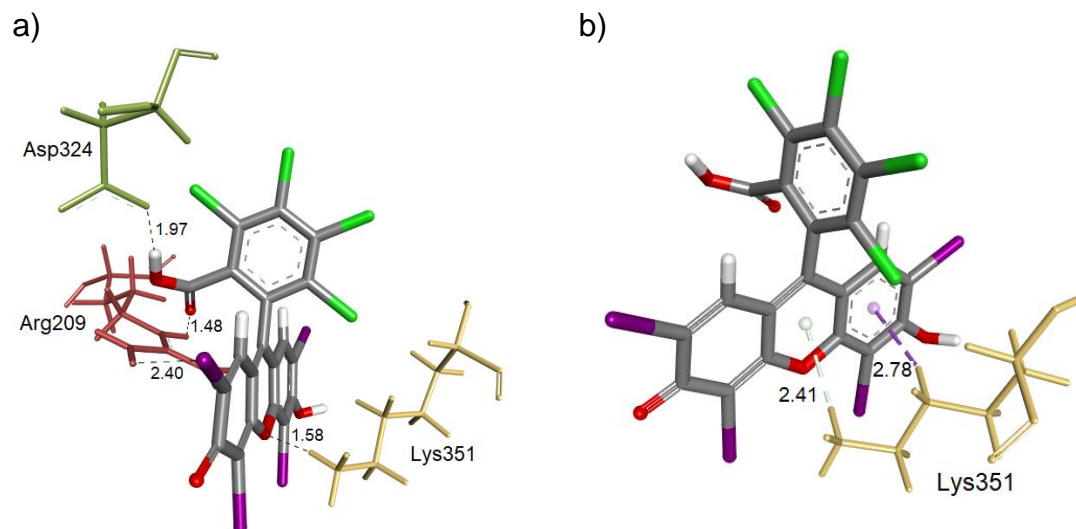


Figura 48. Mapa de interação do confôrmero RB ao sítio FA6 da proteína HSA, com distanciamento em Å. a) Interação LH, e interação entre o átomo de hidrogênio ao átomo iodo, b) Interações π .

Os estudos com o software NCIplot podemos averiguar se as interações encontradas pelo software DS são atrativas ou repulsivas. Desse modo, realizou uma comparação das interações que estão ocorrendo na Figura 48 e na Figura 49, e percebemos que há uma diferença entre elas, especialmente quando se trata das interações de LH.

Nos estudos das interações de LH no software DS mostra que está ocorrendo uma interação entre o corante ao aminoácido arginina 209, porém quando se analisa essa interação no software NCIplot, observa-se que esta não era atrativa, portanto esse aminoácido não auxilia para a formação do complexo. Já a asparagina 324 e lisina 351 são aminoácidos que auxiliam na interação entre RB à HSA, pois estes possuem as interações atrativas.

A Figura 49 Figura 49. Resultados do NCIplot da interação entre o RB aos aminoácidos do sítio FA6 obtidos pelo estudo de *docking* molecular no software GOLD, com distanciamento em Å. a) Asparagina 324. b) Lisina 351.

b consta a outra interação que o aminoácido lisina 351 faz no sítio de ligação FA6, sendo esta uma interação do tipo de vdw, que está ocorrendo entre o átomo

de cloro (Cl4) da estrutura do corante ao átomo de hidrogênio do aminoácido Lys351.

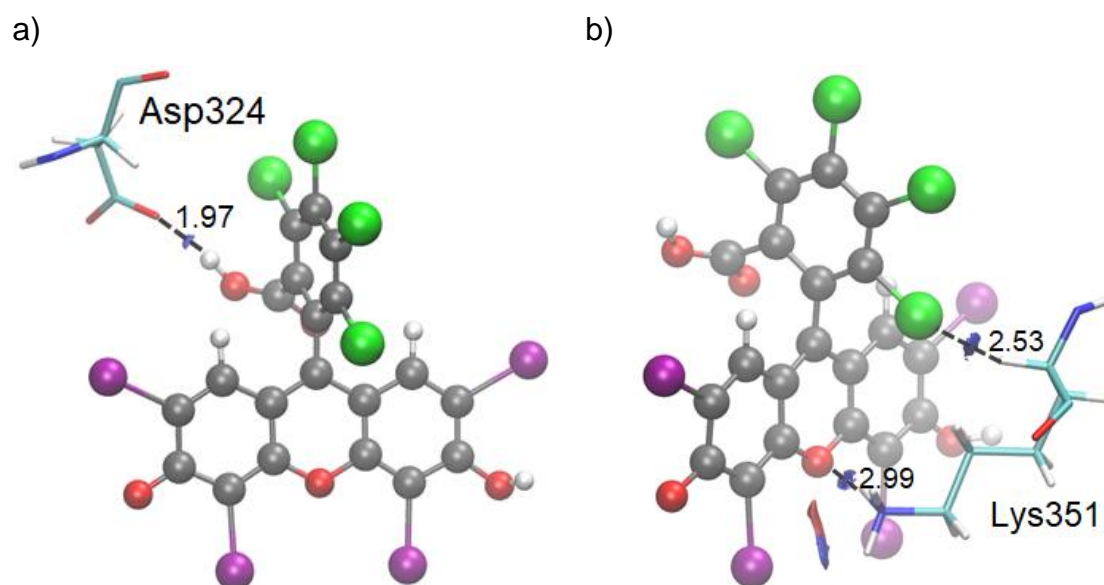


Figura 49. Resultados do NCiplot da interação entre o RB aos aminoácidos do sítio FA6 obtidos pelo estudo de *docking* molecular no software GOLD, com distanciamento em Å. a) Asparagina 324. b) Lisina 351.

5.1.4 Comparando os resultados de *docking* molecular

Os resultados realizados tanto no software Autodock como no GOLD podemos observar que o corante RB interage à proteína HSA. E com o auxílio das Tabela 12 e Tabela 13 observamos que o sítio FA6 é considerado uma região preferencial à formação do complexo, devido ao seu menor valor energético correspondente ao seu confômero. Nos estudos com o software Autodock, obteve-se um valor energético de $-3,25 \text{ kcal.mol}^{-1}$, e com o auxílio do software GOLD, o valor energético para esse sítio de ligação foi de $-67,55 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Os valores energéticos obtidos nos estudos de *docking* molecular para os sítios Sudlow I e FA1, apresentam um comportamento divergente quando

comparamos os resultados obtidos pelos diferentes softwares. No software Autodock podemos observar que a diferença energética dos confôrmeros é bem pequena, em torno de 0,08 kcal.mol⁻¹, indicando que não há um sítio preferencial (em relação ao Sudlow I e FA1) à formação do complexo.

No software GOLD podemos observar que a diferença energética é mais significativa, em torno de 6,66 kcal.mol⁻¹, entre esses dois sítios ativos, ocasionando desse modo, uma preferência do corante RB ao sítio FA1 (-58,79 kcal.mol⁻¹) que ao Sudlow I (-52,13 kcal.mol⁻¹).

Tabela 12. Resultados obtidos nos estudos de *docking* molecular utilizando o software Autodock e NCIplot.

Sítio	Energia (Kcal.mol ⁻¹)		Interações
Sudlow I	-2,34	L.H	Lys195 (1,77Å)
FA1	-2,26	L.H	Arg114 (1,88Å)
		vdw	Arg117 (1,93Å)
FA6	-3,25	L.H	Glu208 (2,28Å)

Tabela 13. Resultados obtidos nos estudos de *docking* molecular utilizando o software GOLD e NCIplot.

Sítio	Raio (Å)	Energia (kcal.mol ⁻¹)		Interações
Sudlow I	6	-52,13	L.H	Lys199 (2,21Å); Glu292 (1,86Å)
			vdw	Ala291 (2,01Å)
FA1	5	-58,79	L.H	Arg117 (2,12Å); Arg145 (2,07Å); Arg186 (2,26Å)
			vdw	Arg117 (2,28Å); Tyr138 (2,62Å); Arg145 (2,50Å); Arg186 (3,15Å)
FA6	10 (flex)	-67,55	L.H	Asp324 (1,97Å); Lys351 (2,99Å);
			vdw	Lys351 (2,53Å)

Nas tabelas mostram também as interações que cada conformero faz no sítio de ligação, porém, podemos observar que as interações não são semelhantes nos estudos de *docking* molecular referentes as duas metodologias. Então averiguou e comparou as conformações das poses obtidas em cada sítio de ligação.

5.1.4.1 Sítio Sudlow I

No sítio Sudlow I os confômeros obtidos tanto no software Autodock como Gold possuem uma semelhança na estrutura dos anéis xantêmicos, e também uma diferença no anel benzênico, como podemos observar na Figura 50. Realizei o cálculo de RMSD para certificar e reafirmar a simetria desses confômeros. Sendo que esse estudo foi realizado no software DS ao invés do software Chimera, pois o software Chimera não conseguia calcular o valor de RMSD devido a estrutura do corante RB ser pequena. Portanto, o valor calculado é de 1,219 Å, indicando que há uma semelhança entre as estruturas.

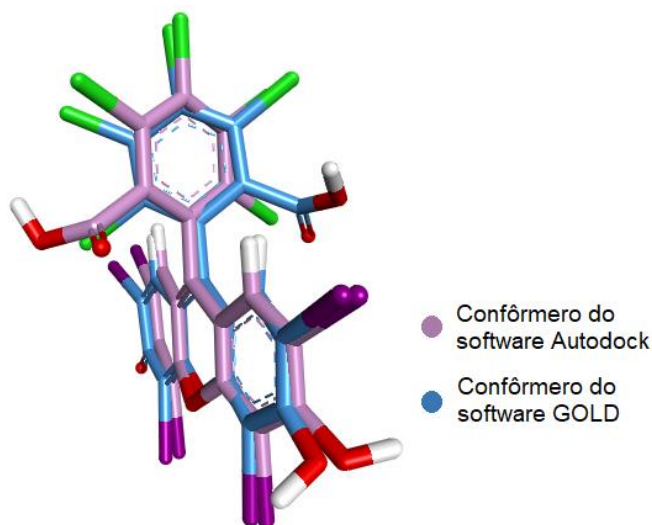


Figura 50. Estruturas dos confômeros obtidos nos estudos de *docking* molecular ao sítio Sudlow I pelos softwares Autodock (roxo) e GOLD (azul).

Na Figura 51 nos mostra que as estruturas do confômero RB estão em localizações diferentes no sítio Sudlow I. Porém se recorremos as Figura S1 e Figura S5 podemos observar que as coordenadas estão diferentes, porém não podemos realizar essa comparação, devido que as coordenadas da proteína como um todo são diferentes, devido que os PDBs são diferentes, ocasionando

assim uma impossibilidade em comparar as coordenadas dos confôrmeros adequadamente.

Como as coordenadas obtidas de cada confôrmero impossibilidade realizar um estudo adequado, recorreremos as análises visualmente das poses das estruturas de RB. Podemos observar que a estrutura obtida nos estudos com o software Autodock está numa posição bem próxima a entrada do sítio Sudlow I, uma região considerada polar, classificada como Ic. Essa região está localizada a frente do sítio Sudlow I, entre os aminoácidos lisina 199, fenilalanina 211, triptofano 214, alanina 215, arginina 218 e leucina 238 (ABBOUD *et al.*, 2017; GHUMAN *et al.*, 2005).

Já o confôrmero obtido pelo software GOLD, está localizado numa região um pouco mais interna, porém ainda continua na mesma região hidrofóbica no sítio de ligação, localizada na subcâmara Ic. Ocasionalmente desse modo os diferentes aminoácidos quando fazemos as análises de interação entre o corante à HSA, como demonstrado nas Tabela 12 e Tabela 13.

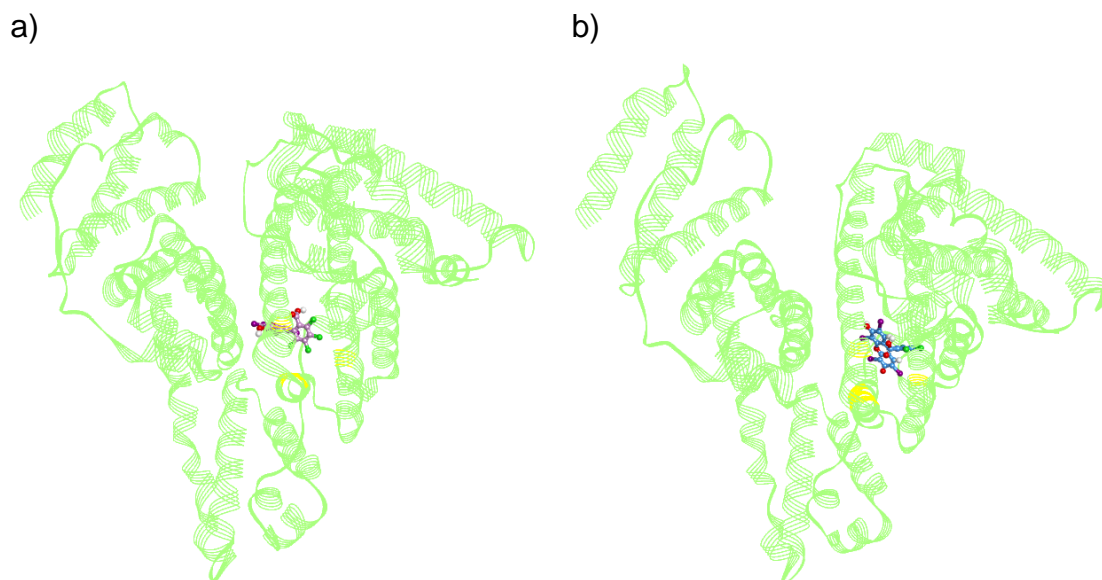


Figura 51. Confôrmeros obtidos nos estudos de *docking* molecular no sítio Sudlow I da proteína HSA, e a localização dos aminoácidos (amarelo): Lys199, Phe211, Trp214, Ala215, Arg218 e Leu238. a) softwares Autodock (roxo). b) software GOLD (azul).

5.1.4.2 Sítio Sudlow II

Os estudos de *docking* molecular para essa região de Sudlow II, tanto para com o software Autodock como no GOLD, obtiveram os mesmos resultados. Indicando que a esse sítio de ligação o corante RB possui baixa afinidade.

Essa afirmação se deve ao fato das análises dos valores energéticos e das poses obtidas nos estudos de *docking* molecular. Nos resultados energéticos correspondentes aos confôrmeros, pode-se verificar que estes estão variando com uma grande escala. Já em relação as poses, estes estão bem distribuídos no sítio de ligação, ocasionando assim a dispersão dos confôrmeros no subdomínio IIIA.

5.1.4.3 Sítio FA1

Na Figura 52 observamos que as estruturas dos confôrmeros estão semelhantes, tanto nos anéis xantêmicos como no anel benzênico. Mesmo por apresentar essa semelhança visual, realizou a análise por RMSD, e a este cálculo obteve-se um valor de 1,042, indicando então que estes confôrmeros apresentam uma semelhança.

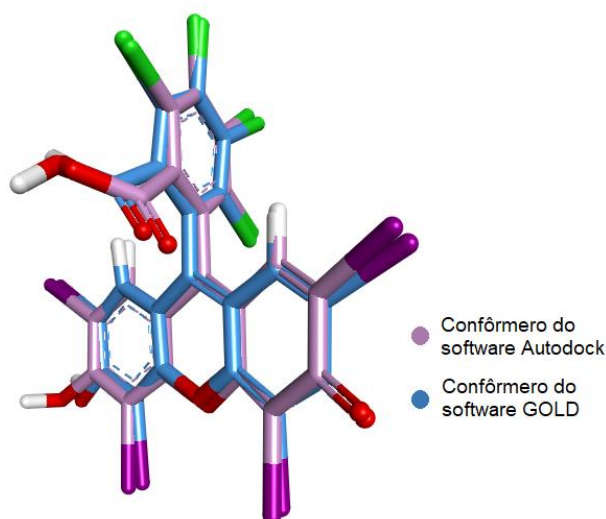


Figura 52. Estruturas dos confôrmeros obtidos nos estudos de *docking* molecular ao sítio FA1 pelos softwares Autodock (roxo) e GOLD (azul).

Quando realizamos as análises visualmente da pose dos confôrmeros obtidos nos dois softwares, observamos que as estruturas de RB interagem na HSA em regiões semelhantes, localizada na entrada do sítio FA1. Porém os

confôrmeros não apresentam a mesma as mesmas interações como visto anteriormente, devido que as estruturas obtidas nos softwares estão posições invertidas.

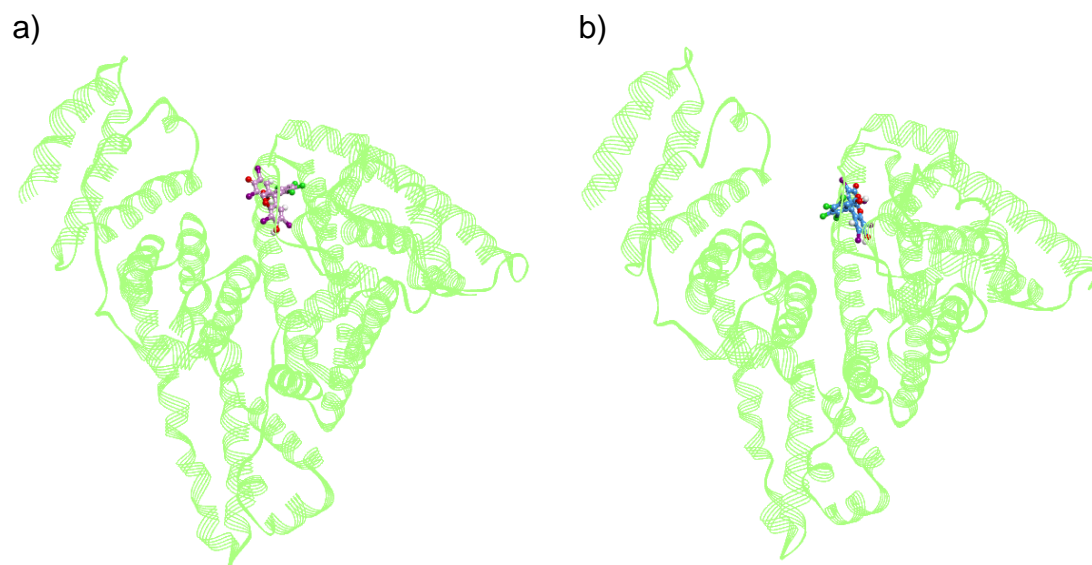


Figura 53. Confôrmeros obtidos nos estudos de *docking* molecular no sítio FA1 da proteína HSA. a) softwares Autodock (roxo). b) software GOLD (azul).

5.1.4.3 Sítio FA6

Os confôrmeros obtidos dos estudos com os softwares Autodock e GOLD podemos observar que são visualmente semelhantes, tanto nos anéis xantêmicos como o anel benzênico. Porém uma parte que irá se diferenciar uma da outra é a rotação do grupo carboxílico. Recorrendo aos cálculos de RMSD, obtemos um valor de 1,123 Å, esse resultado indica que as estruturas possuem semelhanças.

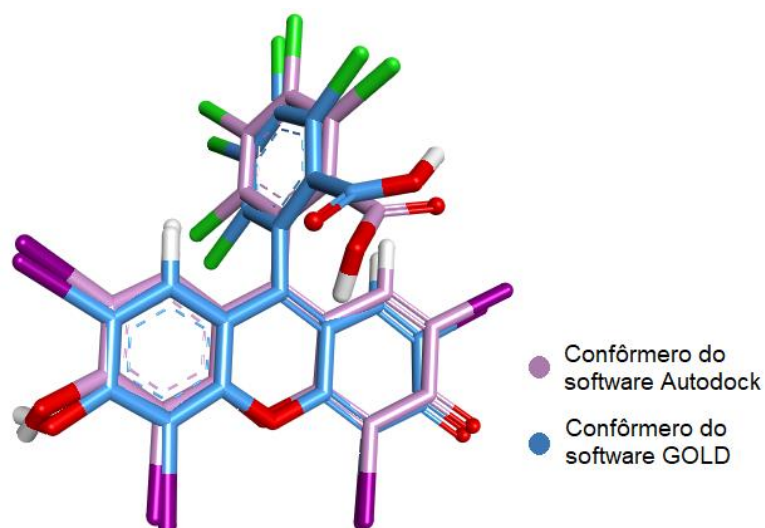
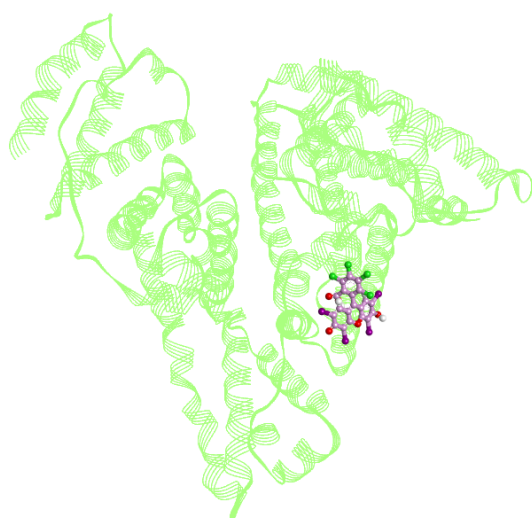


Figura 54. Estruturas dos confôrmeros obtidos nos estudos de *docking* molecular ao sítio FA6 pelos softwares Autodock (roxo) e GOLD (azul).

Mesmo os confôrmeros apresentarem um grau de semelhança, podemos verificar na Figura 55 que estes não estão na mesma localização nos subdomínios IIA e IIB.

A estrutura obtida nos estudos com o software Autodock está bem próximo ao sítio de Sudlow I, e ainda se localiza ao extremo oposto ao encontrado para o software GOLD. Assim as interações encontradas para cada confôrmero, como estão demonstradas nas Tabela 12 e Tabela 13, possuem diferentes interações com diferentes aminoácidos.

a)



b)

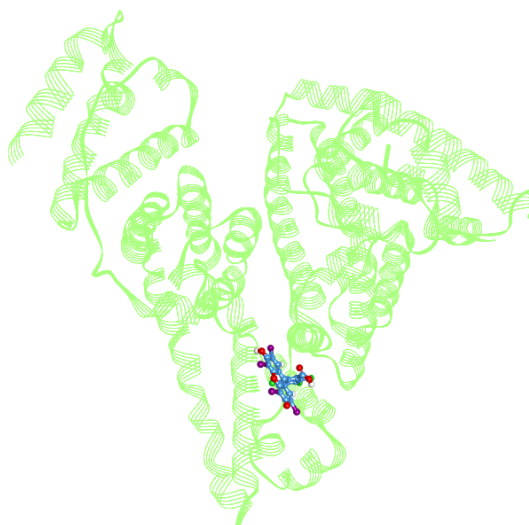


Figura 55. Confôrmeros obtidos nos estudos de *docking* molecular no sítio FA6 da proteína HSA. a) softwares Autodock (roxo). b) software GOLD (azul).

5.2 Constante de associação

5.2.1 Variando a Concentração da Rosa de Bengala

No experimento para verificar se há interação da RB na HSA, analisou os resultados obtidos no equipamento de UV-visível, verificou que a fluoresceína possui um comprimento de onda máxima em torno de 549 nm. E quando adiciona-se a proteína observa-se um deslocamento do comprimento de onda no sentido batocrômico ($\lambda = 563$ nm), como demonstrado na Figura 56. Espectros de absorbância no visível. (a) linhas contínuas - corante RB (2,5 a 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). (b) linhas tracejadas – RB com HSA ($[\text{RB}] = 2,5$ a 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

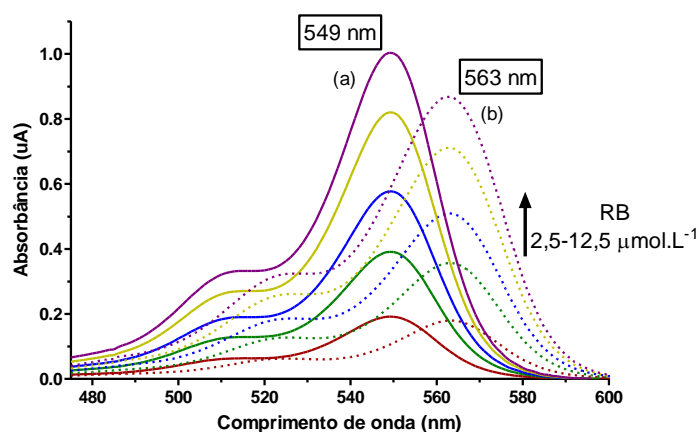


Figura 56. Espectros de absorbância no visível. (a) linhas contínuas - corante RB (2,5 a 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). (b) linhas tracejadas – RB com HSA ($[\text{RB}] = 2,5$ a 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Na Figura 57 observamos que quando adicionamos pequenas concentrações da proteína, há um deslocamento do comprimento de onda máxima para o 563 nm, como esperado; e ainda foi verificado que o estado de saturação, na qual interpretamos que todo o ligante esteja interagindo com a proteína, foi alcançada quando obteve uma concentração em torno de 2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de HSA, sendo que havia inicialmente 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do corante RB.

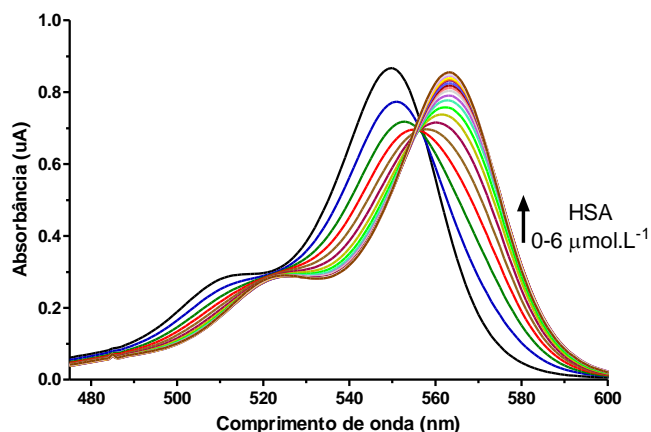


Figura 57. Espectro de UV-vis do RB com a adição da proteína HSA (0 a 6 μL).

Com os resultados dos espectros de UV-vis foi possível então realizar os cálculos necessários para determinar o valor da constante de associação do corante à proteína. Porém há a necessidade antes de realizar uma plotagem de um gráfico na qual envolve os valores inversos da absorbância ($1/\Delta A$) por o inverso da concentração da proteína que foi adicionada ($1/[\text{HSA}]$), como demonstrado na Figura 58.

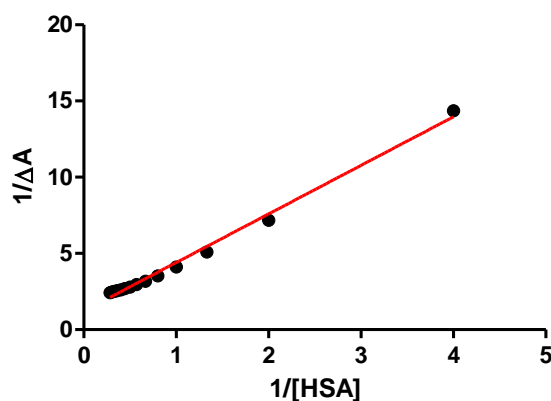


Figura 58. Gráfico para determinar o valor da constante de associação entre o corante RB à proteína HSA.

Esse experimento foi realizado em triplicata para obter uma precisão dos resultados, sendo assim, utilizando os valores correspondentes dos coeficientes angulares e lineares obtidos na Figura 58, e correlacionar com a equação de Benesi-Hildebrand, conseguimos determinar os valores da constante de associação entre o corante à proteína que ficou em torno de $3,90 \pm 0,08$ ($\times 10^5$) mol.L^{-1} , sendo que os restantes dos valores estão demonstrados na Tabela 14.

Tabela 14. Valores dos desvios padrões, constantes de ligação e a média da interação da RB com HSA.

R²	Coef. Linear	Coef. Angular	Ka (mol.L⁻¹)	$\bar{K}a$ (mol.L⁻¹)
0,9910	1,323 ± 0,088	3,414 ± 0,079	3,87x10 ⁵	
0,9937	1,214 ± 0,101	3,187 ± 0,076	4,55x10 ⁵	(3,90 ± 0,08) x10⁵
0,9914	1,297 ± 0,089	3,228 ± 0,066	4,70x10 ⁵	

Com essas análises iniciais podemos verificar que o corante RB interage com a proteína HSA, essa característica é de enorme importância, pois como mencionado anteriormente, a HSA é considerada a proteína mais abundante na corrente sanguínea, e ela possui também a característica de transportar nutrientes, fármacos e drogas no corpo humano. Então há a necessidade de compreender melhor como é essa interação do corante à proteína, primeiramente então realizou os estudos para determinar em qual sítio de ligação da HSA esse corante tem maior afinidade, sendo que esse estudo envolve uma competição do corante em relação a um fármaco específico do sítio, a partir dos resultados, há a possibilidade de compreender e determinar a afinidade ao sítio de ligação.

5.2.2 Determinação do Sítio de ligação

A compreensão da interação do ligante a uma proteína albumina envolve um dos mais importantes tópicos no campo das ciências da vida, pois os sítios de ligação provêm informações importantes sobre o transporte e metabolismo de moléculas no corpo humano, podendo assim influenciar na sua farmacocinética e/ou no seu modo de ação, na qual podem estar envolvidas no surgimento de efeitos colaterais indesejados ou em até na redução de toxicidade (GUIZADO, 2008; SANCHES, 2016).

Os estudos experimentais envolveram a utilização de fármacos específicos de cada sítio (I, II e III) como demonstrado na Tabela 15, e assim determinar o valor da constante de associação do corante à proteína sob a influência desses fármacos, e desse modo, averiguar a partir dos resultados a possível região que o corante possui maior afinidade na proteína HSA.

Tabela 15. Ligantes específicos de cada sítio de ligação na proteína HSA.

SÍTIO	Composto	Fórmula Molecular
I	Varfarina	$C_{19}H_{16}O_4$
	Ibuprofeno	$C_{13}H_{18}O_2$
II	Diflunisal	$C_{13}H_8F_2O_3$
	Diazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O$
III	Digitoxina	$C_{41}H_{64}O_{13}$
	Biliverdina	$C_{33}H_{34}N_4O_6$
Todos	Ác. Linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$

5.2.2.1 Sítio Sudlow I

5.2.2.1.1 Varfarina

O experimento de competição ao *sítio* Sudlow I com o fármaco Varfarina observou que os resultados de UV-vis ficaram bem parecidos com os obtidos apenas com o corante e a proteína, aparentando que com a presença desse fármaco, não teve uma influência na interação do RB à HSA, como demonstrado na Figura 59.

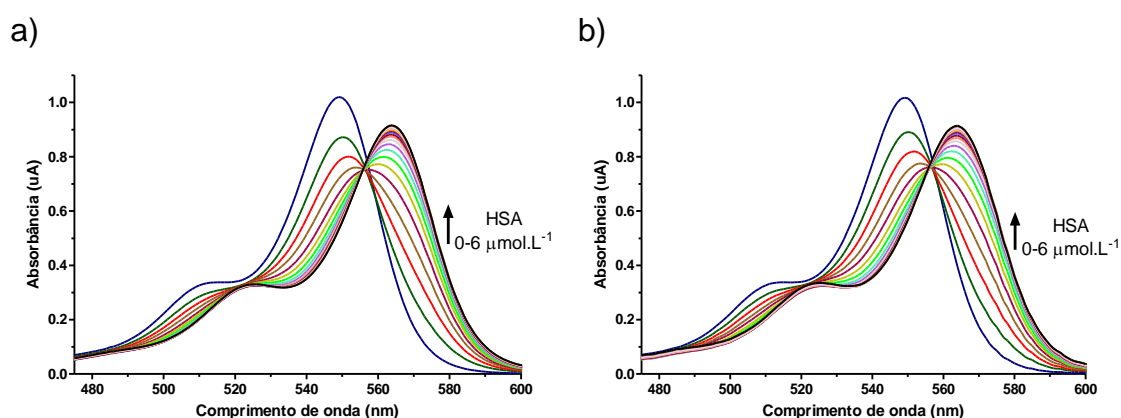


Figura 59. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a $6,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Varfarina.

Portanto determinou o valor da constante de associação dessa interação utilizando a equação de Benesi-Hildebrand, porém para se obter esse valor, há a necessidade de determinar graficamente uma relação de ΔA^{-1} por $[PROTEÍNA]^{-1}$, como demonstrado na Figura 60, na qual podemos visualizar que há uma diferença entre os experimentos com e sem a influência do fármaco Varfarina, sendo que este não era perceptível nas análises obtidos dos gráficos espectrais de Uv-vis.

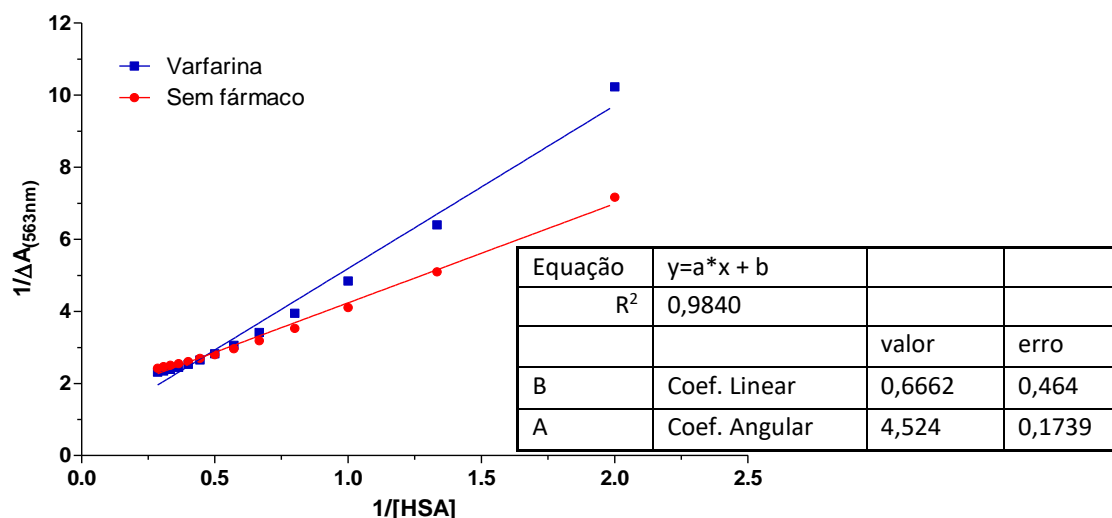


Figura 60. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Varfarina (azul) e sem fármaco (vermelho).

Na Figura 60 podemos ainda observar que os valores dos coeficientes da reta média dos pontos obtidos experimentalmente são: coeficiente linear de 0,1520, coeficiente angular de 29,67 e coeficiente de correlação linear de 0,9966. Sendo assim, relacionando esses valores com a Equação 4, obtemos o respectivo valor da constante de associação entre o corante RB à proteína HSA. Porém como as análises foram realizadas em duplicata, calculou-se então o valor médio do K_a e seu respectivo valor de desvio padrão na qual podemos observar na Tabela 16, onde a constante de associação média dessa interação possui um valor de $1,90 \pm 0,43 (x10^5) \text{ mol.L}^{-1}$, sendo que esse valor é menor que o encontrado nos estudos da interação do corante à proteína, recordando que o valor dessa constante de associação é de $3,90 \pm 0,08 (x10^5) \text{ mol.L}^{-1}$, portanto devido a essa queda desse valor, podemos compreender que houve uma

competição entre o fármaco e o corante para se interagir na mesma região da proteína, sendo que essa localização é o sítio Sudlow I, pois é a principal região de interação do fármaco Varfarina na proteína HSA como mencionado anteriormente.

Tabela 16. Valores das constantes de associação entre o corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Varfarina, com seus respectivos valores de coeficiente de correlação e a média dos valores de K_a com o desvio padrão.

	R^2	K_a (mol.L ⁻¹)	\bar{K}_a (mol.L ⁻¹)
Varfarina	0,9840	$1,47 \times 10^5$	$1,90 \pm 0,43 (x10^5)$
	0,9888	$2,32 \times 10^5$	

Devemos também averiguar o valor da constante de associação da Varfarina no sítio Sudlow I da HSA, pois desse modo se esta possuir um valor muito mais significativo que o corante, provavelmente o RB terá mais dificuldade para interagir nessa região. Sendo assim, no trabalho de Loun *et al.* (1992) determinou que a Varfarina possui um valor de K_a em torno de $1,4$ a $5,7 \times 10^5$ mol.L⁻¹, portanto podemos determinar que essa análise experimental foi conveniente, devido que os valores das constantes de associação tanto do corante como do fármaco estarem no mesmo intervalo.

Depois de todas as análises podemos concluir que a Varfarina conseguiu deslocar o corante do sítio de ligação da proteína HSA, portanto devido a essa circunstância, compreendemos que o RB possui uma afinidade de interação a essa região, localizada no subdomínio IIA da HSA.

5.2.2.2 Sítio Sudlow II

5.2.2.2.1 Ibuprofeno

Os estudos de competição de sítio utilizando o fármaco Ibuprofeno podem ser visualizados nos espectros de UV-vis na Figura 61. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a $6,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ibuprofeno.

b, na qual apresentou um comportamento um pouco diferente quando comparado aos estudos realizados apenas com o corante RB à proteína HSA (Figura 61a). Podemos notar que o estado de saturação da Figura 61b não apresenta o mesmo valor de absorbância máximo da primeira amostra (sem a influência da proteína), porém ao compararmos o espectro referente apenas do corante (primeira curva) de ambos os resultados, verificamos que a mesma análise para a mesma amostra não possuem o mesmo valor de absorbância máximo, sendo assim, provavelmente a análise referente ao RB na Figura 61b tenha algum erro experimental.

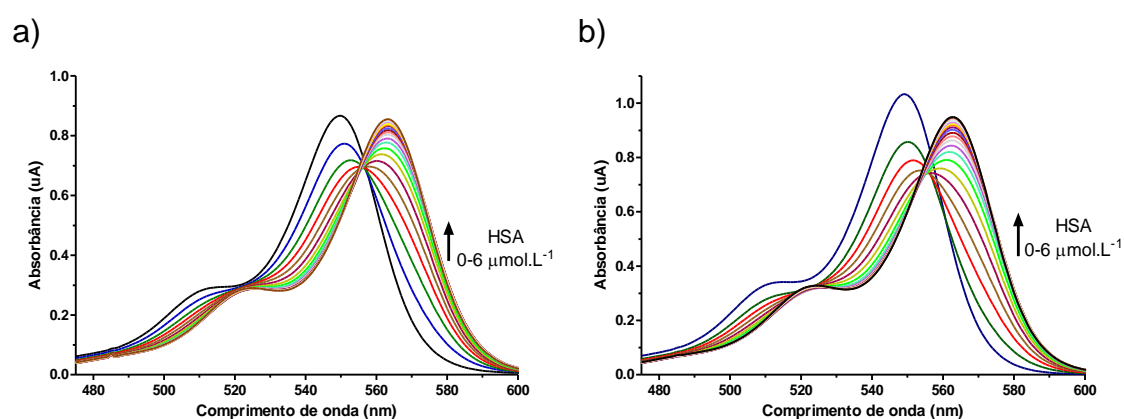


Figura 61. Espectros de absorbância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ibuprofeno.

Para averiguar se o corante RB interage ao sítio Sudlow II da HSA, realizou os estudos utilizando a equação de Benesi-Hildebrand, portanto a partir dos resultados obtidos na Figura 61b plotou-se um gráfico de ΔA^{-1} por $[\text{PROTEÍNA}]^{-1}$, como demonstrado na Figura 62, na qual podemos visualizar que há uma diferença entre os experimentos com e sem a influência do fármaco Ibuprofeno, sendo assim o valor de K_a obtido experimentalmente sob a influência do fármaco foi de $1,35 \pm 0,42 (x10^5) \text{ mol.L}^{-1}$, um valor abaixo ao obtido dos experimentos utilizando apenas o ligante RB com a proteína HSA ($K_a = 3,90 \pm 0,08 x 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$).

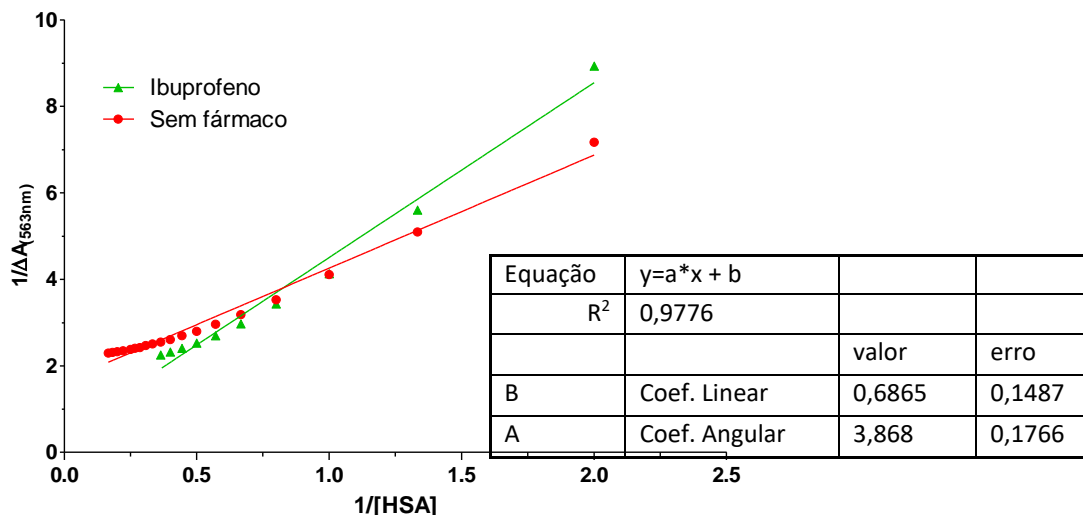


Figura 62. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Ibuprofeno (verde) e sem fármaco (vermelho).

Essa redução do valor da constante de associação indica que houve uma competição da região onde o Ibuprofeno possui afinidade, sendo que há estudos como Shen *et al.* (2017) e Yeggoni *et al.* (2014) que indicam que esse fármaco interage principalmente na região do subdomínio IIIA da HSA, porém se compararmos com os estudos de *docking* molecular realizados anteriormente, verificamos que o corante RB não possui afinidade a essa região. Entretanto nos estudos de Ghuman *et al.* (2005) (Figura 63) observamos que esse fármaco possui uma segunda afinidade numa outra região, o sítio FA6. Desse modo, podemos supor que esse abaixamento do valor da constante de associação sob a influência do Ibuprofeno se deve ao fato desse ligante possuir outras localizações de afinidades na proteína HSA.

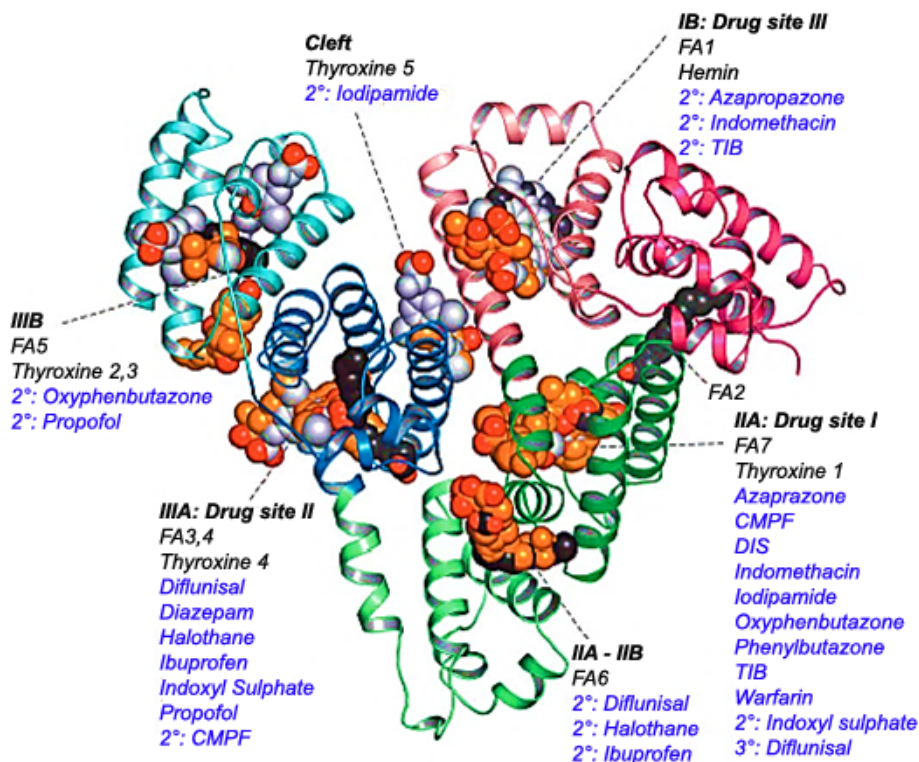


Figura 63. Sítios preferenciais de ligação de alguns fármacos (Fonte: GHUMAN *et al.*, 2005 -modificado).

Com essa nova análise dos resultados experimentais temos que certificar se o corante possa ou não ter alguma afinidade a região do Sudlow II, assim, repetiu o experimento utilizando outros fármacos: Diflunisal e Diazepam. Portanto de acordo com o trabalho de Ghuman *et al.* (2005), os estudos envolvendo o Diflunisal devem obter o mesmo resultado que o Ibuprofeno, pois os dois possuem as mesmas regiões de interações (sítios Sudlow I, Sudlow II e FA6), já nos estudos envolvendo o Diazepam provavelmente deva obter resultados diferentes, pois este possui apenas a interação ao sítio Sudlow II da proteína HSA.

5.2.2.2.2 Diflunisal

Na Figura 64 podemos comparar os resultados obtidos de espectro de UV-vis dos fármacos (Ibuprofeno e Diflunisal) com o experimento de RB_{nativa} , na qual este é considerado sem a influência de nenhum fármaco. Ao realizar uma comparação entre os resultados da RB_{nativa} (Figura 64) Figura 64. Espectros de absorbância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b)

Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ibuprofeno.
c) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diflunisal.

a) com a influência do Diflunisal (Figura 64c), observamos que há um comportamento diferente entre eles, principalmente na região de $\lambda_{\text{máx}}$ de 550 nm, na qual é referente ao resultado apenas do corante RB sem a presença de proteína, sendo que esse comportamento também foi visto nos estudos sob a influência do Ibuprofeno.

Podemos observar também que o comportamento do corante RB sob a influência do Diflunisal (Figura 64c) está bem parecido com os resultados obtidos anteriormente com o fármaco Ibuprofeno (Figura 64b), porém há a necessidade de realizar os estudos mais precisos como a determinação do valor da constante de associação, para verificar se os comportamentos sob a influência desses fármacos são parecidos.

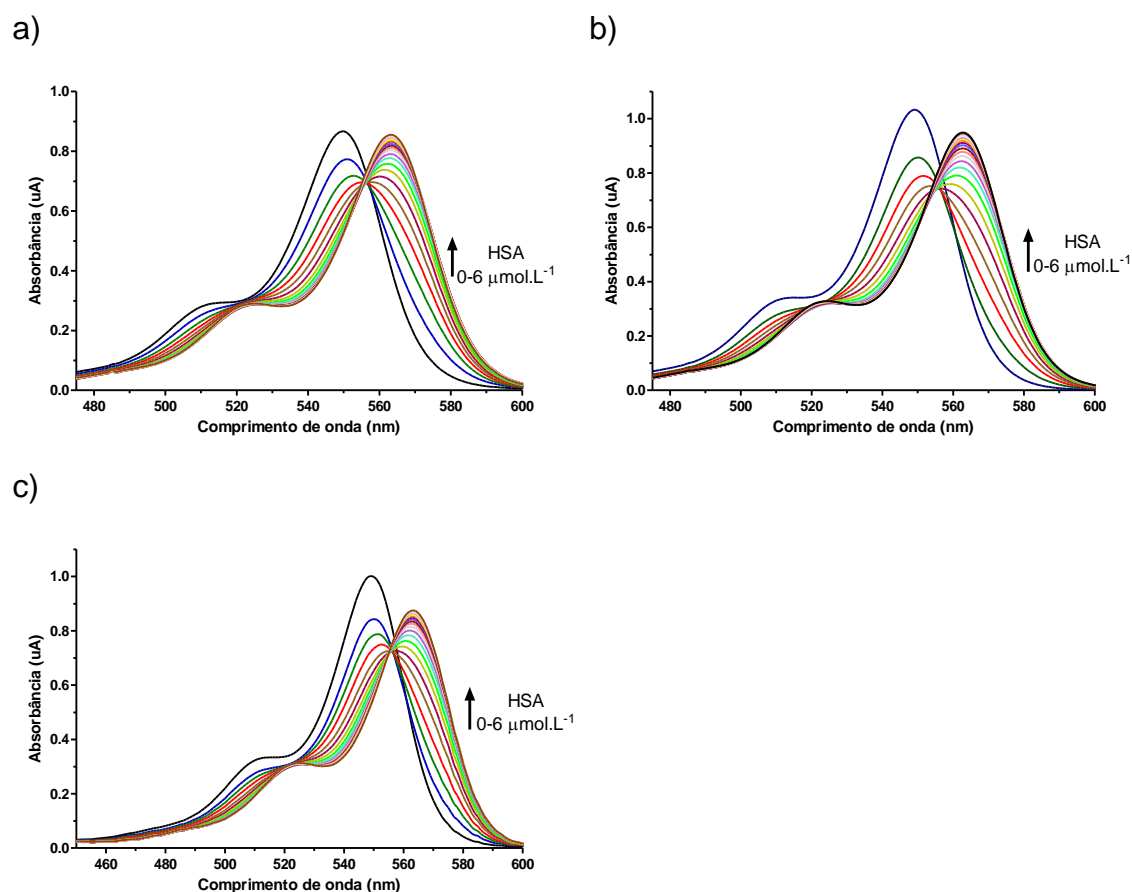


Figura 64. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação

do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ibuprofeno. c) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diflunisal.

Para a determinação do valor da constante de associação foi necessário a utilização da equação de Benesi-Hildebrand (Equação 4), porém houve a necessidade de montar um gráfico de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$, como demonstrado na Figura 65. E assim determinamos que o valor da constante de associação do Diflunisal é de $0,86 \pm 0,06 (x10^5) \text{ mol.L}^{-1}$, um valor abaixo da interação do corante à proteína ($K_a = 3,90 \pm 0,08 x 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$), e bem próximo ao valor obtido sob a influência do fármaco Ibuprofeno ($K_a = 35 \pm 0,42 x10^5 \text{ mol.L}^{-1}$).

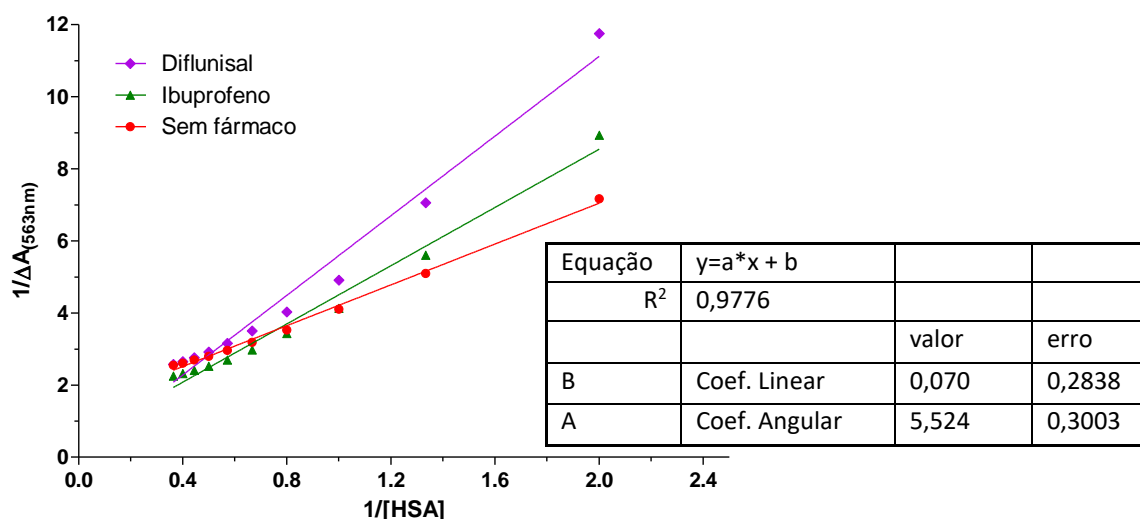


Figura 65. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Diflunisal (roxo), Ibuprofeno (verde) e sem fármaco (vermelho).

O resultado obtido do valor do K_a entre corante RB à HSA sob a influência do Diflunisal, indica que na presença desse fármaco, o corante teve uma dificuldade em interagir na proteína, ocasionando desse modo um abaixamento do valor da constante de associação. Esse mesmo comportamento de competição desse sítio de ligação (sítio Sudlow II) é vista nos resultados com o Ibuprofeno, na qual realizamos a hipótese que essa interação se deva na região do sítio 6 da proteína HSA ao invés do sítio Sudlow II, recordando que nos resultados de *docking* molecular o corante não possui afinidade ao sítio Sudlow II, e também de acordo com o trabalho de Ghuman *et al.*, (2005), ambos os

fármacos Ibuprofeno e Diflunisal, possuem uma segunda região de interação (sítio FA6).

Apesar dos resultados obtidos tanto com o Ibuprofeno como Diflunisal, indicam que a hipótese da interação do corante RB esteja sendo no sítio FA6 da proteína HSA esteja correta, há a necessidade de realizar o mesmo experimento com o Diazepam para certificar que essa afirmação esteja correta e adequada.

5.2.2.2.3 Diazepam

Os resultados de UV-vis da RB sob a influência do Diazepam podemos visualizar na Figura 66d e comparar com os outros resultados já obtidos (RB_{nativa} e sob a influência dos fármacos Ibuprofeno e Diflunisal). Quando comparamos com os espectros obtidos no RB_{nativa} (Figura 66). Espectros de absorbância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ibuprofeno. c) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diflunisal. d) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diazepam.

a) com a Figura 66. Espectros de absorbância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ibuprofeno. c) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diflunisal. d) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diazepam.

d) verificamos que houve novamente uma diferenciação no $\lambda_{\text{máx}}$ em 550 nm, referente a absorção da amostra que possui apenas o corante RB. E quando comparamos com os resultados obtidos dos experimentos com Ibuprofeno (Figura 66). Espectros de absorbância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ibuprofeno. c) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diflunisal. d) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diazepam.

b) e Diflunisal (Figura 66). Espectros de absorbância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à

proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ibuprofeno. c) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diflunisal. d) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diazepam.

c) observamos que tiveram um comportamento bem parecido, porém há a necessidade de verificar o valor de K_a para compreender melhor o comportamento do corante RB na proteína HSA sob a influência do Diazepam.

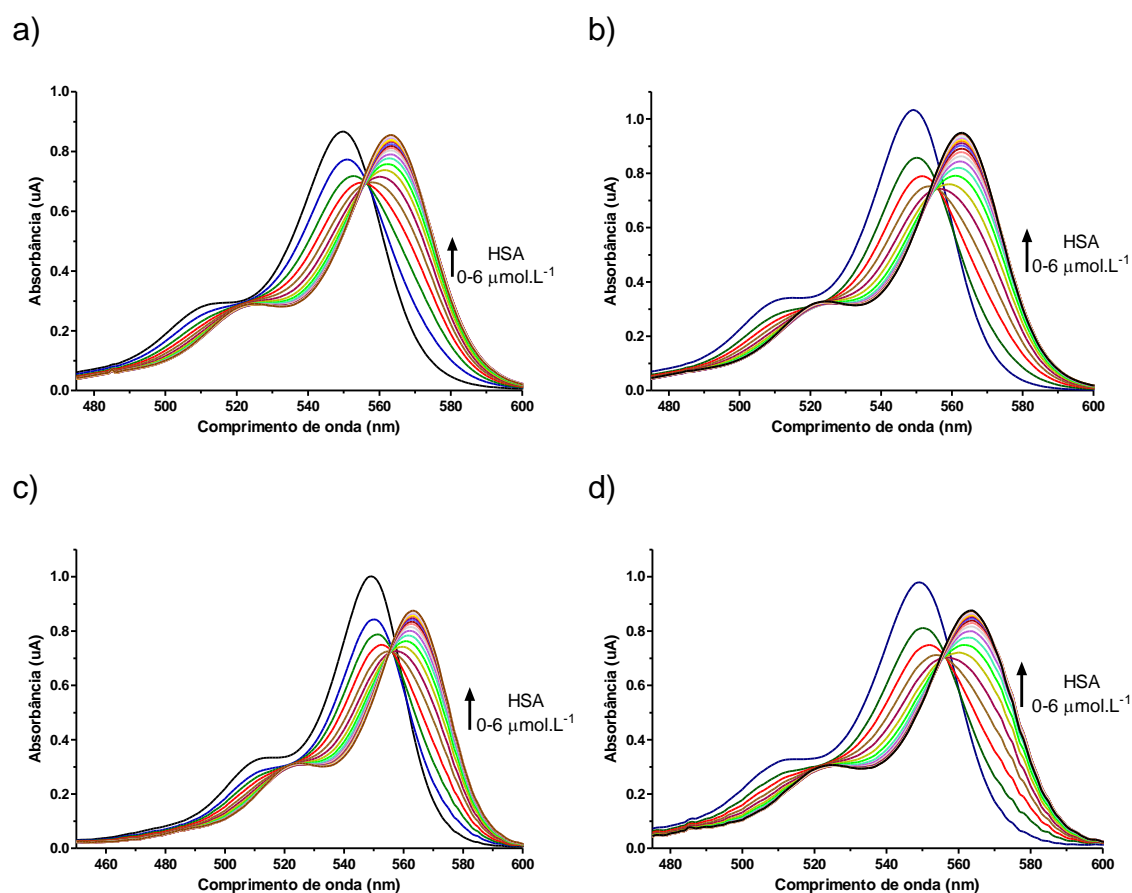


Figura 66. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ibuprofeno. c) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diflunisal. d) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Diazepam.

A determinação do valor da constante de associação se deu com o auxílio da equação de Benesi-Hildebrand (Equação 4) na qual há a necessidade de se

determinar antes valores dos coeficientes angulares e lineares obtidos num gráfico de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$, como demonstrado na Figura 67. Sendo assim, obteve-se o valor de K_a para essa interação de $3,05 \pm 0,53 (x10^5) \text{ mol.L}^{-1}$, uma constante bem próximo ao obtido no experimento sem a influência de qualquer fármaco ($K_a = 3,90 \pm 0,08 x 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$), portanto diante dessa análise, podemos compreender que a presença do Diazepam faz com que o corante RB não tenha nenhuma dificuldade de interagir com a proteína, portanto não houve uma competição ao mesmo sítio de ligação.

Com esse resultado obtido sob a influência do Diazepam, podemos certificar que o decaimento dos valores das constantes de associação do corante RB na proteína referentes aos experimentos da influência do Ibuprofeno e Diflunisal, foi ocasionado no sítio 6, uma segunda região de interação desses fármacos, ao invés do sítio Sudlow II, devido que não houve um decaimento do valor de K_a nos experimentos com o Diazepam, na qual é considerado como um fármaco específico ao sítio Sudlow II (KHATUN, *et al.*, 2019).

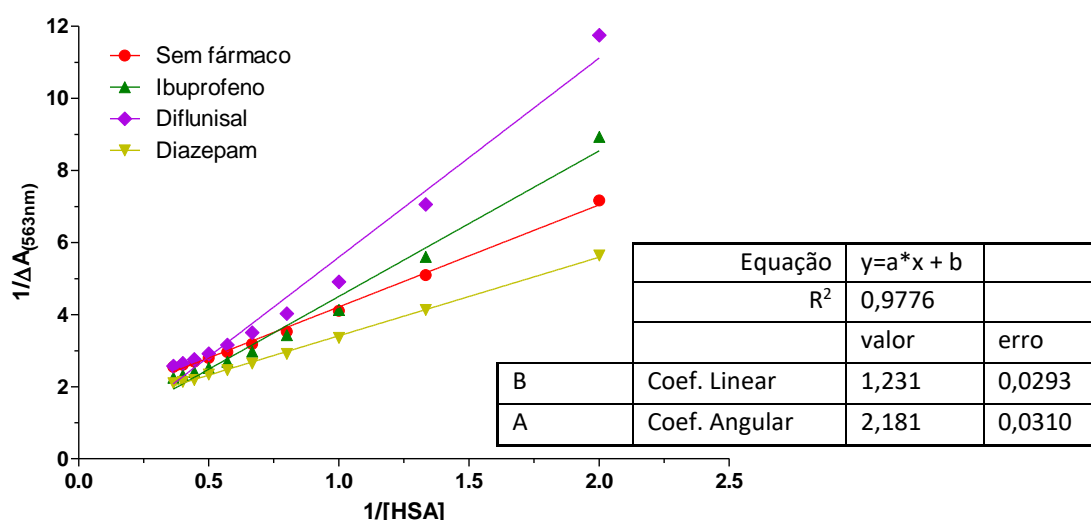


Figura 67. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Diazepam (dourado), Diflunisal (roxo), Ibuprofeno (verde) e sem fármaco (vermelho).

5.2.2.3 Sítio FA1

5.2.2.3.1 Digitoxina

Na Figura 68 Figura 68. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a $6,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à

proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Digitoxina.

b podemos analisar o comportamento do corante RB sob a influência do fármaco Digitoxina, assim verificamos que o estado de saturação, localizado no λ_{max} em 563nm, possui um valor de absorvância menor quando comparado com a primeira análise (λ_{max} em 550nm), na qual este representa apenas a absorção do corante. Quando comparamos esses resultados de UV-vis com os espectros do experimento sem a influência de fármaco (Figura 68a) observamos que os gráficos resultantes possuem uma diferença em relação aos valores correspondentes da absorvância máxima tanto para as análises do corante RB e também sob a presença da proteína, isso se justifica além dos erros experimentais, que provavelmente a presença da Digitoxina afeta de alguma forma a interação do corante na proteína.

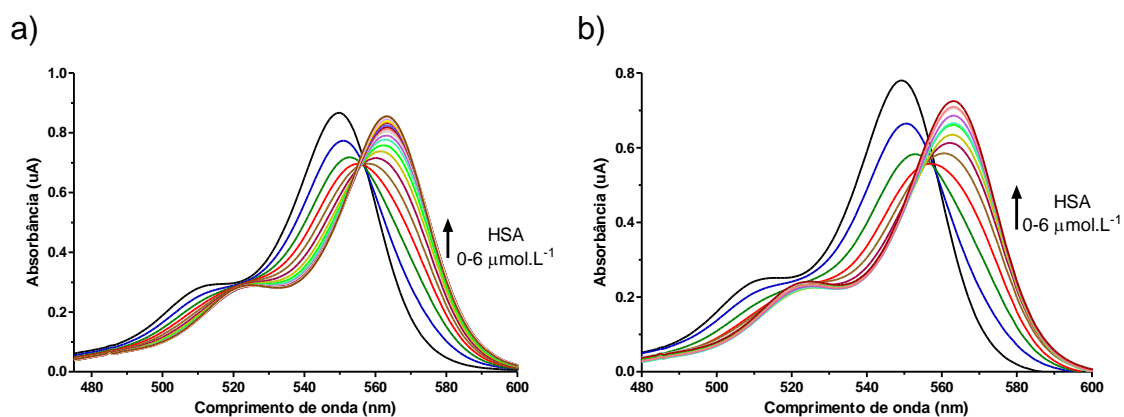


Figura 68. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Digitoxina.

Há a necessidade de averiguar com mais precisão esses resultados de espectroscopia de UV-vis obtidos. Desse modo, realizou os estudos de determinar o valor da constante de associação entre o corante à proteína sob a influência da Digitoxina, portanto a partir dos resultados obtidos da Figura 68b e dos valores das concentrações de HSA utilizadas nos experimentos, plotou-se um gráfico de ΔA^{-1} por $[\text{HSA}]^{-1}$ como demonstrado na Figura 69. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[\text{HSA}]^{-1}$ com seus respectivos valores de R2, coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Digitoxina (azul claro) e sem fármaco (vermelho).

. Verificamos que no gráfico que o comportamento da reta referente a Digitoxina está bem semelhante ao sem fármaco, indicando que provavelmente que a presença desse fármaco não interfira na interação do RB à proteína. Porém há a necessidade de determinar o valor do K_a , obtido a partir dos valores dos coeficientes angulares e lineares da reta na Equação 4, para certificar a influência do fármaco na interação do corante na proteína.

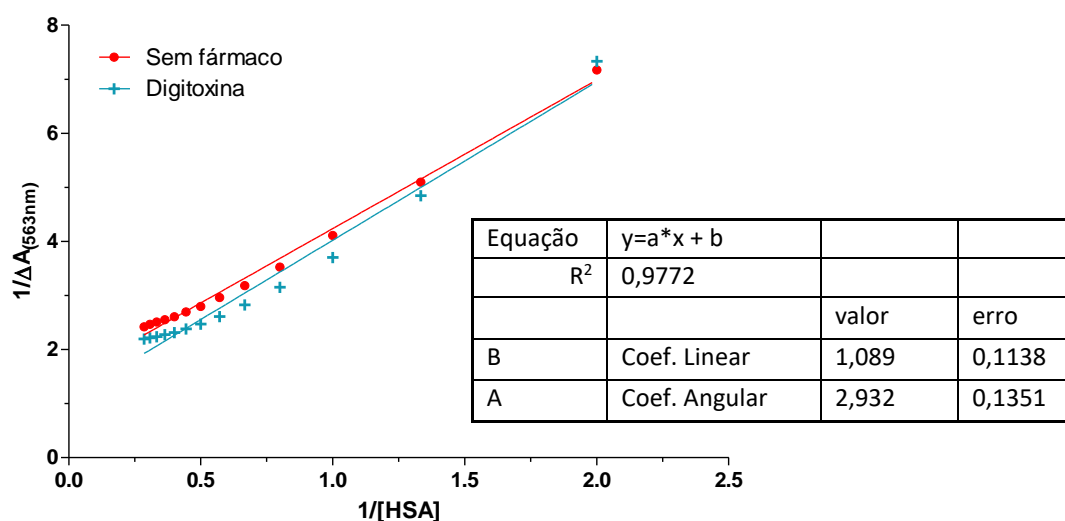


Figura 69. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Digitoxina (azul claro) e sem fármaco (vermelho).

O valor da constante de associação do corante RB à proteína HSA sob a influência da Digitoxina é de $2,06 \pm 0,59 (x10^5) \text{ mol.L}^{-1}$, sendo um valor um pouco abaixo do registrado sem a influência de nenhum fármaco ($3,90 \pm 0,08 x10^5 \text{ mol.L}^{-1}$) indicando que o fármaco consegue deslocar o corante da proteína, ocasionando assim, uma competição de interação numa certa localização, sendo que essa região é conhecido como sítio FA1, localizada no subdomínio IB da HSA, um local onde a Digitoxina possui uma maior afinidade (MANJUSHREE *et al.*, 2019).

Como o valor de K_a não obteve um decaimento muito significativo, então propõe-se duas hipóteses que possam ter influenciado nesse resultado, sendo a primeira de que o valor da constante de associação da Digitoxina ser menor que do RB, assim haverá uma pequena dificuldade desse fármaco conseguir deslocar o corante da proteína. A segunda hipótese seria de que como o sítio

FA1 é considerado uma região relativamente aberta, e tendo a Digitoxina um volume menor que o RB (Figura 70), porém a sua geometria é uma cadeia longa, possivelmente apresenta um comportamento parecido com os ácidos graxos interagindo principalmente com o aminoácido Arg117 (BHATTACHARYA, *et al.*, 2000), ocasionando assim um baixo deslocamento do corante, devido que esse fármaco possa estar ou não competindo a mesma região de interação com o corante RB.

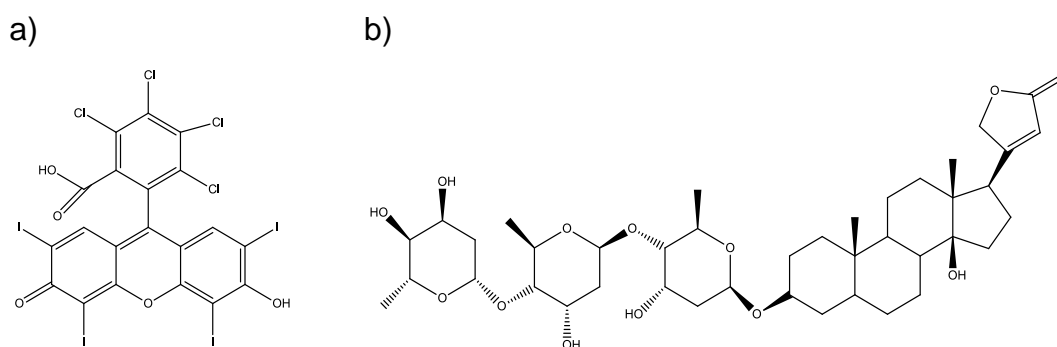


Figura 70. Geometria espacial da conformação estrutural. a) Rosa de Bengala. b) Digitoxina.

Para verificar a primeira hipótese foi realizado o estudo envolvendo os valores das constantes de associação do fármaco Digitoxina e comparado com o do corante na proteína obtido experimentalmente. Ao realizar o levantamento de dados, verificou que no trabalho de Hage *et al.* (1999) a Digitoxina possui um valor de K_a de $5,2 \pm 0,02 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$ um valor bem abaixo que o do corante RB ($3,90 \pm 0,08 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$), indicando desse modo que esse fármaco apresentará uma dificuldade em deslocar o corante da proteína, pois de acordo com Peters, T.J (1996) para realizar esse estudo de deslocamento há a necessidade de que os ligantes em estudo apresentam um valor próximo da constante de associação.

Para averiguação da segunda hipótese foi necessária a realização da busca de outro ligante, no qual este apresente um volume e geometria parecidos com o corante RB, sendo assim, escolheu-se a molécula de Biliverdina (Figura 71) que apresenta volume de $543,096 \text{ \AA}^3$ e uma área superficial de $517,547 \text{ \AA}^2$, valores bem próximos aos obtidos no RB, tendo um volume de $464,881 \text{ \AA}^3$ e área de $431,394 \text{ \AA}^2$, sendo que esses resultados foram obtidos com o auxílio do software DS 2019.

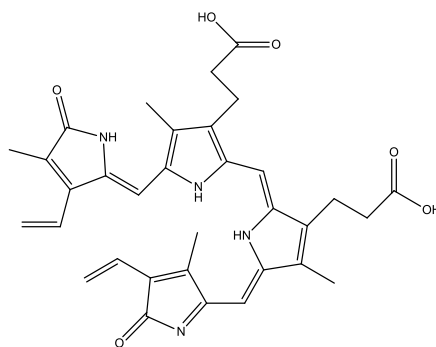


Figura 71. Estrutura Molecular do fármaco Biliverdina.

5.2.2.3.2 Biliverdina

Os estudos sob a influência da Biliverdina podem ser visualizados na Figura 72 e podemos comparar os resultados da influência desse fármaco com os resultados experimentais da interação do corante à proteína sob nenhuma influência de algum fármaco. Ao analisarmos melhor a Figura 72 Figura 72. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Biliverdina.

b, observamos que a presença da Biliverdina fez com que a linha base dos espectros de UV-vis tivesse uma pequena elevação, sendo que essa característica não foi visualizado em nenhum outro experimento realizado anteriormente.

Essa alteração da linha base dos espectros de UV-vis sob a influência da Biliverdina, fez com que o valor da absorvância referente ao comprimento de onda máxima do estado de saturação ($\lambda_{\text{max}} = 563 \text{ nm}$) se igualasse ao valor obtido no experimento apenas com o corante ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$), e assim quando comparamos os espectros com esse fármaco e sem o fármaco, eles aparentam ter o mesmo valor.

a)

b)

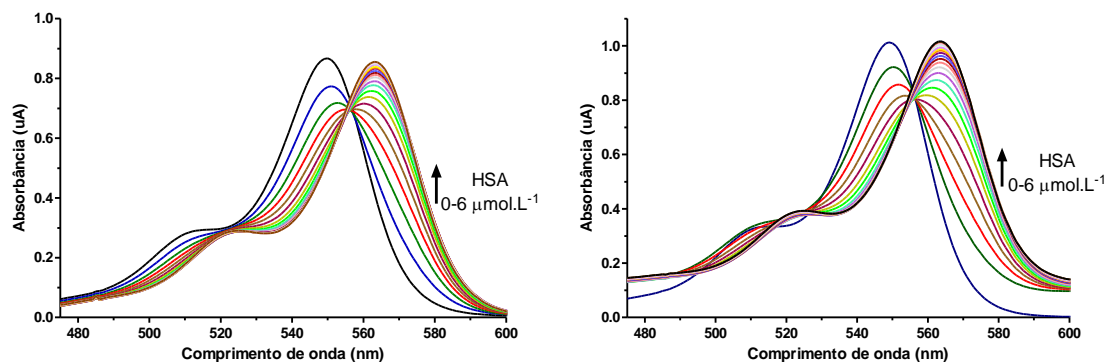


Figura 72. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Biliverdina.

Para averiguar corretamente se a presença da Biliverdina houve alguma alteração na interação entre o RB à HSA, devemos realizar o cálculo para determinar o valor da constante de associação, utilizando desse modo a Equação 4. Entretanto há a necessidade de realizar antes a plotagem de um gráfico de ΔA^{-1} por $[\text{HSA}]^{-1}$ como demonstrado na Figura 73, para assim certificar se a presença da Biliverdina afeta no comportamento da interação do corante na proteína. O valor de K_a referente a esse experimento de interação do corante RB à proteína HSA sob a influência da Biliverdina foi de $8,05 \pm 0,95 (\times 10^5) \text{ mol.L}^{-1}$, um valor totalmente diferente dos obtidos nos experimentos anteriores, porém esse aumento da constante de associação indica que mais moléculas do corante RB está interagindo na proteína HSA, desse modo, a presença da Biliverdina fez com que não houvesse uma competição de sítios como esperado, mas sim ocorresse o efeito alostérico.

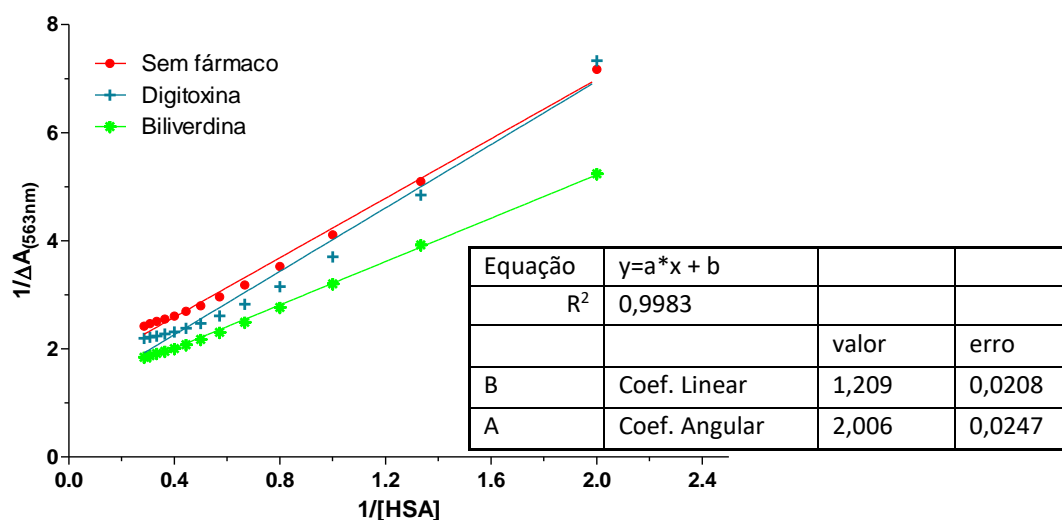


Figura 73. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Biliverdina (verde claro), Digitoxina (azul claro) e sem fármaco (vermelho).

O Efeito Alostérico é um termo que se refere à capacidade dos ligantes de alterar a flexibilidade e a estrutura das regiões proteicas distantes do local de ligação, possivelmente alterando a atividade biológica da proteína, mesmo quando a proteína não se desdobra, sendo assim, este não pode ser interpretado em termos e teorias clássicas de ação enzimática, mas sim como algum tipo de transição molecular, na qual é induzida ou estabilizada na proteína quando se liga a um ligante alostérico. (MONOD, *et al.*, 1965; SHAO, *et al.*, 2017)

Nas análises realizadas ao sítio FA1 da HSA, observamos que o RB possui uma afinidade a esse sítio devido aos estudos realizados com a Digitoxina e também com a *docking* molecular, porém, nos experimentos sob a influência da Biliverdina, verificamos que ocorreu um efeito alostérico. Com o auxílio dos estudos de Zsila (2013) observamos que a Biliverdina possui um valor de constante de associação (15×10^5 a $17 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$) maior que o RB, desse modo há uma dificuldade para que o corante consiga se interagir na região do sítio FA1 da proteína. Porém devido a presença da Biliverdina no subdomínio IB, fez com que o RB começasse a interagir em outras regiões da HSA, mas não foi possível determinar quais eram as “novas regiões” dessa interação.

5.2.2.4 Ácido Linoleico

Na Figura 74b podemos visualizar que os espectros de UV-vis sob a influência do Ácido Linoleico obteve o mesmo comportamento observado com os fármacos referentes aos sítios I e II, na qual os valores máximos de absorção referentes as curvas de saturação, não obtiveram o mesmo valor que a análise com apenas o RB. E quando comparamos os espectros referente apenas ao corante das Figura 74a e Figura 74b observamos que há uma pequena diferença, na qual o segundo experimento possui um valor de absorbância máxima maior que o primeiro experimento.

a)

b)

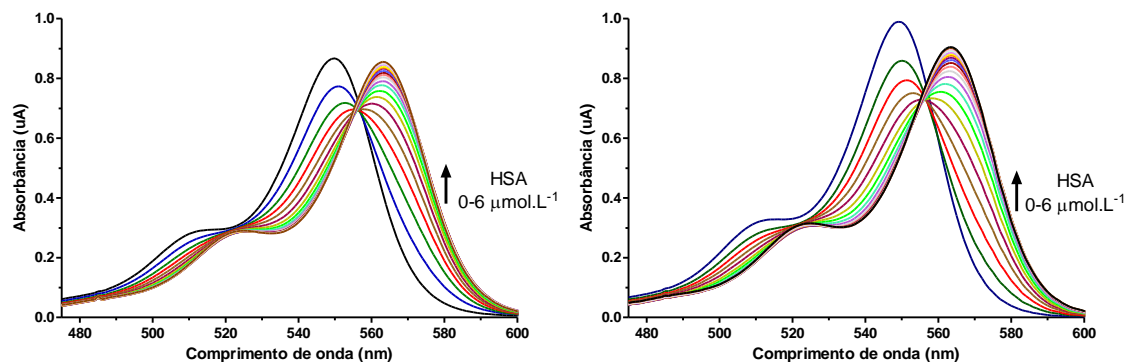


Figura 74. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Ácido Linoleico.

Os estudos para compreender se a presença do Ácido Linoleico interfere na interação do corante na proteína, há a necessidade de determinar o valor da constante de associação dessa interação. Sendo assim, primeiramente realizou a plotagem de um segundo gráfico de ΔA^{-1} por $[\text{HSA}]^{-1}$ como demonstrado na Figura 75, para então com a Equação 4 determinar o valor de K_a a partir dos valores dos coeficientes angulares e lineares obtidos no segundo gráfico.

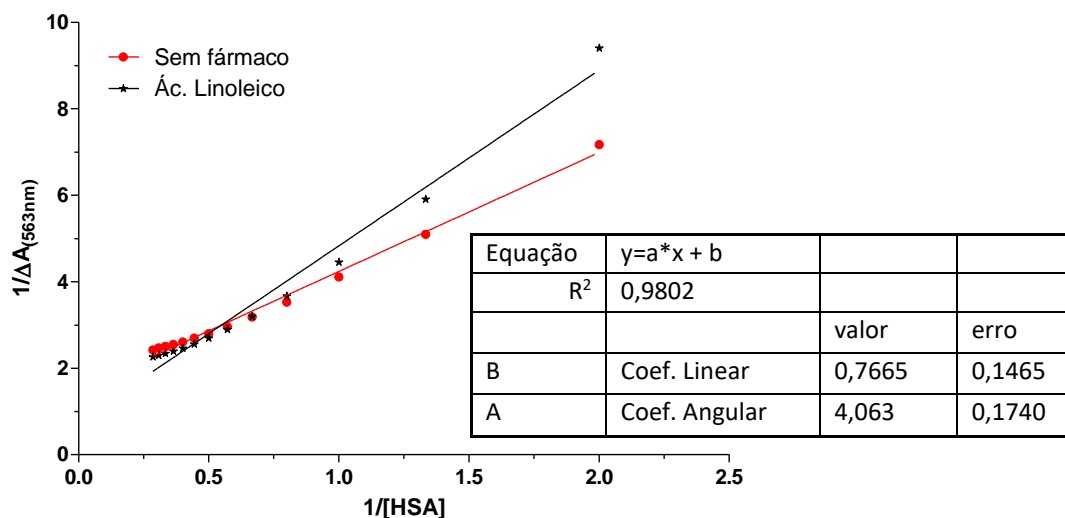


Figura 75. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[\text{HSA}]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Ácido Linoleico (preto) e sem fármaco (vermelho).

Na Figura 75 observamos que a reta em preto está um pouco distinta quando comparada a reta vermelha, porém o valor da constante de associação do RB

sob a influência do Ácido Linoleico ($K_a = 3,23 \pm 1,34 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$), é bem parecido com o experimento do RB sob nenhuma influência de outro ligante ($K_a = 3,90 \pm 0,08 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$). Desse modo, podemos afirmar que a presença do Ácido Linoleico não altera a interação do RB na proteína, e isso se deve a alguns fatores, na qual provavelmente pode ser por causa do valor da constante de associação desse ligante ser menor que o do corante, porém ao estudar os trabalhos de Birjandi *et al.*, (2014) e Kemp *et al.*, (2019) averiguamos que o valor da interação do ácido à proteína fica em torno de 9.2×10^4 a $4.3 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$, sendo assim, podemos descartar essa hipótese, devido que os valores são próximos. Outro fator que possa ter influenciado nos resultados é em relação à estrutura do ácido, pois apesar de ser longa, é pouco volumosa, podendo ocasionar então a interação simultânea das duas estruturas, tanto o RB como o Ácido Linoleico, nos mesmos sítios de interação da HSA, assim não haverá a alteração do valor de K_a do corante sob a influência desse ácido.

5.2.2.5 Sondas específicas de cada sítio com Ácido Linoleico

O experimento de interação do corante RB à proteína HSA sob a influência das Sondas específicas de cada sítio (Varfarina, Ibuprofeno e Biliverdina) e com o Ácido Linoleico, denominaremos essa influência como “*todos os fármacos*”.

Na Figura 76c podemos visualizar que os espectros de UV-vis referentes a influência de *todos os fármacos* possui um comportamento bem semelhante aos espectros dos estudos sob a influência da Biliverdina (Figura 76b), na qual a linha base teve um pequeno deslocamento quando houve a adição das sondas, portanto essa elevação da linha base é referente à presença da Biliverdina.

A Figura 76 nos auxilia comparar também os espectros desse experimento com os espectros obtidos sob nenhuma influência de fármacos (Figura 76a) e podemos analisar que além do fato haver a alteração da linha base, os valores das absorvâncias máximas referentes aos estados saturados e apenas com o corante, não possuem o mesmo valor, como podemos visualizar nos experimentos com a Varfarina e Ibuprofeno. Desse modo, observamos que os espectros referentes sob a influência de *todos os fármacos* possuem as características visualizadas nos experimentos relacionadas a cada sonda realizadas anteriormente.

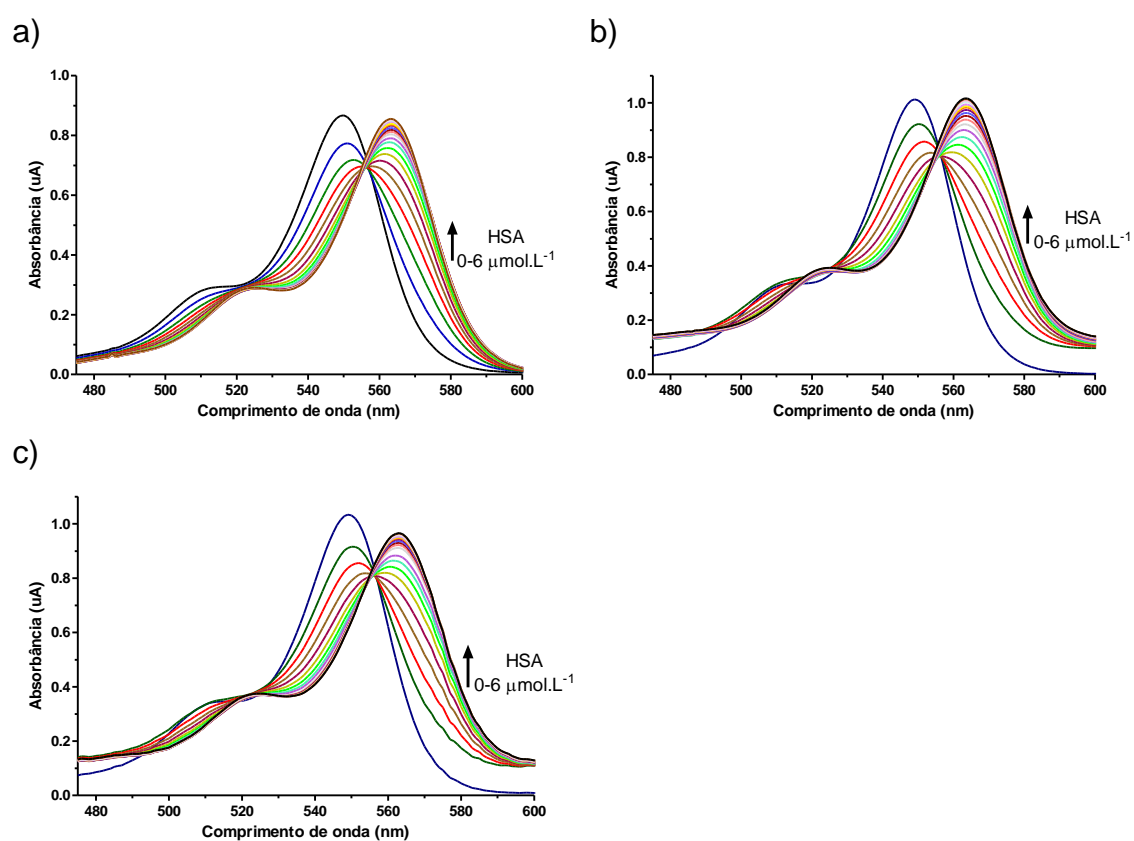


Figura 76. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA. b) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência do fármaco Biliverdina. c) Interação do corante RB à proteína HSA sob a influência de todos os fármacos.

A verificação para determinar o comportamento do corante sob a influência de *todos os fármacos* se deu sob os estudos do valor da constante de associação desse ligante à proteína HSA, desse modo, há a necessidade de plotar um

gráfico de ΔA^{-1} por $[PROTEÍNA]^{-1}$ como demonstrado na Figura 77, para então com a Equação 4 determinar o valor de K_a a partir dos valores dos coeficientes angulares e lineares obtidos nesse gráfico.

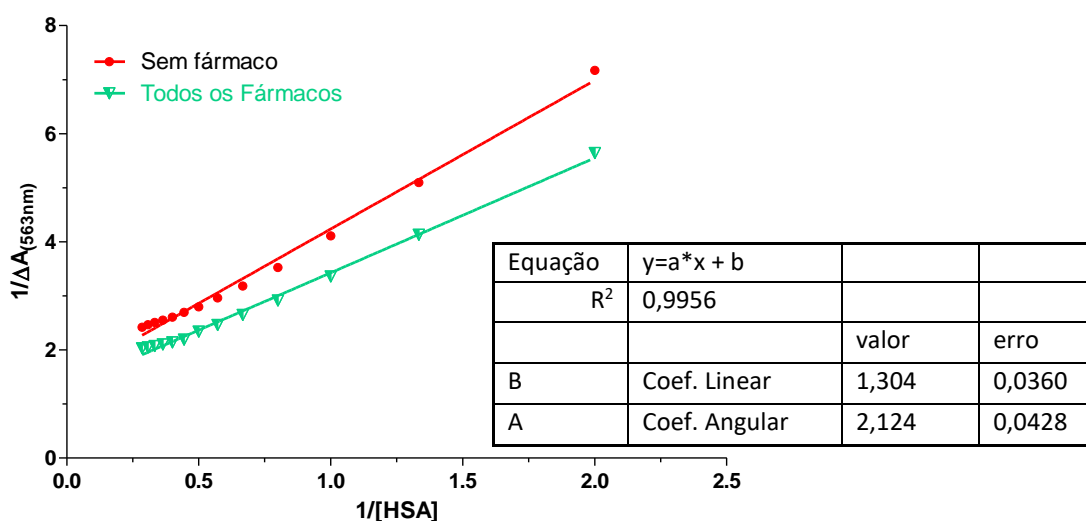


Figura 77. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência de Todos os Fármacos (verde esmeralda) e sem fármaco (vermelho).

Analisamos melhor os gráficos da Figura 76 e Figura 77 observamos que as retas não possuem o mesmo o comportamento, na qual há um distanciamento entre eles, e assim resultando na diferenciação dos valores das constantes de associação, na qual para os experimentos sob a influência de *todos os fármacos*, o valor de K_a é $7,33 \pm 0,59 (x10^5) \text{ mol.L}^{-1}$, enquanto para o experimento sem a influência de nenhum fármaco o valor de K_a é de $3,90 \pm 0,08 (x10^5) \text{ mol.L}^{-1}$. Portanto, esse comportamento nos faz compreender que provavelmente as características obtidas em cada análise experimental das sondas específicas, se reflitam nos resultados obtidos no experimento sob a influência de *todos os fármacos*, como a competição de sítios (Sudlow I e FA6), e também o efeito alostérico pela presença da Biliverdina. Ou então, possa ocorrer que na presença de todos os fármacos, o corante comece a ter alguma(s) interação(ões) em região(ões) na qual não havia essa afinidade, ou em região(ões) de menor afinidade(s). Essas hipóteses são sugeridas devido que a constante de associação é uma relação da quantidade molar de RB ligado por RB e HSA iniciais, assim se há um aumento do valor de K_a , podemos certificar que mais

estruturas moleculares do corante estão interagindo na proteína, mesmo tendo as principais regiões (sítios) de interações ocupados pelas sondas específicas.

Portanto nos estudos realizados até agora, com o intuito de determinar qual o sítio preferencial do RB na HSA, percebemos que a sonda interage facilmente na proteína de estudo (Tabela 17), porém, este não possui uma região preferencial, sendo que nos sítios nos quais houveram competição, os valores da constante de associação ficaram bem próximos, indicando que há uma afinidade de interações nessas regiões. E mesmo quando há a interferência de todas as sondas específicas de cada sítio, foi observado um aumento no valor de K_a (Tabela 17), indicando que mais conformações estruturais do corante estão interagindo na proteína.

Tabela 17. Valores da constante de associação (K_a) do corante RB.

	$\bar{K}_a (M^{-1})_{RB}$	SÍTIO
HSA _{nativa}	$(3,90 \pm 0,08) \times 10^5$	
VARFARINA	$(2,42 \pm 0,95) \times 10^5$	Sudlow I
IBUPROFENO	$(1,35 \pm 0,42) \times 10^5$	Sudlow II ou FA6*
DIFLUNISAL	$(0,86 \pm 0,06) \times 10^5$	Sudlow II ou FA6*
DIAZEPAM	$(3,05 \pm 0,53) \times 10^5$	Sudlow II
DIGITOXINA	$(2,06 \pm 0,59) \times 10^5$	FA1
BILIVERDINA	$(8,05 \pm 0,95) \times 10^5$	FA1
ÁC. LINOLEICO	$(3,23 \pm 1,34) \times 10^5$	
TODOS	$(7,33 \pm 0,59) \times 10^5$	

* Segundo sítio de ligação de acordo com o trabalho de Ghuman et al., 2005.

Devido a característica do corante RB se interagir facilmente em várias regiões da HSA, realizaram-se alguns estudos mais aprofundados como: Determinação da Proporção de Ligante na Proteína; Influência de Diferentes Meios Reacionais; e a Investigação da Interação do Corante em Diferentes Conformações Estruturais da Proteína HSA, sendo que esta representa as anomalias estruturais da proteína em diferentes enfermidades.

5.3 Proporção entre Proteína-Ligante

O experimento de Job's Plot envolve a alteração da relação da fração molar entre o RB e a proteína, sendo que a somatória das duas frações tem que ser igual a 1, referente a porcentagem total (100%) da solução resultante. Na Figura 78 Figura 78. Resultado do Teste de Job's Plot do corante RB na proteína HSA. a) Espectros de absorvância obtidos no UV-vis. b) Valores referentes da absorvância em 563nm referente aos valores das frações molares do corante RB.

a é a representação dos resultados de espectros de absorção obtidos de cada análise, na qual variou a concentração molar de RB de 1 a 13 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Podemos visualizar ainda que quando aumenta a concentração da proteína na solução resultante há um deslocamento dos espectros no sentido batocrômico, onde o valor máximo de absorção tende a um comprimento de onda (λ) de 563nm. Já na Figura 78 Figura 78. Resultado do Teste de Job's Plot do corante RB na proteína HSA. a) Espectros de absorvância obtidos no UV-vis. b) Valores referentes da absorvância em 563nm referente aos valores das frações molares do corante RB.

b representa um gráfico com os valores de absorção em $\lambda = 563\text{nm}$ por fração molar do RB, e assim realizar as médias lineares desses pontos, sendo que há a necessidade de determinar essa linearidade para os resultados crescentes e também para os decrescentes, pois desse modo podemos determinar a relação da quantidade molar de corante que esteja interagindo em uma proteína.

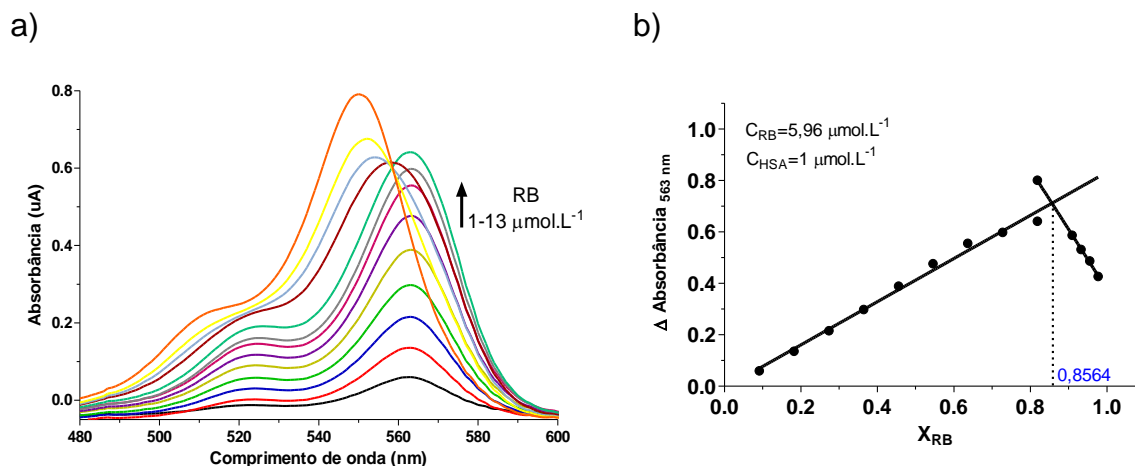


Figura 78. Resultado do Teste de Job`s Plot do corante RB na proteína HSA. a) Espectros de absorvância obtidos no UV-vis. b) Valores referentes da absorvância em 563nm referente aos valores das frações molares do corante RB.

Para determinar a relação proporcional da quantidade molar de ligante interagindo a proteína, primeiramente deve-se verificar a fração molar referente ao RB obtido da intersecção das semirretas, como demonstrada na Figura 78b, e este possui então o valor de 0,8564, na qual este será utilizado na Equação 5 para determinar a quantidade proporcional da sonda interagindo com uma única proteína.

$$X_P = \frac{C_L}{C_L + C_P} \quad (5)$$

Podemos averiguar que os cálculos realizados com a Equação 5 nos revelam que a relação de RB na proteína é de 6:1, indicando que são seis estruturas moleculares da sonda interagindo ao mesmo tempo em uma única proteína. Sendo assim, devido a essas quantidades significativas de interações, há uma dificuldade em determinar o sítio preferencial desse corante na proteína, como demonstrado nos experimentos de competições de sítios, e também nos estudos de *docking* molecular.

Para compreender melhor o comportamento do corante à proteína, realizou-se estudos alterando o meio reacional, pois desse modo verificou se o comportamento visualizado nos experimentos até agora, se assemelham algum

experimento envolvendo a alteração do meio reacional como: variação do pH, polaridade ou termodinâmico.

5.4 Influências do Meio Reacional

O objetivo desse estudo é determinar se o comportamento obtido na alteração do meio reacional se possui alguma semelhança com os resultados obtidos nos experimentos de competições de sítios, demonstrados anteriormente. E também analisar se ocorrem mudanças nos valores da constante de associação entre o RB e a HSA.

5.4.1 Variando a polaridade do meio reacional

Nesse estudo averiguou o comportamento do corante RB em diferentes meios, na qual estes possuem polaridades distintas, desse modo as soluções selecionadas para esse estudo foram: THF, Etanol, Acetonitrila, DMF, Acetona e Metanol.

Na Figura 79a podemos analisar os resultados dos espectros obtidos experimentalmente, desse modo, analisamos que todas as análises obtiveram um deslocamento no sentido batocrômico quando comparamos com os resultados do solvente PBS, e ainda podemos observar que o RB diluído no solvente Acetona, obteve uma grande elevação da linha de base, referente ao valor da absorvância que ficou por volta de 0,5 u.A. E na Figura 79b os resultados dos espectros de UV-vis foram normalizados, pois desse modo podemos compreender melhor como é o comportamento do corante nos diferentes meios reacionais, e também comparar com os resultados obtidos experimentalmente dos estudos já realizados da interação entre o RB à HSA. Portanto, podemos concluir que o espectro do complexo HSA-RB se assemelha aos espectros de soluções de RB em solventes de THF, DMF e Acetona.

a)

b)

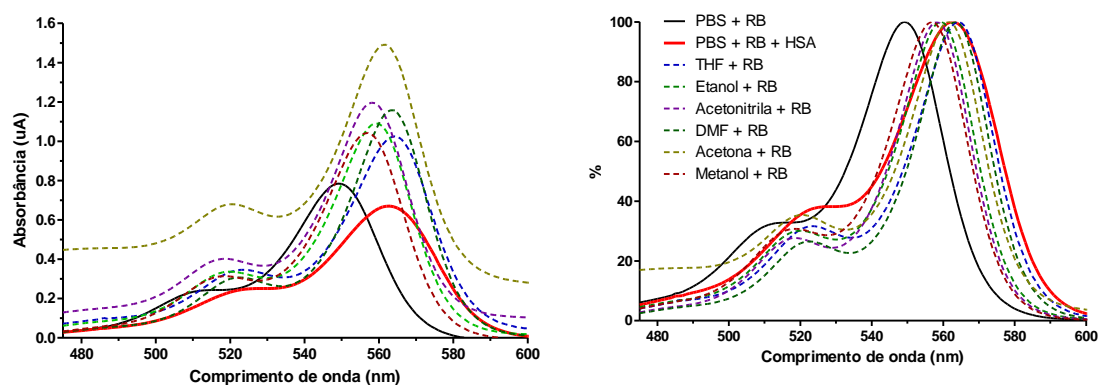


Figura 79. Espectros de absorvância no visível dos resultados dos estudos em diferentes polaridades do meio reacional. a) Resultados experimentais. b) Normalização dos resultados experimentais.

Para obter uma melhor compreensão dos resultados experimentais, recorreremos a Tabela 18 que nos fornece alguns valores físico-químicos dos solventes utilizados nos experimentos, e com auxílio dos estudos de Parker (1962), podemos classifica-los como solventes apróticos dipolares ou solventes próticos, sendo que essa classificação se baseia nas interações específicas dos cátions e ânions que este o possui. E ainda com o acréscimo dos estudos de Reichardt *et al.* (2011), podemos ter ainda uma terceira classificação, a de solventes apróticos apolares.

Tabela 18. Propriedades características dos solventes: índice de refração (n), momento dipolo (μ), constante dielétrica (ϵ) e energia de transição normalizada (E_T^N). (GÓES FILHO, 2010; REICHARDT *et al.*, 2011)

Solvente	n	μ (D)	ϵ	E_T^N
Tampão Fosfato pH 7.4	1,333	1,86	80,1	1,000
THF	1,407	1,75	7,58	0,207
DMF	1,431	3,82	36,7	0,386
Acetonitrila	1,344	3,92	37,5	0,46
Metanol	1,328	1,70	32,7	0,762
Etanol	1,361	1,69	24,5	0,654
Acetona	1,359	2,88	20,7	0,355

De acordo com os estudos de Parker (1962) e Reichardt *et al.* (2011) podemos determinar que os solventes pudessem ser classificados como próticos, ou apróticos dipolares, ou apróticos apolares, como mencionado anteriormente, sendo assim, a classificação de solvente prótico se dá pela ligação entre o átomo de Hidrogênio a elementos químicos mais eletronegativos, como flúor, nitrogênio, oxigênio e entre outros. Sob um aspecto mais físico-químico podemos determinar que essa classificação se dá a compostos que possuem uma permissividade relativa (ϵ) acima de 15, e também valores da escala empírica de solventes (E_T^N) entre 0,5 e 1,0. Desse modo podemos então definir que o Tampão Fosfato, Metanol e Etanol são classificados como solventes próticos.

Continuando os estudos, os solventes apróticos dipolares possuem uma característica em não formar Ligações de Hidrogênio, mas realizam interações de Van der Waals (dipolo induzido-dipolo induzido), devido a presença de pares de elétrons livre. E sob os aspectos físico-químico possuem também um alto valor de ϵ , como nos solventes próticos (acima de 15) descrito anteriormente, mas os valores de E_T^N ficam num intervalo de 0,3 a 0,5. Sendo assim, podemos classificar a Acetonitrila, THF, DMF e Acetona como solventes apróticos dipolares (GÓES FILHO, 2010; PARKER, 1962; REICHARDT *et al.*, 2011).

Nos solventes apróticos apolares possui uma interação bem fraca com o soluto, pois ocorrem apenas forças específicas direcionais, como indução e dispersão. Já no âmbito físico-químico possuem os valores baixos tanto para permissividade relativa, normalmente abaixo de 15, como momento dipolo ($\mu < 2,5$ D), e também no valor de E_T^N , na qual possui o intervalo de 0,0 a 0,3 (GÓES FILHO, 2010; PARKER, 1962; REICHARDT *et al.*, 2011).

Realizando uma análise das informações relatadas nos parágrafos anteriores, podemos compreender que os solventes próticos possuem uma afinidade maior em solutos aniônicos ao invés dos solventes apróticos dipolares. Porém, com o auxílio da Figura S10, observamos melhor o comportamento do corante sob a influência dos diferentes meios reacionais, e então podemos visualizar que o espectro de absorção do experimento do corante à proteína é semelhante às análises realizadas nas amostras experimentais com os

solventes THF, DMF e Acetona, na qual estes são considerados como solventes apróticos dipolares.

5.4.2 Variando o valor de pH

Nesse estudo vamos utilizar valores variáveis de pH do meio reacional, sendo assim, utilizou-se dois padrões para obter as suas variáveis. O primeiro padrão foi o valor de pH utilizado nos experimentos dos estudos de interação do corante à proteína, lembrando que estes eram conduzidos a um meio reacional neutro, num pH 7,4, então as variáveis desse padrão foram pH 6,2 e pH 8,0. O segundo padrão que foi utilizado é referente ao valor do P.I da proteína HSA, recordando que o valor deste é de 4,7, logo as variáveis desse padrão foram pH 3,7 e pH 5,7.

Na Figura 80 visualizamos que os espectros tiveram o mesmo comportamento, obtendo desse modo dois picos referentes aos pKa(s) das hidroxilas que compoñham a estrutura do RB (515 nm e 549 nm). Porém as intensidades dos valores das absorvâncias variaram inversamente proporcional ao valor do pH, sendo que no pH mais ácido obteve uma menor intensidade, e no pH mais básico um maior valor de absorvância. De acordo com o trabalho de Bezkrovnaya *et al.* (2006) isso se deve ao fato de que os espectros referentes aos pHs 6,2 e 7,4 correspondem aproximadamente ao valor de pKa₁ aparente, na qual referem-se a semelhança dos espectros de absorções das espécies HR⁻ e R²⁻, e nos valores de pH mais ácido há uma predominância da forma estrutural lactônica (Figura 10), na qual são espécies neutras (H₂R) e assim possuem uma absorção baixa (Figura S11).

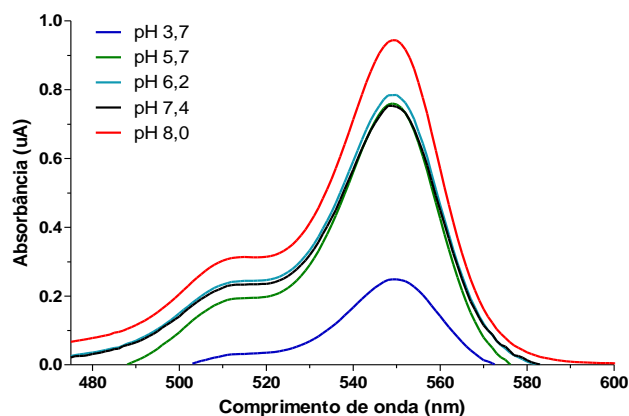


Figura 80. Espectros de absorvância no visível das análises do RB sob a influência da variação do valor de pH (3,7; 5,7; 6,2; 7,4 e 8,0) do meio reacional.

Na Figura 80 nos mostra que o espectro referente ao pH 6,2 é semelhante ao pH 7,4, sendo assim, realizou os estudos de interações entre o RB à proteína apenas nos meios reacionais com os valores de pH 3,7; 5,7; 7,4 e 8,0. O intuito dessa análise é averiguar se a alteração de acidez do ambiente reacional altera a interação do corante à HSA, pois essa modificação dos valores de pH pode estar relacionados a alguma enfermidade que esteja envolvida com alteração metabólica ou respiratória, como por exemplo a cirrose (GARIBAY *et al.*, 2019).

Os estudos da interação do corante à HSA sob a influência dos valores de pHs do ambiente reacional, podem ser visualizados na Figura 81. E então na Figura 81 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** podemos visualizar os resultados da interação no meio reacional mais ácido (pH 3,7), na qual identificamos que há uma diferenciação ao comparar com os outros espectros de interações já visualizados anteriormente. Sendo que o espectro referente ao corante no meio reacional mais ácido já possui uma baixa intensidade de absorvância, na qual está relacionada com a mudança estrutural da sonda, assim na adição da proteína fez com que os picos máximos do espectro de UV-vis já fiquem em 563 nm, ao invés de ter um deslocamento gradual de 549 nm para 563 nm, como visto nos experimentos anteriores.

No experimento de pH 5,7 obtive os resultados espectrais semelhantes aos da solução neutra (pH 7,4) e também da básica (pH 8,0), porém observamos que a única diferença deste diante dos outros resultados, é que quando há a adição da proteína na solução, a tendência para o estado saturado é mais rápida,

ocasionando desse modo, um decaimento mais acentuado do espectro de absorção com o deslocamento para o λ_{\max} de 563 nm. E para os resultados da interação no meio neutro e básico possuem também um comportamento bem semelhante, porém há uma diferenciação visível apenas no espectro referente à análise do corante (coloração preta) sem a presença da proteína, como já foi averiguado na Figura 80.

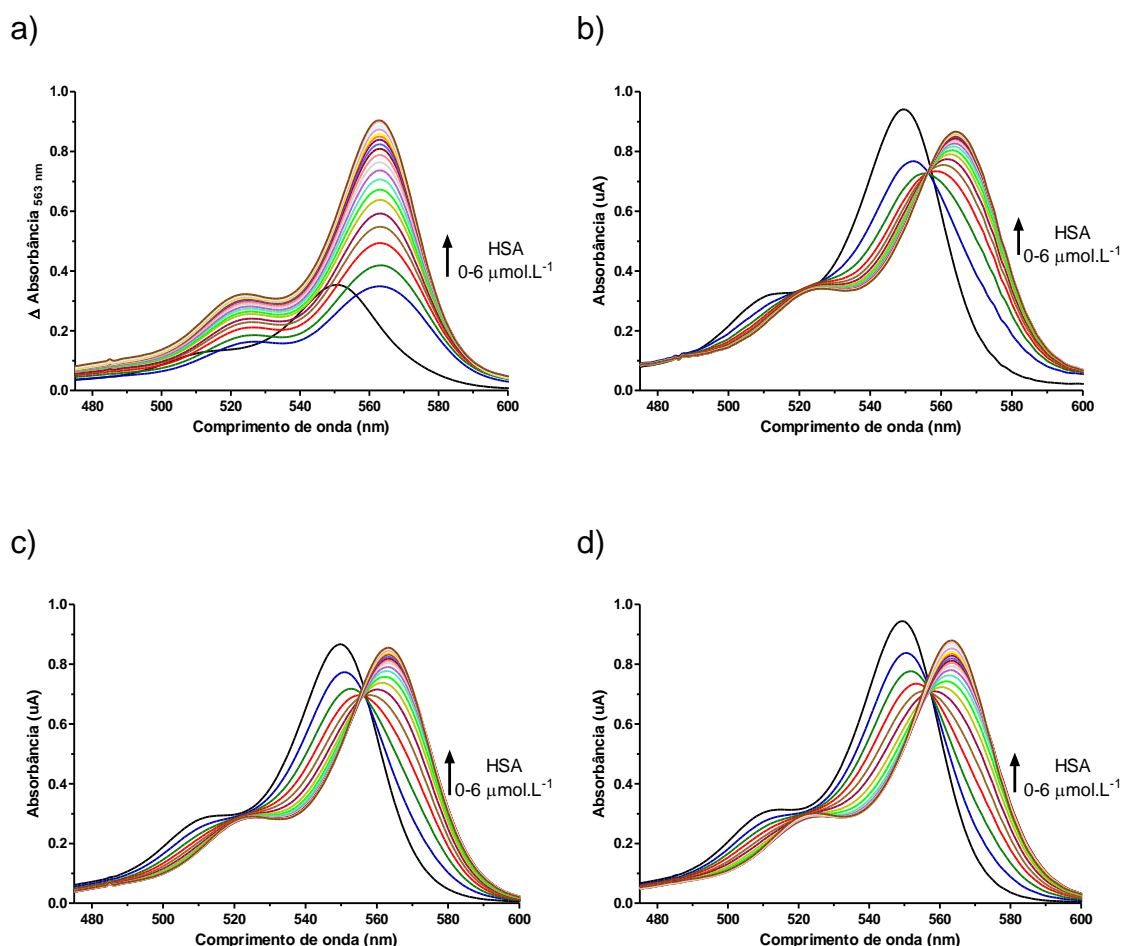


Figura 81. Espectros de absorbância no visível obtidos das análises dos estudos de interação do corante RB à proteína HSA em diferentes valores de acidez do meio reacional. a) pH 3,7. b) pH 5,7. c) pH 7,4. d) pH 8,0.

Com os resultados dos espectros obtidos das análises de interação entre o corante à proteína, sob a alteração da acidez do meio reacional, verificou os valores do K_a para comparar melhor os resultados dessas interações, sendo assim, há a necessidade de realizar antes a plotagem de um gráfico de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ como demonstrado na Figura 82 para então conseguir realizar os

estudos comparativos dos valores das constantes de associação do RB na proteína nos diferentes valores de pHs do meio reacional. Sendo assim, na

Tabela 19 podemos verificar os valores obtidos das análises do gráfico, e também os valores calculados de cada amostra. Portanto, observamos que nos pHs mais ácidos a estrutura de RB se interagiu um pouco mais à proteína quando comparado ao meio reacional neutro, lembrando que quanto mais a solução possuir caráter ácido, há mais conformações *lactônicas* desse modo podemos afirmar que essa conformação possui uma afinidade maior que a *zwitterionica* na proteína devido ao seu maior grau de hidrofobicidade. Porém ao verificar o resultado da amostra de pH 5,7 podemos notar que o valor de K_a é superior aos valores das soluções de pH 7,4 e pH 3,7, isso se deve a formação das estruturas *zwitterionicas* e *lactônicas*, entretanto se compararmos as estruturas *zwitterionicas* das amostras de pH 5,7 e pH 7,4 podemos analisar que na primeira solução haverá dois hidrogênios ionizáveis, enquanto na segunda solução apenas um, ocasionando desse modo, uma maior afinidade à proteína. E enquanto no pH 3,7 haverá mais estruturas *lactônicas* que *zwitterionicas*.

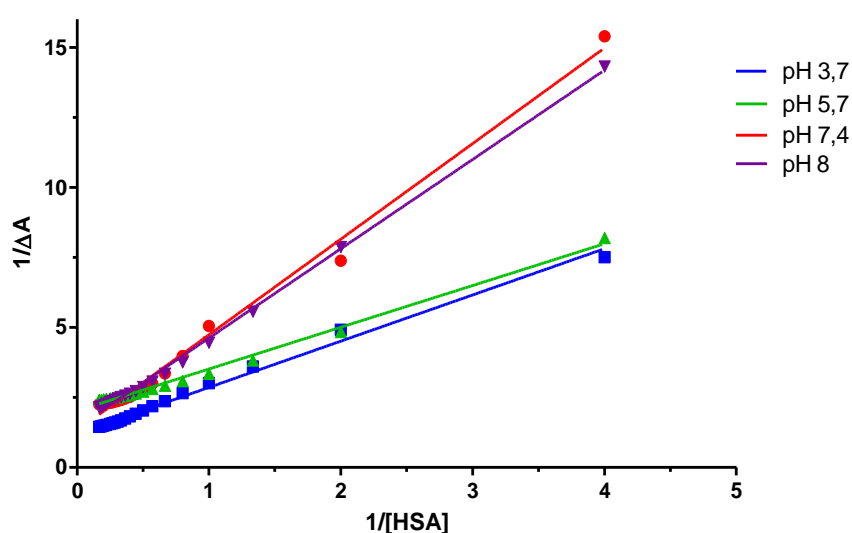


Figura 82. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ sob a influência de diferentes valores de acidez do meio reacional: pH 3,7 (azul), pH 5,7 (verde), pH 7,4 (vermelho) e pH 8,0 (roxo).

Tabela 19. Resultados das análises do gráfico ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ para determinar os valores das constantes de associação das amostras em diferentes meios reacionais de acidez.

	pH 3,7	pH 5,7	pH 7,4	pH 8,0
R²	0,9910	0,9932	0,9910	0,9976
Coefficiente Angular	1,650 ± 0,037	1,491 ± 0,029	3,414 ± 0,079	3,189 ± 0,037
Coefficiente Linear	1,209 ± 0,042	2,024 ± 0,033	1,323 ± 0,088	1,431 ± 0,042
Ka (x10⁵ mol.L⁻¹)	7,33	13,6	3,90 ± 0,08	4,49

5.4.3 Efeito do íon metálico na interação do corante RB à proteína HSA

O estudo da interação do corante à proteína sob a influência do íon metálico bivalente (carga +2) é de grande valia, pois no plasma sanguíneo há íons metálicos que podem afetar as interações entre o fármaco e a HSA, pois estes estão envolvidas nas ligações de coordenadas na proteína, desse modo, alguns íons metálicos podem afetar as interações entre o fármaco e a proteína, podendo ocasionar um aumento no efeito da toxicidade (ARIGA *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2007).

A análise da Figura 83 nos mostra que os espectros ficaram parecidos, principalmente entre os experimentos que envolvem os metais Cobre, Níquel e Zinco, já os resultados dos espectros referentes ao metal Chumbo estão parecidos com os resultados das análises da interação entre o corante à proteína sem influência de nenhum metal (HSA_{nativa}). Porém para compreender melhor esse estudo, há a necessidade de determinar o valor da constante de associação de cada experimento, pois com os respectivos dados podemos analisar com maior precisão o comportamento do corante na proteína sob a influência desses metais.

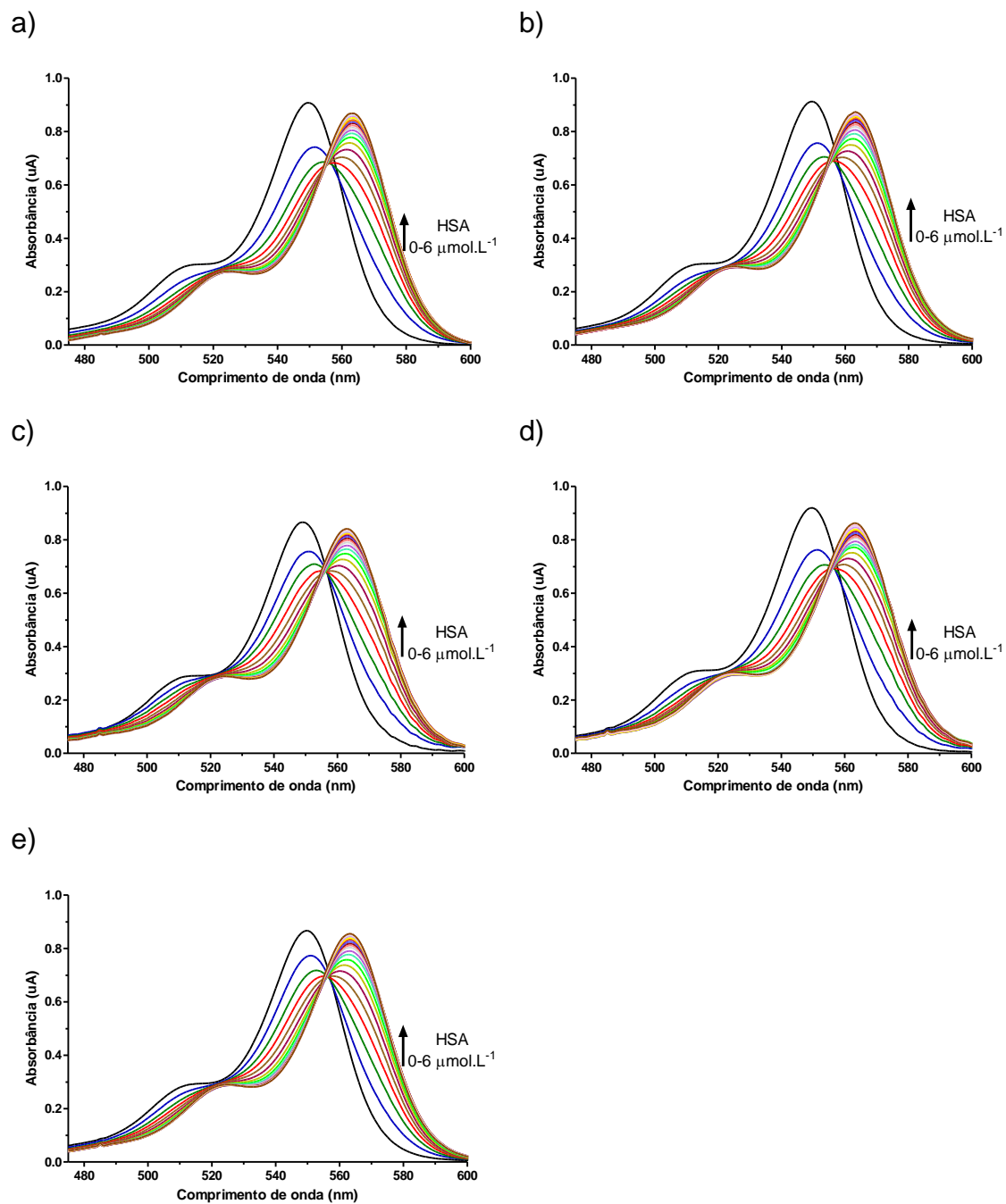


Figura 83. Espectros de absorvância no visível dos resultados da análise da interação do corante RB à proteína HSA sob a influência dos metais. a) Cu²⁺. b) Ni²⁺. c) Pb²⁺. d) Zn²⁺. e) sem influência de metais

O estudo para determinar o valor da constante de associação de cada experimento, há a necessidade de realizar antes um gráfico de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ como demonstrado na Figura 84 para então a partir dos valores dos coeficientes angulares e lineares de cada amostra, determinar o valor de K_a dessa interação.

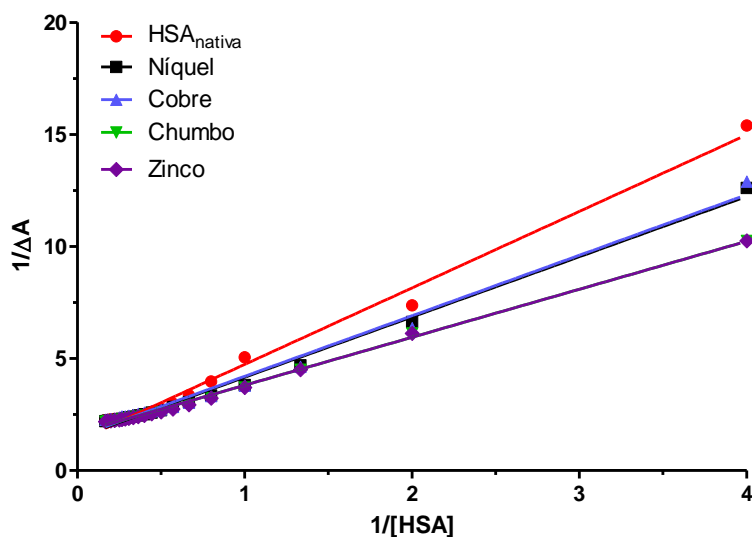


Figura 84. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ sob a influência de diferentes metais: Níquel (preto), Cobre (azul), Chumbo (verde), Zinco (roxo) e HSA_{nativa} (vermelho).

Na Tabela 20 podemos analisar que o valor da constante de associação do experimento com Cobre e Níquel tiveram um valor próximo, sendo o primeiro em torno de $4,78 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$ e o segundo em $4,81 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$, esse resultado é justificável de acordo com os trabalhos de Zhang *et al.* (2007) e Sadler *et al.* (1994), na qual informam que esses íons metálicos se interagem na mesma posição da proteína, mais precisamente nos resíduos N-terminais, situado próximo aos aminoácidos Asp1, Ala2 e His3. Nos estudos de Sadler *et al.* (1994) verificamos que a presença dos íons Cu^{+2} e Ni^{+2} na proteína HSA ocasionam a ressonância do aminoácido Lys4, sendo que essa ressonância será afetada pelos efeitos paramagnético do íon Cobre, (configuração eletrônica de orbital “d”), e diamagnético do íon Níquel.

Para as amostras que possuíam o íon Zinco, obteve um valor de K_a de $7,29 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$, bem parecido ao valor obtido nos experimentos com Chumbo, assim provavelmente devem possuir a mesma região de interação. Portanto nos

trabalhos de Sadler *et al.* (1996), Stewart *et al.*, (2003); Zhang *et al.*, (2007) relatam que o íon Zinco está localizado perto dos aminoácidos histidinas (His105, His146, His247) e asparaginas (Asp107, Asp108, Asp249), sendo que essa localização é denominada como Sítio A.

Os valores experimentais dos íons bivalentes dos metais Cobre, Níquel, Chumbo e Zinco possuíram um valor da constante de associação maior que o encontrado nos experimentos da HSA_{nativa}, sendo assim, podemos compreender que provavelmente a formação do complexo íon metal com a proteína, ocasionará alterações na conformação da proteína, o que pode afetar a cinética de ligações ao corante e pode até inibir a interação do RB à HSA, e sob a análise farmacocinético, o aumento do valor de Ka irá causar o efeito de tamponamento dos fármacos, afetará na concentração deste, e poderá de alguma forma ter um prolongamento na duração no plasma (TANG *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007).

Tabela 20. Resultados das análises do gráfico ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ para determinar os valores das constantes de associação das amostras nos diferentes metais.

	R ²	Coefficiente Angular	Coefficiente Linear	Ka (x10 ⁵ mol.L ⁻¹)
Cobre	0,9850	2,701 ± 0,079	1,506 ± 0,089	4,78
Níquel	0,9919	2,689 ± 0,057	1,475 ± 0,065	4,81
Chumbo	0,9970	2,142 ± 0,028	1,666 ± 0,031	7,29
Zinco	0,9970	2,142 ± 0,028	1,666 ± 0,031	7,29
HSA_{nativa}	0,9910	3,414 ± 0,079	1,323 ± 0,088	3,90 ± 0,08

5.4.4 Estudo Termodinâmico

Os estudos termodinâmicos nos fazem compreender o comportamento do corante RB à proteína sob a influência da temperatura, sendo assim, para este estudo foram analisadas nos valores mínimos em 20,1 °C e máximos em 40,3 °C. Porém esse intervalo foi adotado devido que são valores limites das temperaturas na qual a proteína possa adquirir e sua deformação estrutural não seja permanente, sendo assim, a HSA consegue se modificar conforme a alteração da temperatura. (AHMAD *et al.*, 2015; REZAEI-TAVIRANI *et al.*, 2006).

Na Figura 85 observamos que os resultados espectrais obtidos da análise na temperatura de 20,1 °C possui um comportamento um pouco diferente ao visualizado nos experimentos nas temperaturas de 40,3 °C e ambiente. Pois na Figura 85. Espectros de absorbância no visível dos resultados da análise da interação do corante RB à proteína HSA sob a influência da temperatura. a) 20,1 °C. b) 40,3 °C. c) Temperatura ambiente.

a verificamos que o estado saturado está acima do espectro obtido apenas da análise do RB (linha preta), entretanto o estado de saturação nos faz compreender que toda sonda esteja interagindo à HSA, porém devemos realizar os estudos envolvendo os cálculos da constante de associação, pois assim, poderemos entender melhor a interação do corante à proteína.

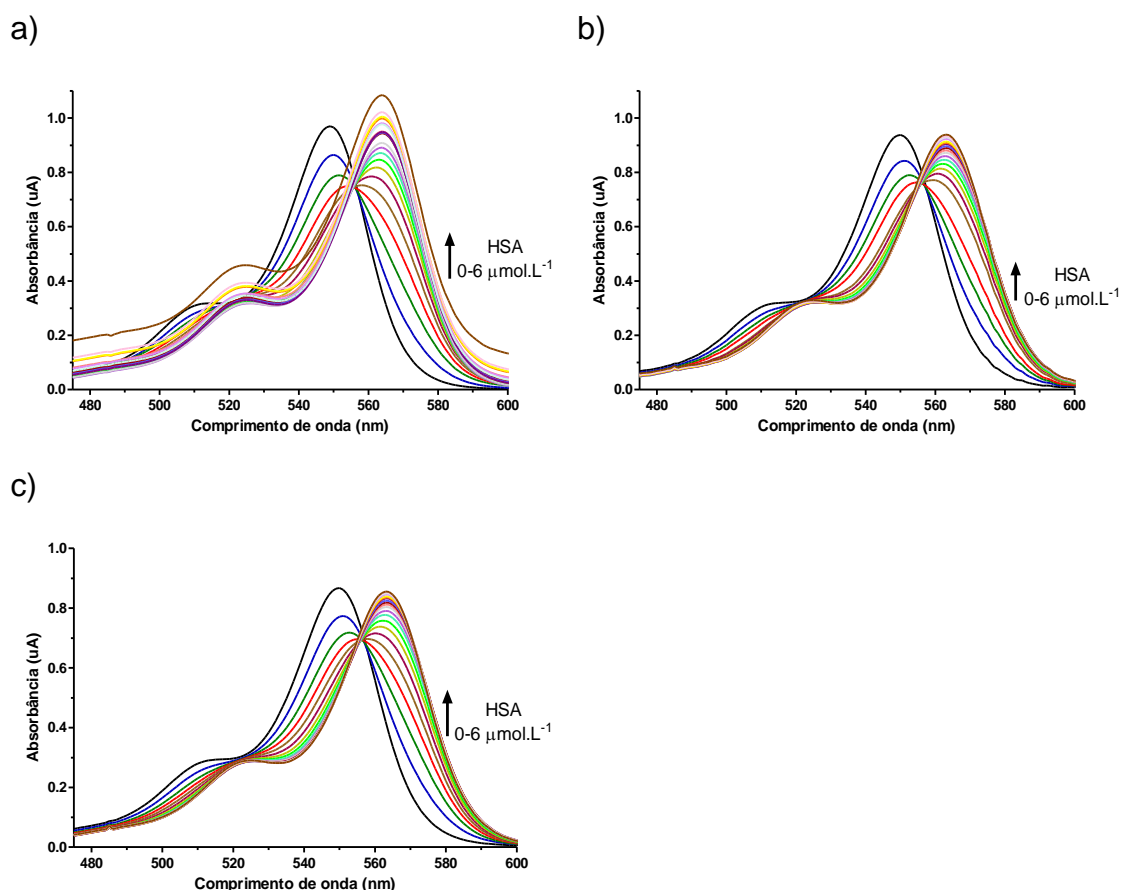


Figura 85. Espectros de absorbância no visível dos resultados da análise da interação do corante RB à proteína HSA sob a influência da temperatura. a) 20,1 °C. b) 40,3 °C. c) Temperatura ambiente.

Os cálculos para a determinação do valor de K_a são necessários primeiramente realizar um gráfico de ΔA^{-1} por $[PROTEÍNA]^{-1}$ como demonstrado

na Figura 86, pois a partir dos resultados dos coeficientes angulares e lineares obtidos das análises do gráfico, e juntamente com o auxílio da Equação 4, podemos determinar os valores correspondentes da constante de associação dos estudos termodinâmicos. E ainda na Figura 86 podemos verificar que o comportamento experimental referente à temperatura de 20,1 °C se diferencia dos outros experimentos, e provavelmente possua um valor de interação menor comparados aos outros.

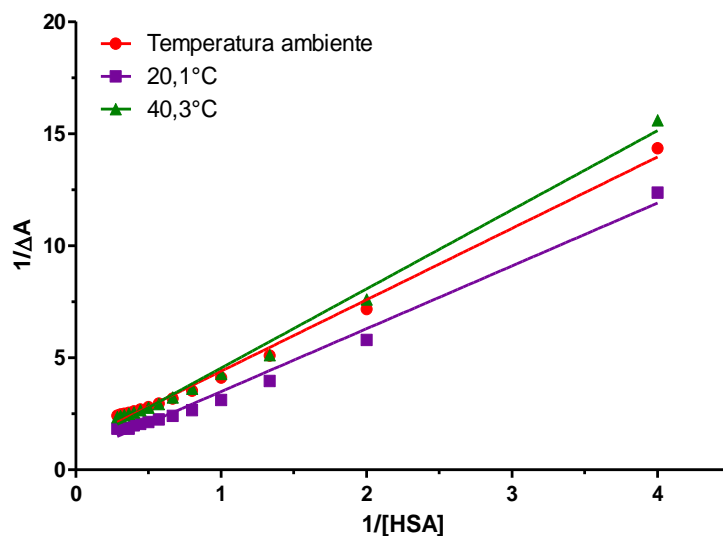


Figura 86. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ sob a influência de diferentes valores de temperatura: 20,1 °C (roxo), 40,3 °C (verde) e Temperatura ambiente (vermelho).

Na Tabela 21 estão representados os valores obtidos das análises do gráfico da Figura 86, e ainda já estão calculados os valores da constante de associação de cada amostra. Podemos compreender que a alteração da temperatura, mais precisamente a diminuição desta, faz com que o valor de K_a entre o RB à HSA tivesse um decaimento, provavelmente isso se deve ao fato de que a estrutura conformacional da proteína tenha se modificado, e assim resultando num pequeno empecilho para ocorrer a interação. Porém na temperatura de 40,3 °C não houve uma variação significativa do valor de K_a quando comparado ao experimento referente a temperatura ambiente, sendo assim, podemos compreender que essa temperatura ocasionou uma deformação na proteína, porém esta não foi tão significativa como nos casos de experimentos de desnaturação.

Tabela 21. Resultados das análises do gráfico ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ na determinação dos valores das constantes de associação das amostras sob a influência da temperatura.

Temperatura (°C)	R ²	Coefficiente Angular	Coefficiente Linear	Ka (x10 ⁵ mol.L ⁻¹)
20,1	0,9882	2,804 ± 0,088	0,689 ± 0,119	2,46
40,3	0,9924	3,531 ± 0,089	1,014 ± 0,120	3,32
Ambiente	0,9910	3,414 ± 0,079	1,323 ± 0,088	3,90 ± 0,08

Nos estudos termodinâmicos envolve ainda os cálculos dos valores das grandezas energéticas que compoñham o sistema, como os valores de *Entalpia* (6), *Gibbs* (7) e *Entropia* (8). Sendo que a determinação destes nos facilita a compreensão dos resultados da interação entre o RB à HSA, pois de acordo com Ferrier (2018) o valor da entalpia nos faz compreender se a interação absorve (endotérmico) ou libera (exotérmico) calor para ocorrer, enquanto os valores de entropia nos indicam a alteração aleatória ou de desordem dos reagentes e produtos, e por fim os estudos envolvendo o valor de energia de Gibbs nos faz compreender se a reação é favorável, desfavorável, ou se está em equilíbrio.

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (6)$$

$$\Delta G = -RT \ln k \quad (7)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8)$$

Portanto os valores dos estudos termodinâmicos demonstrados na Tabela 22, nos mostram que os dois experimentos são desfavoráveis nos valores de entalpia, devido aos processos serem endotérmicos, tendo o valor de $\Delta H = +$

1,13 kJ.mol⁻¹. Entretanto, os valores de entropia são favoráveis, devido ao valor deste ser positiva, indicando que o sistema possui um valor de grau de desordem mínimo, na qual refere-se ao estado de seu menor valor de potencial químico. Portanto com a compreensão dos resultados obtidos da entalpia e entropia de cada sistema, concluímos que esses experimentos são considerados como reversíveis e espontâneos, devido ao valor de ΔG_m possuir um sinal negativo.

Tabela 22. Resultados termodinâmicos (Entalpia, Gibbs e Entropia) do processo de interação entre o corante RB à proteína HSA nas temperaturas de 20,1 °C e 40,3°C.

Temperatura (°C)	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	ΔS_m (J.K ⁻¹ .mol ⁻¹)	ΔG_m (kJ.mol ⁻¹)
20,1	+1,13	+107,06	-30,25
40,3	+1,13	+109,29	-33,11

5.5 Aplicações do corante em diferentes proteínas

Com os estudos até agora podemos concluir que o corante possui uma grande afinidade à proteína HSA, e também devido a suas propriedades há uma ampla diversificação na sua aplicação, como por exemplo, nas áreas de novos materiais (placas solares), na identificação de agentes químicos (forças armadas), e também principalmente nas áreas médicas. Portanto, devido a esse último fator, investigou o comportamento do corante em diferentes estruturas proteicas, na qual estes representam algumas enfermidades que acarretam na deformação da geometria estrutural da HSA, como por exemplo a diabetes (HSA glicada), Parkinson e Alzheimer (HSA oxidada e HSA desnaturada), como relatados nos trabalhos de Bode *et al.* (2018), Michnik *et al.* (2018), Qiu *et al.* (2020), e Taheri *et al.* (2018).

5.5.1 Proteína HSA Glicada

De acordo com os trabalhos de Ahmed *et al.* (2019) e Stanhope (2017) as proteínas albuminas séricas humanas são suscetíveis a glicação não enzimática quando expostas a altas concentrações de glicose, devido a incorporação

nucleofílica dos açúcares redutores livres nos aminoácidos presentes nos grupos de proteínas, lipídeos e DNA. E a partir dos trabalhos de Harsha *et al.* (2013) e Singh *et al.* (2001) esse processo de glicação proteica *in vivo* é classificado como complexo, sendo que inicialmente há a formação das bases de Schiff a partir da reação dos grupos amino com glicose ou então frutose, para em seguida passar por um rearranjo de Amadori, na qual é uma conversão de aldose para cetose, como demonstrado na Figura 87. Devido ao rearranjo há a formação de α -dicarbonílos reativos, como o metilglioxal (MGO), que também é formado a partir de outros padrões de degradação, entretanto esses *Produtos Finais de Glicação Avançada* (AGEs) produzem o mesmo resultado químico, isto é, a formação de ligações cruzadas covalentes entre as proteínas (SINGH *et al.*, 2001). Entretanto esse processo de glicação de uma reação não enzimática é também conhecido como Reação de Maillard (SZKUDLAREK *et al.*, 2016).

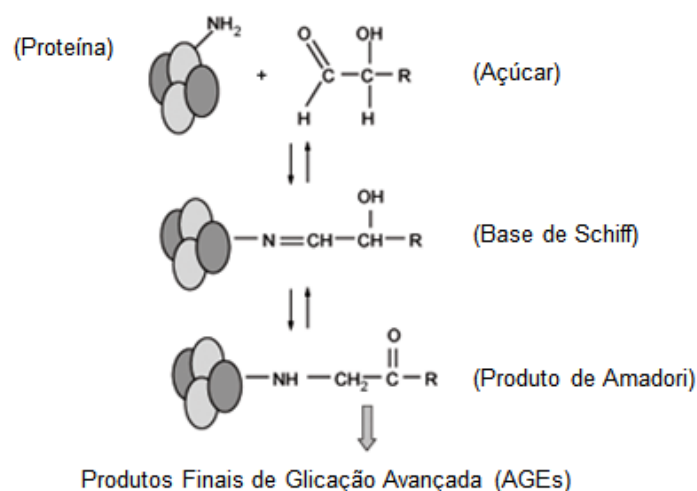


Figura 87. Estágios da glicação não enzimática das proteínas (Fonte: BEM *et al.*, 2006).

A metodologia adotada na preparação das AGEs foi eficaz, devido que é possível diferenciar as duas estruturas proteicas (glicada e não glicada), como podem visualizar na Figura 88. Sendo assim, as amostras foram analisadas no equipamento de fluorescência que inicialmente foi excitada em 295 nm (Figura 88a), sob uma sensibilidade a 50, desse modo foi possível identificar as soluções $\text{HSA}_{\text{controle}}$ e $\text{HSA}_{\text{glicada}}$, (solução controle é a que não sofreu o processo de glicação), em relação a diferenciação dos espectros de fluorescência. Para certificar realmente se ocorreu a alteração conformacional estrutural da proteína

pelo processo de glicação, realizou-se as análises de fluorescência em 350 nm (Figura 88b) sob uma sensibilidade de 100, e assim foi possível identificar que houve a formação das AGEs, devido a diferenciação significativa dos espectros.

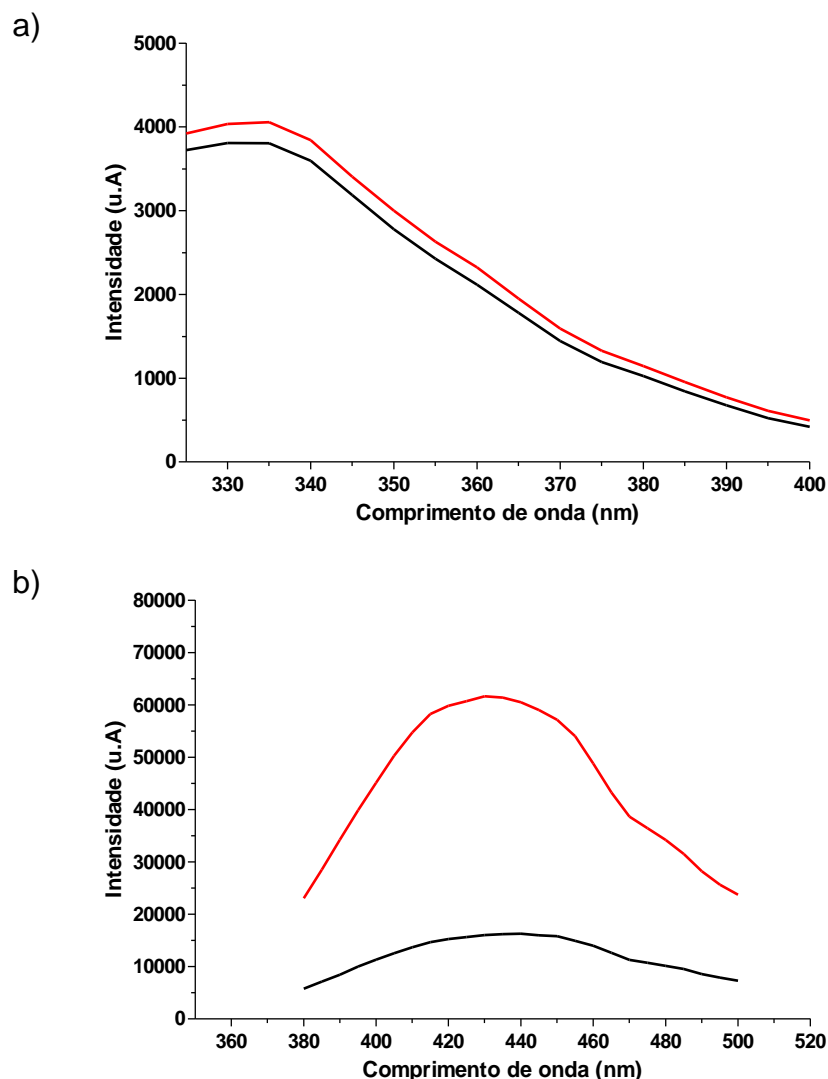


Figura 88. Resultados de fluorescência das HSA_{controle} (preto) e HSA_{glicada} (vermelho) com concentrações de $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$. a) excitação em 295 nm, e sensibilidade 50. b) excitação em 350 nm, e sensibilidade 100.

Como o processo de glicação foi adequada para se obter a proteína para o estudo, logo, realizou o mesmo processo para determinar a interação entre o RB à essa nova estrutura proteica. Sendo assim, as análises de UV-vis desse experimento estão demonstradas na Figura 89b, e observamos que o estado de saturação não obteve o mesmo valor de absorbância que a primeira análise (amostra com apenas RB). E quando comparamos com os resultados obtidos da

solução controle (Figura 89a) aparenta possuir um comportamento um pouco diferente, na qual se observa que a proteína glicada apresenta mais espectros que estão decaimento a partir da primeira análise. Porém há a necessidade de averiguar melhor esse comportamento, verificando desse modo, os valores correspondentes das constantes de associação entre o corante nessas proteínas.

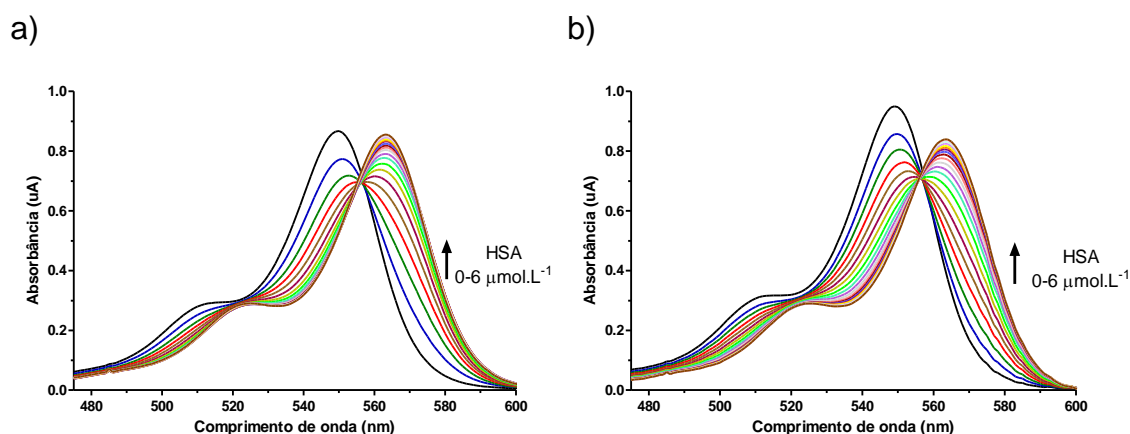


Figura 89. Espectros de absorvância no visível variando as concentrações de HSA de 0 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. a) Interação do corante RB à proteína HSA_{nativa}. b) Interação do corante RB à proteína HSA_{glicada}.

A determinação do valor da constante de associação nos faz compreender melhor como é a interação entre a sonda e a proteína, desse modo, antes de determinar o seu respectivo valor, há a necessidade de realizar a montagem de um gráfico de ΔA^{-1} por $[PROTEÍNA]^{-1}$ como demonstrado na Figura 90, sob a análise desse gráfico, a determinação dos valores dos coeficientes angulares e lineares da análise desse gráfico, nos auxilia juntamente com a Equação 4, determinar o respectivo valor de K_a . Desse modo, a constante de associação encontrada nesse experimento foi de $0,219 \times 10^5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, indicando que o corante nessa proteína possui uma menor afinidade de se interagir quando comparado a solução de HSA_{nativa} ($K_a = 3,90 \pm 0,08 \times 10^5 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

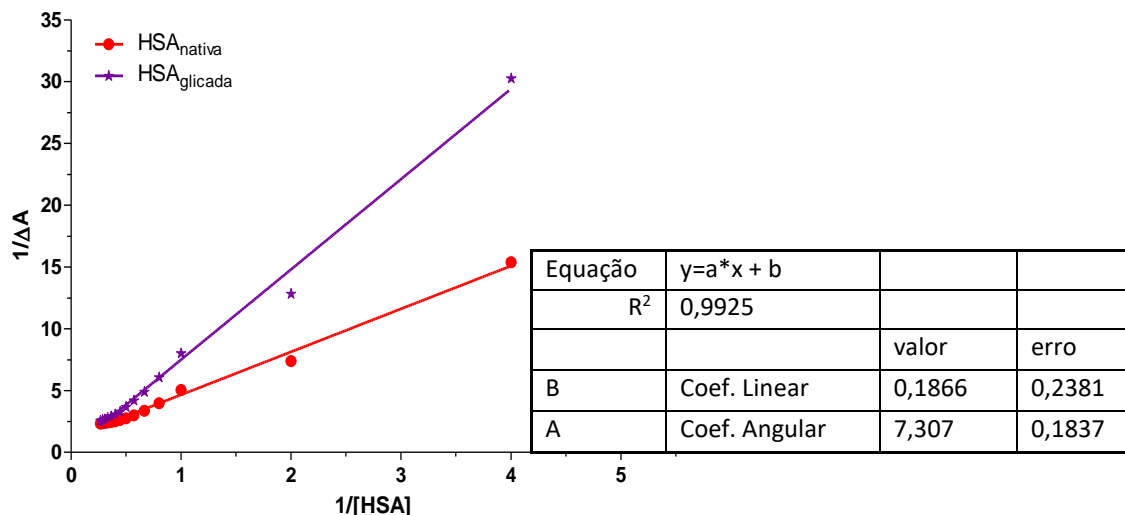


Figura 90. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência da $HSA_{glicada}$ (roxo) e HSA_{nativa} (vermelho).

O valor determinado da constante de associação envolvendo as AGEs é aceitável, devido que a diminuição da capacidade de ligação entre o ligante à proteína glicada é uma correlação exponencial com a soma das modificações dos aminoácidos lisina e arginina pertencentes ao sítio Sudlow I da HSA, diminuindo desse modo, o valor de K_a da sonda. (LIM *et al.*, 2007; SCHMITT *et al.*, 2005; SHAKLAI, *et al.*, 1984; SZKUDLAREK *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2013).

No de trabalho de Wang *et al.* (2013) essa alteração dos aminoácidos lisina e arginina se devem ao fato da formação de duas estruturas de glicose que se interagem à região do sítio Sudlow I da HSA, na qual a primeira conformação é considerada fechada (piranose), na qual possui ligações de hidrogênio com os aminoácidos tirosina150, arginina 222 e arginina 257, e o seu anel fica comprimido entre as cadeias laterais leucina 238 e alanina 291, já a segunda conformação possui uma geometria aberta, e esta está localizada próximo a lisina195. E de acordo com o trabalho de Raghav *et al.* (2016) esse processo resulta na formação de AGEs que dão origem a formação de ligações cruzadas covalentes na forma de agregados de proteína, ocasionando desse modo, a alteração na estrutura proteica.

5.5.2 Proteína HSA Oxidada

O ácido hipocloroso (HOCl) e hipobromoso (HOBr) são classificados como ácidos hipohalogenados (HOX), na qual possuam uma característica importante, são oxidantes fortes com propriedades antibacterianas potentes, logo, eles pertencem ao sistema de defesa dos mamíferos, na qual são produzidos por neutrófilos, monócitos e possivelmente macrófagos (HOCl) e eosinófilos ativados (HOBr). (PATTISON e DAVIES, 2004; WEISS *et al.*, 1986; THOMAS, 1979; ZGLICZYŃSKI *et al.*, 1968).

De acordo com os trabalhos de Pattison *et al.* (2001 e 2004) e Sivey *et al.* (2013) a modificação da conformação estrutural dos aminoácidos por HOX depende de alguns fatores, como a nucleofilicidade, abundância e também a acessibilidade inerentes às proteínas, sendo assim, as frações de aminoácidos que podem ser oxidadas por hipohalogenados são: tióis (cisteína), sulfetos (metionina), aminas (lisina) e fenóis (tirosina). E como é possível correlacionar o potencial do HOX em algumas patologias, portanto é importante compreender as modificações químicas induzidas por este composto, utilizando-se desse modo resíduos de Tyr halogenados como marcador. (PATTISON *et al.*, 2004).

A preparação da proteína oxidada pelos ácidos hipocloroso e hipobromoso seguiu os protocolos já mencionados anteriormente (seção 4.5.7.2 Ensaio de Oxidação da Proteína HSA) para então prosseguir com os estudos de interações entre essas proteínas ao corante RB. Porém, no preparo destes, houve a adição do composto metionina, essa substância foi adicionada nas soluções devido que é considerada um alvo fácil de oxidação pelo HOX para produzir sulfóxido de metionina, e ainda serve como antioxidante na reação, ocasionando desse modo, uma proteção aos outros resíduos do ataque do HOX. (HAZEN *et al.*, 1997; SIVEY *et al.*, 2013).

Os estudos de interações dessas proteínas oxidadas com o RB estão representados na Figura 91, e desse modo, podemos averiguar que tanto o experimento com HSA oxidada por ácido hipocloroso (Figura 91a) como pelo ácido hipobromoso (Figura 91b) obtiveram um comportamento bem semelhantes, na qual o estado de saturação não obteve o mesmo valor de absorvância referente ao corante RB (espectro preto), indicando desse modo, que nem toda molécula do corante se interagiu à estrutura proteica, porém esses resultados são contrários aos que são observados nos experimentos utilizando

a proteína nativa (Figura 91c), aquela que não sofreu nenhum processo de alteração estrutural, sendo que a amplitude destes espectros da absorbância no estado saturado possui a mesma amplitude do espectro referente ao RB.

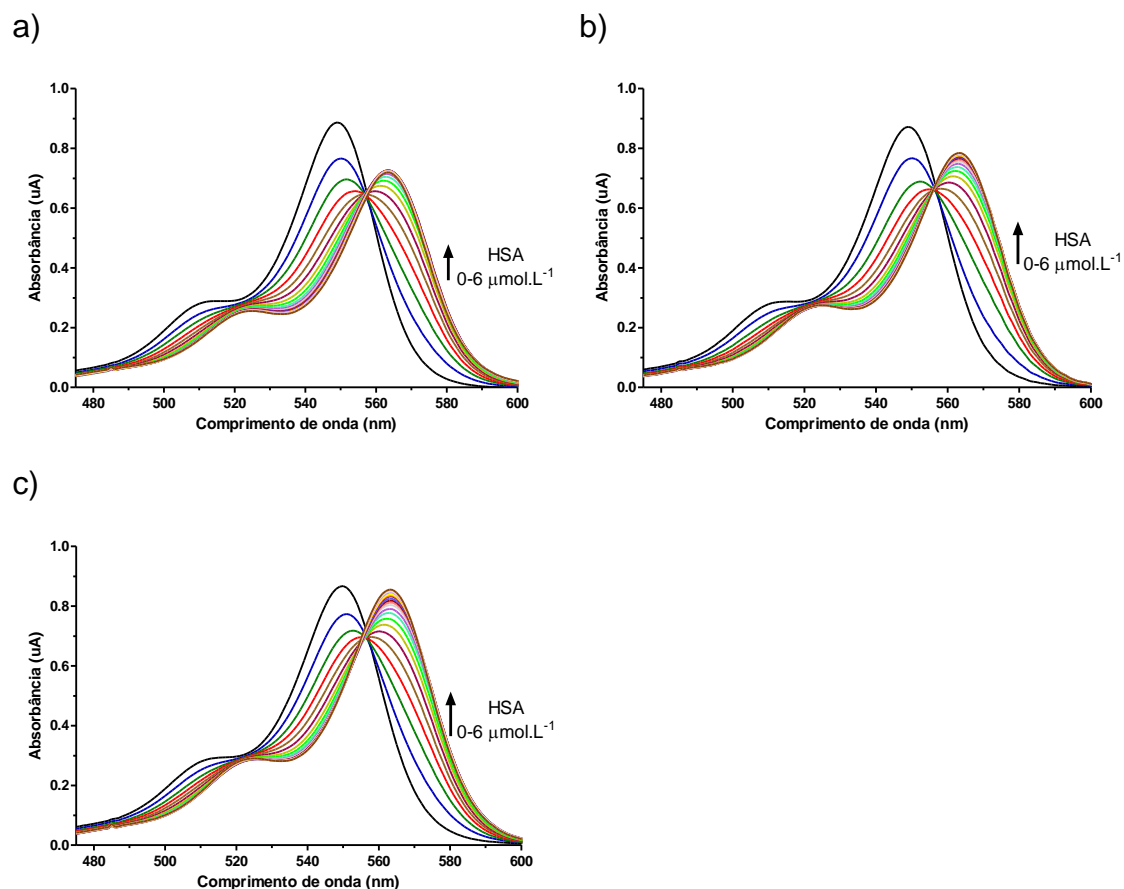


Figura 91. Resultados de interação do corante RB em diferentes estruturas da proteína HSA. a) HSA oxidada por HOCl. b) HSA oxidada por HOBr. c) HSA_{nativa}.

Para compreender melhor o comportamento do corante nas proteínas HSAs realizou os cálculos necessários para determinar o valor da constante de associação de cada amostra. Sendo assim, primeiramente plotou o gráfico de ΔA^{-1} por $[PROTEÍNA]^{-1}$ como demonstrado na Figura 92. A determinação do valor da constante de associação nos experimentos, utilizou-se os valores dos resultados dos coeficientes angulares e lineares, representados na Tabela 23, obtidos no gráfico da Figura 92, para então serem relacionados na Equação 4 e assim obter os valores de K_a de $4,83 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$ (HSA_{oxiHOCl}) e $3,83 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$ (HSA_{oxiHOBr}).

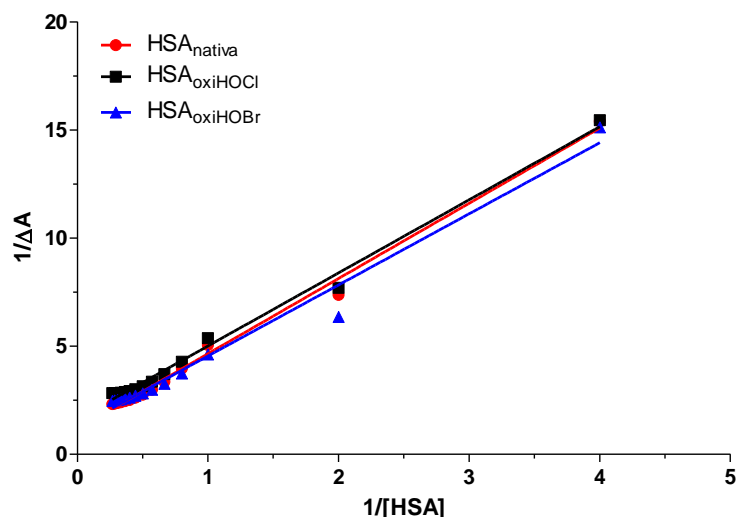


Figura 92. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência da $HSA_{oxiHOCl}$ (preto), $HSA_{oxiHOBr}$ (azul) e HSA_{nativa} (vermelho).

Tabela 23. Valores dos resultados dos coeficientes (lineares e angulares), coeficiente de correlação linear (R^2) e constantes de associação (K_a) para HSA_{nativa} , $HSA_{oxiHOCl}$ e $HSA_{oxiHOBr}$.

	Coef. Linear	Coef. Angular	R^2	K_a (mol.L ⁻¹)
HSA_{nativa}	$1,174 \pm 0,103$	$3,479 \pm 0,080$	0,99938	$(3,90 \pm 0,08) \times 10^5$
$HSA_{oxiHOCl}$	$1,632 \pm 0,102$	$3,380 \pm 0,079$	0,9935	$4,83 \times 10^5$
$HSA_{oxiHOBr}$	$1,258 \pm 0,180$	$3,288 \pm 0,139$	0,9790	$3,83 \times 10^5$

Nos trabalhos de Anraku *et al.*, (2001) e Rahming, (2014) afirmam que a alteração da estrutura proteica pelo processo de oxidação por hipohalogenos ocasiona uma alteração no valor da constante de associação entre o ligante à proteína, pois isso se deve ao fato de que o processo de oxidação altera a estrutura secundária, mas não ocasiona a desnaturação desta, mas apenas uma abertura na proteína na qual ocasionará uma maior exposição da área hidrofóbica. Ocasionalmente desse modo, uma alteração nas propriedades físicas

dos resíduos dos aminoácidos e também na conformação tridimensional da proteína. (SIVEY *et al.*, 2013).

A alteração da conformação estrutural tridimensional da proteína pode ocasionar uma alteração na afinidade da sonda à HSA. Sendo assim, recorreu aos trabalhos de Anraku *et al.* (2001) e Fehske *et al.* (1979), na qual afirmam que as modificações sofridas ao subdomínio IIA, principalmente no aminoácido triptofano 214, não afetam as interações com a sonda, desse modo, justificam os resultados de K_a não possuírem uma diferenciação muito significativa. Ainda nos mesmos trabalhos (ANRAKU *et al.*, 2001; FEHSKE *et al.*, 1979) relatam a influência do sítio Sudlow II, na qual trabalhavam com a sonda cetoprofeno, e sendo assim, a justificativa do abaixamento do valor de K_a é devido a oxidação dos aminoácidos arginina 410 e arginina 485, porém não posso afirmar que esse mesmo comportamento seja parecido com os resultados obtidos no experimento com o ácido hipobromoso, devido que nos estudos de *docking* molecular, averiguamos que a sonda em estudo (RB) não possui afinidade a essa região. Sendo assim, a oxidação da albumina provavelmente tenha efeitos individuais nas diferentes partes da proteína, e como essas partes possuem propriedades funcionais diferentes, pode-se esperar uma variedade de efeitos na função da albumina de acordo com a sonda escolhida no estudo. (Anraku *et al.*, 2001).

5.5.3 Proteína HSA Desnaturada

A desnaturação de proteínas refere-se à destruição da estrutura da molécula, sendo que essa alteração estrutural se deve à vários fatores ambientais físicos e químicos como: temperatura, desidratação, radiação ultravioleta e todos os tipos de produtos químicos tóxicos (LU *et al.*, 2005; SCHELLMAN, 2002; ZHANG *et al.*, 2011). Entretanto, a desnaturação protéica, de um modo geral, não causa a destruição da estrutura primária, mas sim da secundária, na qual está relacionada ao desdobramento e/ou agregação do estado nativo solúvel da proteína aos agregados ordenados insolúveis que são ricos em folhas β , e estes então são denominados fibras amiloides, que quando interagem com materiais intra e extracelulares, ocasionam as doenças amiloidais. (ALI *et al.*, 2019; BRANDTS *et al.*, 1975; HUANG *et al.*, 1981; MARTINS, 2013; ZHANG *et al.*, 2011)

Para certificar se o procedimento de desnaturação adotado para o preparo da proteína foi eficiente, é necessário realizar uma análise de fluorescência das amostras (controle e desnaturada), sendo que, nessa caracterização há a necessidade da adição da solução de Tioflavina T (THT), na qual esta é utilizada para identificar se ocorreu a alteração conformacional da proteína no processo de desnaturação, se liga rapidamente as fibrilas amiloides, acompanhado por um aumento dramático da fluorescência em torno de 485 nm, quando excitado em 455 nm (BAN *et al.*, 2003; FREIRE *et al.*, 2014; NAIKI *et al.*, 1990; SABATÉ *et al.*, 2007), como demonstrado na Figura 93.

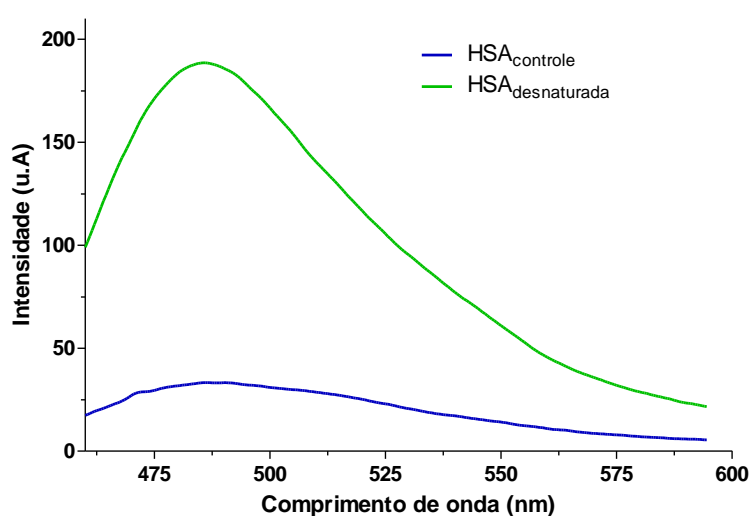


Figura 93. Espectro de fluorescência na identificação de proteína desnaturada sob a análise de Tioflavina T, tendo como resultados de HSA_{controle} em azul e HSA_{desnaturada} em verde.

Tendo a confirmação que a proteína foi desnaturada, realizou-se então os estudos envolvendo a interação do corante à essa nova estrutura. Sendo assim, na Figura 94 podemos verificar o comportamento do RB na estrutura proteica que foi desnaturada e comparar com o resultado experimental da HSA_{nativa}, na qual representa a proteína que não sofreu o processo de alteração estrutural por desnaturação. Portanto ao observar os resultados dos espectros de UV-vis dessas interações, notamos que não há uma diferenciação significativa e assim pode ser que o RB não apresenta um comportamento diferente na HSA_{desnaturada}, porém, há necessidade de investigar e interpretar melhor esses resultados

obtidos, sendo assim, realizou os estudos de determinação do valor da constante de associação entre a sonda à proteína.

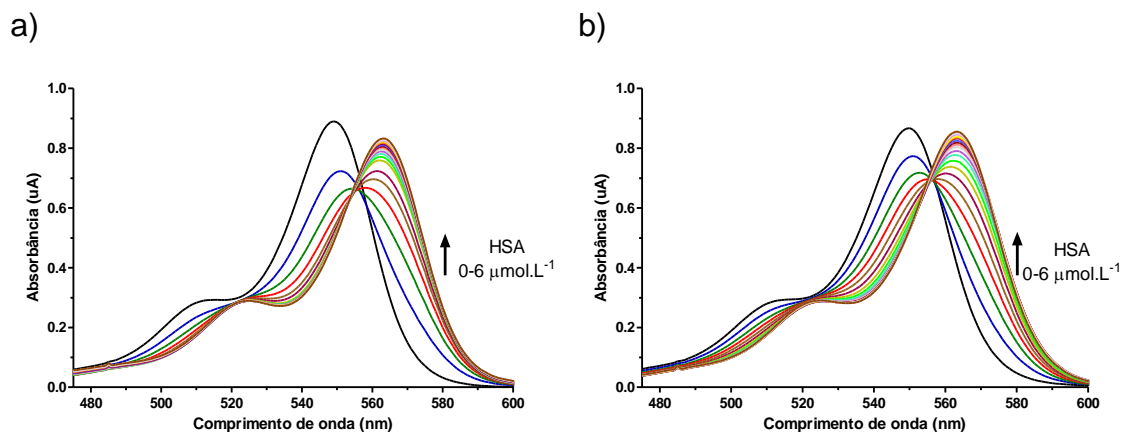


Figura 94. Resultados dos espectros no visível do corante RB na presença da proteína HSA (0 a 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). a) HSA_{desnaturada}. b) HSA_{nativa}.

A determinação do valor de K_a envolve primeiramente a plotagem do gráfico de ΔA^{-1} por $[PROTEÍNA]^{-1}$ como demonstrado na Figura 95, utilizando os resultados obtidos dos espectros da Figura 94. E com o auxílio da equação de Benesi-Hildebrand (Equação 4) podemos calcular os valores da constante de associação envolvidos nessa interação, portanto o valor de K_a obtido para o experimento com a proteína desnaturada foi de $6,85 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$, na qual representa um valor maior que no experimento com a HSA_{nativa} ($K_a = 3,90 \pm 0,08 \times 10^5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), indicando desse modo, que esse aumento da afinidade do corante na HSA significa que mais estruturas da sonda estão interagindo na proteína, porém não necessariamente na mesma região que foi estudado e determinado na HSA_{nativa}.

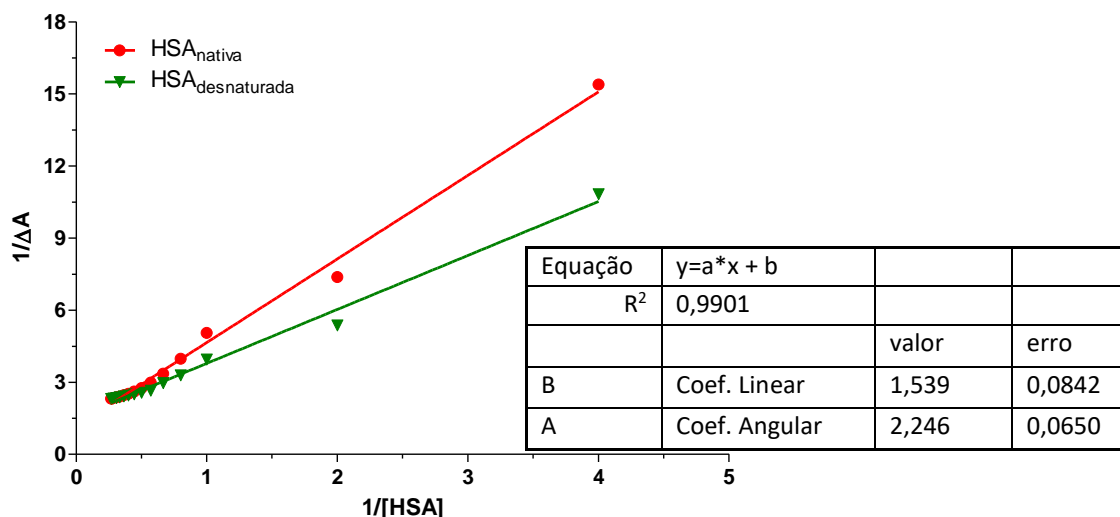


Figura 95. Gráfico da relação de ΔA^{-1} por $[HSA]^{-1}$ com seus respectivos valores de R^2 , coeficiente linear e coeficiente angular sob a influência da $HSA_{desnaturada}$ (verde) e $HSA_{controle}$ (vermelho).

A variação do valor da constante de associação obtida no experimento com a proteína desnaturada se deve ao fato da estrutura conformacional da HSA ter sofrido uma alteração denominada como estruturas amiloides, na qual esta possui uma configuração estrutural empacotada e ordenada, pois possuem uma arquitetura rica em folhas- β , ligadas por Ligações de Hidrogênio perpendiculares, formando desse modo uma estrutura *cross- β* , como demonstrado na Figura 96. (FALCÃO, 2015; KNOWLES *et al.*, 2014; LINDING *et al.*, 2004).

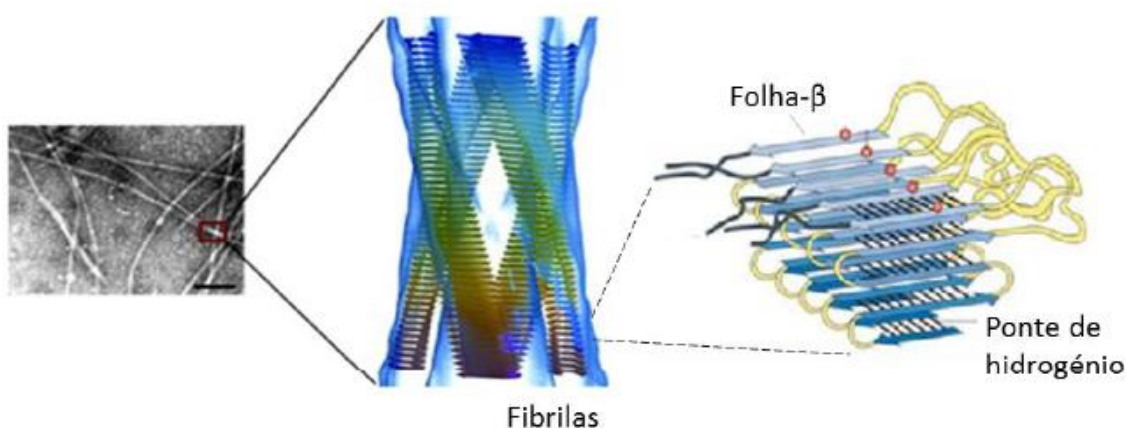


Figura 96. Filbras amiloidais e suas representações (FALCÃO, 2015).

As Ligações de Hidrogênio presentes na folha- β ocorrem entre o carbonil da cadeia principal (-C=O) e a amina secundária da cadeia principal (-NH) em outra cadeia da proteína, e o distanciamento entre as camadas folha- β fica em torno de 0,47 nm (DeBUTTS, 2019). E de acordo com o trabalho de Falcão (2015) a maior parte das interações entre os resíduos de aminoácidos são intramoleculares, enquanto no estado amilóide predominam as interações intermoleculares, justificando desse modo, o aumento da interação da molécula RB na estrutura proteica.

6. CONCLUSÕES

Nos estudos de *docking* molecular, observou que o corante RB possui afinidade aos sítios de Sudlow I, FA1 e FA6 da proteína HSA, sendo que o FA6 foi considerado um sítio preferencial para a formação do complexo. Essa informação se deve em relação aos resultados obtidos das poses juntamente com os seus respectivos valores energéticos, que para esse sítio de ligação obteve o confômero de menor energia em comparação aos outros sítios. Essa mesma análise foi observada tanto para os estudos utilizando o software Autodock como no GOLD.

Nos estudos do *docking* molecular, em ambas metodologias, o sítio Sudlow II foi caracterizado como uma região na qual o corante RB possui baixa afinidades, devido que os resultados obtidos a esse sítio de ligação obtiveram variâncias nas estruturas conformacionais das poses e também nos valores energéticos.

Como os estudos de *docking* molecular não envolveram a influência de estruturas de ácidos graxos, assim os estudos experimentais seguiram os mesmos padrões, realizando desse modo o experimento sem a presença de ácidos graxos. Porém foi realizado um experimento específico na qual havia a presença de estruturas de ácidos graxos (ácido linoleico) para a realização do experimento de competição de sítio, a este observou que a presença desse ácido graxo não influencia a formação do complexo.

Os estudos experimentais de competição de sítios corresponderam com os resultados obtidos nos cálculos computacionais, sendo assim o corante possui afinidades aos sítios Sudlow I, FA1 e FA6, e nenhuma afinidade ao sítio Sudlow II da HSA. Porém ao sítio Sudlow II foi necessário realizar uma contraprova,

devido que os estudos iniciais a esse sítio de ligação foram com a substância Ibuprofeno, que de acordo com a literatura possui duas regiões de afinidades. Então realizou dois testes, uma com a substância Diazepam para comprovar a não afinidade do corante RB ao sítio Sudlow II, e o outro com a substância Diflunisal, para comprovar a afinidade do corante RB ao sítio FA6.

Os resultados experimentais (valores de K_a) obtiveram os mesmos padrões dos resultados obtidos nos estudos de *docking* molecular. Desse modo, o corante RB possui maior afinidade a região de FA6, devido ao seu baixo valor de K_a , resultado este obtido nos experimentos de competições dos sítios ativos.

Devido à alta afinidade do corante RB à proteína HSA, foi averiguado a quantidade proporcional de RB interagindo à HSA. Para esse estudo foram adotados os protocolos de Job's Plot, assim, foi determinado que 6 (seis) estruturas moleculares de RB estão interagindo a 1 (uma) única estrutura da proteína HSA.

Nos experimentos sobre o comportamento do RB à alteração do meio reacional, foram verificados que o corante na proteína, possui um comportamento semelhante quando este mesmo RB está presente em solventes menos polares, como: DMF, THF e Acetona. E também foi observado que o aumento da acidez do meio reacional está diretamente relacionado ao valor da constante de associação entre o RB à HSA, assim, se haver um aumento na acidez do meio reacional, haverá um aumento no valor de K_a .

E por fim, nos estudos relacionados a alteração da estrutura molecular da proteína HSA, foram realizados estudos de processos de glicação, oxidação e desnaturação, pois estes representam situações de enfermidade, como: diabetes, Alzheimer e parkinson. Os resultados desses estudos nos revelaram que há uma diminuição no valor da constante de associação entre o corante RB à estrutura de proteína que sofreu o processo de glicação. Enquanto na proteína que sofreu o processo de desnaturação, foram observados um processo inverso da glicação, resultando desse modo no aumento da formação do complexo proteína-ligante. E por fim o processo de oxidação, tanto por HOCl como HOBr, não influenciam significativamente na formação da interação entre RB à HSA.

Diante destas conclusões, o corante RB possui uma característica bem interessante, que é o fato dele possuir uma alta afinidade à proteína HSA. Essa particularidade possui um lado positivo, por exemplo na área médica

(identificação e/ou tratamento de alguma patologia). O corante RB pode ser utilizado na presença de outros fármacos, pois a presença destes não afetam significativamente a ligação do corante à proteína, como foi observado nos experimentos de competição de sítios. E também o corante pode ser utilizado em pacientes que apresentam algumas doenças, como Alzheimer, Parkinson e Diabetes, pois o RB ainda consegue ligar na proteína mesmo havendo a alteração da estrutura proteica ocasionada por essas patologias.

7. PERSPECTIVAS

7.1 Tese

Como o corante RB está sendo estudado em tratamentos medicinais (relatado na parte de Aplicações), desse modo este trabalho auxilia na compreensão da interação desse ligante na proteína HSA. Porém ainda há a necessidade de realizar estudos mais aprofundados, tanto teórico como experimental, em relação aos sítios.

Nos estudos de *docking* ainda é possível averiguar se o corante RB possui afinidades a outros sítios de interação da HSA, pois de acordo com o Teste de Job's Plot pelo menos há 6 estruturas desse corante ligando à proteína. Ou então verificar se é possível o mesmo sítio acomodar duas ou mais estruturas de RB.

Na parte experimental ainda pode realizar estudos com outras técnicas que possam averiguar se existe algum sítio preferencial para a formação do complexo ou se há outros sítios que possa haver afinidades entre o corante à proteína.

7.2 Aluno

Tenho o interesse em realizar um pós doutorado para aprimorar as técnicas aprendidas no doutorado e também se possível, aprender novas técnicas para abranger o conhecimento e a compreensão do tema.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOUD, R.; CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Interaction of triterpenoids with human serum albumin: A review. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 260–270, 2017.
- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2017.
- AHMAD, B. *et al.* Thermal induced unfolding of human serum albumin isomers: Assigning residual α helices to domain II. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 447–452, 2015.
- AHMED, F.; HUSAIN, Q. Suppression in advanced glycation adducts of human serum albumin by bio-enzymatically synthesized gold and silver nanoformulations: A potential tool to counteract hyperglycemic condition. **Biochimie**, v. 162, p. 66–76, 2019.
- AL-HARTHI, S.; IZABELA, J.; ELIGIUSZ, M. Towards the functional high-resolution coordination chemistry of blood plasma human serum albumin (A) (C). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 198, n. 110716, 2019.
- ALEXANDRINO, F. J. R. **Terapia fotodinâmica com rosa de bengala em nanoformulação com alfa-ciclodextrina contra suspensões de Streptococcus mutans**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- ALI, M. S. *et al.* Modulation of amyloid fibril formation of plasma protein by saffron constituent “safranal”: Spectroscopic and imaging analyses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 529–535, 2019.
- ANRAKU, M. *et al.* Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 5, p. 632–639, 2001.
- ARIGA, G. G. *et al.* Interactions between epinastine and human serum albumin: Investigation by fluorescence, UV–vis, FT–IR, CD, lifetime measurement and molecular docking. **Journal of Molecular Structure**, v. 1137, p. 485–494, 2017.
- ASCENZI, P. *et al.* Heme-based catalytic properties of human serum albumin. n.1, p. 1–7, 2015.
- ASCENZI, P. *et al.* The drug-dependent five- to six-coordination transition of the heme-Fe atom modulates allosterically human serum heme-albumin

- reactivity. **Rendiconti Lincei**, v. 28, p. 207–215, 2017.
- BALAEI, F.; GHOBADI, S. Hydrochlorothiazide binding to human serum albumin induces some compactness in the molecular structure of the protein: A multi-spectroscopic and computational study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 162, p. 1–8, 2019.
- BAN, T. *et al.* Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 19, p. 16462–16465, 2003.
- BARREIRO, E. J. *et al.* Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 300–310, 1997.
- BATISTELA, V. R. *et al.* Protolytic fluorescein species evaluated using chemometry and DFT studies. **Dyes and Pigments**, v. 86, n. 1, p. 15–24, 2010.
- BEM, A. F. DE; KUNDE, J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes mellitus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 185–191, 2006.
- BERTOZO, L. DE C. *et al.* Oxidative alteration of Trp-214 and Lys-199 in human serum albumin increases binding affinity with phenylbutazone: A combined experimental and computational investigation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, 2018.
- BEZKROVNAYA, O. N. *et al.* The influence of lead (II) ions introduced into the subphase on the stability of mixed “polyamic acid + surfactant” monolayers and manufacturing of dye-containing Langmuir-Blodgett polymeric films. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 4, p. 655–666, 2006.
- BHATTACHARYA, A. A.; GRU, T.; CURRY, S. Crystallographic Analysis Reveals Common Modes of Binding of Medium and Long-chain Fatty Acids to Human Serum Albumin. **Journal Molecular of Biology**, v.303, n.5, p.721-732, 2000.
- BIRJANDI, A. P. *et al.* Application of solid phase microextraction for quantitation of polyunsaturated fatty acids in biological fluids. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 24, p. 12022–12029, 2014.
- BODE, D. C. *et al.* Serum Albumin’s Protective Inhibition of Amyloid- β Fiber Formation Is Suppressed by Cholesterol, Fatty Acids and Warfarin. **Journal**

- of Molecular Biology**, v. 430, n. 7, p. 919–934, 2018.
- BOS, O. J. M. *et al.* Location and characterization of the suramin binding sites of human serum albumin. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, n. 7, p. 1595–1599, 1990.
- BOTELHO, F. D. *et al.* Comparação entre métodos para determinação de cargas atômicas em sistemas moleculares: a molécula n-{n-(pterina-7-il)carbonilglicil}-l-tirosina (NNPT). **Química Nova**, v. 44, n. 2, p. 161–171, 2021.
- BOTO, R. A. *et al.* NCILOT4: A new step towards a fast quantification of noncovalent interactions. **ChemRxiv**, v. 6498, n. 2010, p. 1–31, 2020.
- BRANDTS, J. F.; HALVORSON, H. R.; BRENNAN, M. Consideration of the Possibility That the Slow Step in Protein Denaturation Reactions is Due to Cis-Trans Isomerism of Proline Residues. **Biochemistry**, v. 14, n. 22, p. 4953–4963, 1975.
- BUCK, S. T. G. *et al.* Photodynamic Efficiency of Xanthene Dyes and Their Phototoxicity against a Carcinoma Cell Line: A Computational and Experimental Study. **Journal of Chemistry**, v. 2017, 2017.
- CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE SOFTWARE. **GOLD Configuration File User Guide: A Component of the CSD-Discovery Suite**. Cambridge, p. 1-80, 2019.
- CARTER, DANIEL C.; HO, J. X. Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 153–203, 1994.
- CARUSO, Í. P. *et al.* Binding of antioxidant flavone isovitexin to human serum albumin investigated by experimental and computational assays. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 98, p. 100–106, 2014.
- CHOI, J. K. *et al.* Interactions of very long-chain saturated fatty acids with serum albumin. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 7, p. 1000–1010, 2002.
- CHRISTIANSON, A. M. **Organoantimony and organophosphorus compounds for chemical sensing: toward designed fluorimetric and colorimetric responses**. Tese (Doctor of Philosophy in Chemistry) - Chemistry Department, Texas A&M University, Texas, 2017.
- COLMENAREJO, G. In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin. **Medicinal Research Reviews**, v. 23, n. 3, p. 275–301, 2003.
- CONTRERAS-GARCÍA, J. *et al.* regions. **Journal of Chemical Theory and**

- Computation**, v. 7, n. 3, p. 625–632, 2012.
- COSTA, A. C. B. P. DA *et al.* Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a light-emitting diode. **Brazilian Oral Research**, v. 24, n. 4, p. 413–418, 2010.
- DAR, A. M.; MIR, S. Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 08, n. 02, p. 8–10, 2017.
- DEBUTTS, B. L. **Plant Proteins as Multifunctional Additives in Polymer Composites**. Tese (Doctor of Philosophy in Macromolecular Science and Engineering) - Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, USA, 2019.
- FALCÃO, A. DOS S. **Agregação e formação de amilóides por proteínas neuroinflamatórias S100A8 e S100A9 e implicações em processos neurodegenerativos**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2015.
- FANALI, G. *et al.* Human serum albumin: From bench to bedside. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, p. 209–290, 2012.
- FEHSKE, K. J. *et al.* The lone tryptophan residue of human serum albumin as part of the specific warfarin binding site. Binding of dicoumarol to the warfarin, indole and benzodiazepine binding sites. **Molecular Pharmacology**, v. 16, n. 3, p. 778–789, 1979.
- FERRIER, D. R. **Biochemistry**. 7ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2017.
- FREIRE, S. *et al.* Photophysical study of Thioflavin T as fluorescence marker of amyloid fibrils. **Dyes and Pigments**, v. 110, p. 97–105, 2014.
- FUENTES-LEMUS, E. *et al.* Free Radical Biology and Medicine Binding of rose bengal to lysozyme modulates photooxidation and cross-linking reactions involving tyrosine and tryptophan. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 143, p. 375–386, 2019.
- GAUGLITZ, G. **Spectroscopy**. Eberhard Karls Universität Tübingen, Baden-Württemberg, Germany, 2017.
- GENHEDEN, S. *et al.* Computational Chemistry and Molecular Modelling Basics. **Chemical Biology**, n.3, p.1-38, 2017.
- GERASIMOVA, M. A. *et al.* Fluorescence and photoinduced proton transfer in

- the protolytic forms of fluorescein: Experimental and computational study. **Dyes and Pigments**, v. 173, n. 107851, p. 1-9, 2020.
- GHUMAN, J. *et al.* Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin. **Journal of Molecular Biology**, v. 353, n. 1, p. 38–52, 2005.
- GÓES FILHO, L. DA S. **Estudo do efeito de solventes nas propriedades espectroscópicas do antibiótico norfloxacin: absorção , fluorescência estacionária e resolvida no tempo.** Tese (Doutorado em Física) - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2010.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: Aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avancados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.
- GUIZADO, T. R. C. **Estudos computacionais da interação de porfirinas e seus complexos de ferro com albumina sérica humana.** Dissertação (Mestrado em Física) - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2008.
- GUNDRY, R. L. *et al.* Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 1, n. 1, p. 73–88, 2007.
- HAGE, D. S.; SENGUPTA, A. Characterisation of the binding of digitoxin and acetyldigitoxin to human serum albumin by high-performance affinity chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 724, n. 1, p. 91–100, 1999.
- HAMZA, A.; WEI, N. N.; ZHAN, C. G. Ligand-based virtual screening approach using a new scoring function. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 4, p. 963–974, 2012.
- HARSHA, P. S. C. S. *et al.* Bioresource Technology Characterization of phenolics , in vitro reducing capacity and anti-glycation activity of red grape skins recovered from winemaking by-products. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 263–268, 2013.
- HAZARIKA, Z.; RAJKHOWA, S.; JHA, A. N. **Role of Force Fields in Protein Function Prediction.** India: IntechOpen, 2020.
- HAZEN, S. L.; HEINECKE, J. W. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density

- lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 9, p. 2075–2081, 1997.
- HO, S. *et al.* Comparison of anti-glycation capacities of several herbal infusions with that of green tea. **Food Chemistry**, v. 122, p. 768–774, 2010.
- HOLLAND, E. J. *et al.* Efficacy of topical ophthalmic drugs in the treatment of dry eye disease: A systematic literature review. **Ocular Surface**, v. 17, n. 3, p. 412–423, 2019.
- HU, Y. J. *et al.* Binding of berberine to bovine serum albumin: Spectroscopic approach. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 8, p. 3827–3832, 2010.
- HUANG, K. S. *et al.* Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 8, p. 3802–3809, 1981.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, p. 33–38, 1996.
- IBN-MOHAMMED, T. *et al.* Perovskite solar cells: An integrated hybrid lifecycle assessment and review in comparison with other photovoltaic technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, n. June, p. 1321–1344, 2017.
- ISABELLA MIRANDA DA SILVA. **Interação in vitro entre compostos orgânicos de arsênio(v) e proteína carreadora empregando técnicas espectroscópicas**. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.
- ISLAM RABBI, S. N.; MD. DIDARUZZAMAN, M. Z. S.; MD. ZAKIR SULTAN, S. Study of Interaction between Febuxostat and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy. **Journal of Bioanalysis & Biomedicine**, v. 07, n. 05, p. 164–170, 2015.
- JARDINE, J. G. *et al.* Biologia computacional molecular e suas aplicações na agricultura. **Tecnologias da informação e comunicação e suas relações com a agricultura.**, p. 101–117, 2014.
- JOHNSON, E. R. *et al.* Revealing noncovalent interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 18, p. 6498–6506, 2010.
- KABIR, E. *et al.* Solar energy: Potential and future prospects. **Renewable and**

- Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. September 2016, p. 894–900, 2018.
- KEMP, J. A. *et al.* A possible link between polyunsaturated fatty acids and uremic toxins from the gut microbiota in hemodialysis patients: A hypothesis. **Hemodialysis International**, v. 23, n. 2, p. 189–197, 2019.
- KHADTARE, S. *et al.* Silver nanoparticles loaded ZnO photoelectrode with Rose Bengal as a sensitizer for dye sensitized solar cells. **Inorganic Chemistry Communications**, 2019.
- KHAIBRAKHMANOVA, D.; NIKIFOROVA, A.; SEDOV, I. Binding constants of substituted benzoic acids with bovine serum albumin. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 2, 2020.
- KHAN, S.; NEWPORT, D.; CALVÉ, S. LE. Gas Detection Using Portable Deep-UV Absorption. **Sensors**, v. 19, n. 23, p. 5210, 2019.
- KHATUN, S.; RIYAZUDDEEN; RABBANI, G. A comparative biophysical and in-silico studies on the interactions of ticlopidine hydrochloride with two serum albumins. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 131, p. 9–20, 2019.
- KNOWLES, T. P. J.; VENDRUSCOLO, M.; DOBSON, C. M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 384–396, 2014.
- KOZUCH, S.; MARTIN, J. M. L. Halogen bonds: Benchmarks and theoretical analysis. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 4, p. 1918–1931, 2013.
- KUFAREVA, I.; ABAGYAN, R. Methods of protein structure comparison. **Methods in Molecular Biology**, v. 857, p. 231–257, 2012.
- LAMBERTS, J. J. M.; NECKERS, D. C. Rose Bengal and Non-Polar Derivatives: The Birth of Dye Sensitizers for Photooxidation+. **Zeitschrift für Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences**, v. 39, n. 4, p. 474–484, 1984.
- LAUGHLIN-TOTH, S. **To Affinity & Beyond : Exploring Sequence Selectivity of Small Molecules for the DNA Minor Groove**. Tese (Doctor of Philosophy in Science) - College of Arts and Sciences, Georgia State University, Georgia, USA, 2016.
- LI, C. *et al.* Current multifunctional albumin-based nanoplatfoms for cancer multi-mode therapy. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2020.

- LI, Y. *et al.* Binding of the bioactive component Jatrorrhizine to human serum albumin. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1722, n. 1, p. 15–21, 2005.
- LIM, P. S.; CHENG, Y. M.; YANG, S. M. Impairments of the biological properties of serum albumin in patients on haemodialysis. **Nephrology**, v. 12, n. 1, p. 18–24, 2007.
- LINDING, R. *et al.* A comparative study of the relationship between protein structure and β -aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 342, n. 1, p. 345–353, 2004.
- LIU, L. *et al.* Two Distant Catalytic Sites Are Responsible for C2c2 RNase Activities. **Cell**, v. 168, n. 1–2, p. 121–134.e12, 2017.
- LIU, Y. *et al.* CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein–ligand blind docking. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 1, p. 138–144, 2020.
- LOPES, P.E.M.; GUVENCH, O.; MACKERELL JUNIOR, A. D. Molecular modeling of proteins: Second edition. **Molecular Modeling of Proteins: Second Edition**, v. 1215, p. 1–474, 2014.
- LOUN, B.; HAGE, D. S. Characterization of thyroxine—albumin binding using high-performance affinity chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 579, n. 2, p. 225–235, 1992.
- LU, Y.; LI, X. Progress in study of protein denaturation and thermodynamic parameters of denaturation. **Progress in Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 905–910, 2005.
- 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, 2019.
- MARTINHO, J. M. G. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 52, n. 3, p. 44–46, 1994.
- MARTINS, P. M. True and apparent inhibition of amyloid fibril formation. **Prion**, v. 7, n. 2, p. 136–139, 2013.
- MAYERHÖFER, T. G.; PAHLOW, S.; POPP, J. The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. **ChemPhysChem**, v. 21, p. 2029–2046, 2020.
- MÉNDEZ-ARDOY, A.; REINA, J. J.; MONTENEGRO, J. Synthesis and

- Supramolecular Functional Assemblies of Ratiometric pH Probes. **Chemistry - A European Journal**, v. 26, n. 34, p. 7516–7536, 2020.
- MENG, X. Y., ZHANG, H. X., MEZEI, M., CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*. **Current Computer Aided Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011.
- MICHNIK, A. *et al.* Differential scanning calorimetry study of early and advanced stages in Parkinson's disease using human blood serum. **Thermochimica Acta**, v. 662, p. 64–68, 2018.
- MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEUX, J. P. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. **Journal of Molecular Biology**, v. 12, n. 1, p. 88–118, 1965.
- MOREIRA, M. B. *et al.* Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Quimica Nova**, v. 38, n. 2, p. 227–232, 2015.
- MORGON, NELSON H; DESOUZA, A. Modelagem Molecular da Interação entre Fármacos e a Albumina do Soro Humano (HSA). **Centro de Computação em Engenharia e Ciências Newsletter**, p. 4–6, 2019. doi: 10.5281/zenodo.3265044.
- MORRIS, G. M. *et al.* **User Guide: AutoDock Version 4.2**, 2012. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.363.3063&rep=rep1&type=pdf>>
- MU, X. *et al.* The nature of chirality induced by molecular aggregation and self-assembly. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 212, p. 188–198, 2019.
- MUKHOPADHYAY, M. a Brief Survey on Bio Inspired Optimization Algorithms for Molecular Docking. **International Journal of Advances in Engineering & Technology**, v. 7, n. 3, p. 868–878, 2014.
- NAIKI, H. *et al.* Methods in laboratory investigation. Fluorometric examination of tissue amyloid fibrils in murine senile amyloidosis: Use of the fluorescent indicator, Thioflavine T. **Laboratory Investigation**, v. 62, n. 6, p. 768–773, 1990.
- NECKERS, D. C. Rose Bengal. **Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 1–29, 1989.
- NETO, G. L. B. *et al.* Interações Competitivas De Complexos De Rutênio

- Contendo Dimetilsulfóxido E Ligantes N-Heterocíclicos Com Albumina De Soro Humano. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 261–270, 2020.
- NOZAWA, K.; SCHNEIDER, T. R.; CRAMER, P. Core Mediator structure at 3.4 Å extends model of transcription initiation complex. **Nature**, v. 545, n. 7653, p. 248–251, 2017.
- OWENS. **Method for using rose bengal for detection of chemical warfare agents**. Depositante: United States of America as represented by the Secretary of the Air Force, Wright-Patterson AFB, OH (US). US n. 10564074-B2. Depósito: 2 de Março de 2016. Concessão: 18 de Fevereiro de 2020.
- PARKER, A. J. The effects of solvation on the properties of anions in dipolar aprotic solvents. **Quarterly Reviews, Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 163–187, 1962.
- PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 10, p. 1453–1464, 2001.
- PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. Kinetic Analysis of the Reactions of Hypobromous Acid with Protein Components: Implications for Cellular Damage and Use of 3-Bromotyrosine as a Marker of Oxidative Stress. **Biochemistry**, v. 43, n. 16, p. 4799–4809, 2004.
- PELLOSI, D. S. **Estudos Físico-Químicos do corante Eritrosina B e seus derivados ésteres visando aplicações fotodinâmicas**. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2012.
- PENG, M.; SHI, S.; ZHANG, Y. Influence of Cd²⁺, Hg²⁺ and Pb²⁺ on (+) -catechin binding to bovine serum albumin studied by fluorescence spectroscopic methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 85, p. 190–197, 2012.
- PEREIRA, P. C. S. **Estudos físicos-químicos do corante Rosa de Bengala B e seus derivados ésteres visando aplicações fotodinâmicas**. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2013.
- PEREZ RUIZ DE GARIBAY, A. *et al.* Respiratory and metabolic acidosis correction with the ADVanced Organ Support system. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 7, n. 1, 2019.

- PETERS, T. J. **All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications**. 1. ed. San Diego: Academic Press - INC, 1996.
- PIETRANCOSTA, N. *et al.* Rose Bengal analogs and vesicular glutamate transporters (VGLUTs). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 18, p. 6922–6933, 2010.
- PRABAHARAN, M. **Characterization of tissue scaffolds drug release profiles**. In: Tomlins P (ed) *Characterization and design of tissue scaffolds*. Elsevier Woodhead Publishing, Amsterdam, pp 149–165, 2016.
- PRIETO-MONTERO, R. *et al.* Exploring BODIPY Derivatives as Singlet Oxygen Photosensitizers for PDT. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, n. 3, p. 458–477, 2020.
- QIN, J. *et al.* Colon cancer cell treatment with rose bengal generates a protective immune response via immunogenic cell death. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 2, p. 1-9, 2017.
- QIU, H. *et al.* Comprehensive glycomic analysis reveals that human serum albumin glycation specifically affects the pharmacokinetics and efficacy of different anticoagulant drugs in diabetes. **Diabetes**, v. 69, n. 4, p. 760–770, 2020.
- RABBANI, G.; AHN, S. N. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 979–990, 2019.
- RAGHAV, A.; AHMAD, J.; ALAM, K. Impact of glycation on structural and antioxidant function of human serum albumin: Relevance in diabetic complications. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 10, n. 2, p. 96–101, 2016.
- RAHMING, V. Effects of Oxidation on Protein-Nanoparticle Interactions. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 2, p. 172–185, 2014.
- REICHARDT, C.; WELTON, T. **Solvents and Solvent Effects in organic Chemistry**. 4 ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH&Co.KGaA, 2011.
- REZAEI-TAVIRANI, M. *et al.* Conformational study of human serum albumin in pre-denaturation temperatures by differential scanning calorimetry, circular dichroism and UV spectroscopy. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 5, p. 530–536, 2006.
- SABATÉ, R.; SAUPE, S. J. Thioflavin T fluorescence anisotropy: An alternative

- technique for the study of amyloid aggregation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 360, n. 1, p. 135–138, 2007.
- SADLER, P. J.; TUCKER, A.; VILES, J. H. Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni²⁺ and Cu²⁺ binding site of serum albumins: Comparison with Co²⁺, Cd²⁺ and Al³⁺. **European Journal of Biochemistry**, v. 220, n. 1, p. 193–200, 1994.
- SADLER, P. J.; VILES, J. H. ¹H and ¹¹³Cd NMR Investigations of Cd²⁺ and Zn²⁺ Binding Sites on Serum Albumin: Competition with Ca²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 15, p. 4490–4496, 1996.
- SAMPAIO, P. G. V.; GONZÁLEZ, M. O. A. Photovoltaic solar energy: Conceptual framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, n. 2016, p. 590–601, 2017.
- SANCHES, R. N. F. **Estudo da interação de metalofármacos de dirutênio-anti-inflamatórios com as proteínas séricas transferrina e albumina.** Tese (doutorado em Ciências Química) - Departamento de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- SHELLMAN, J. A. Fifty years of solvent denaturation. **Biophysical Chemistry**, v. 96, n. 2–3, p. 91–101, 2002.
- SCHMITT, A. *et al.* Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: Side chain modifications and fluorescence characteristics. **Analytical Biochemistry**, v. 338, n. 2, p. 201–215, 2005.
- SCHULTE, K. W. *et al.* Structural Basis for Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Gene Activation. **Structure**, v. 25, n. 7, p. 1025- 1033, 2017.
- SHAH, A. **Thin-film silicon solar cells.** In: Soteris K. (ed) McEvoy's Handbook of Photovoltaics: Fundamentals and Applications. Elsevier, pp 235-307, 2017.
- SHAKLAI, N.; GARLICK, R. L.; BUNN, H. F. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 6, p. 3812–3817, 1984.
- SHAO, Q.; HALL, C. K. Allosteric effects of gold nanoparticles on human serum albumin. **Nanoscale**, v. 9, n. 1, p. 380–390, 2017.
- SHEN, P. *et al.* Recognition and quantification of HSA: A fluorescence probe across A-helices of site I and site II. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 247, p. 587–594, 2017.

- SI, D. *et al.* Deep Learning to Predict Protein Backbone Structure from High-Resolution Cryo-EM Density Maps. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–22, 2020.
- SILVA, L. R. B. **Inativação fotodinâmica de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando rosa de bengala adsorvido em quitosana.** Trabalho de Conclusão de Curso (graduação bacharel em Química) -Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.
- SINGH, R. *et al.* Advanced glycation end-products: A review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129–146, 2001.
- SIVEY, J. D. *et al.* Role of lysine during protein modification by HOCl and HOBr: Halogen-transfer agent or sacrificial antioxidant? **Biochemistry**, v. 52, n. 7, p. 1260–1271, 2013.
- SKOOG, D. A.; HANLAN, J.; WEST, D. M. **Principles of Instrumental Analysis**, 7 ed. Boston: Cengage Learning, 2016.
- ŚLEDŹ, P.; CAFLISCH, A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 48, p. 93–102, 2018.
- ŚLIWIŃSKA-HILL, U.; WIGLUSZ, K.; SLIWI NSKA-HILL, U. The interaction between human serum albumin and antidiabetic agent-exenatide: determination of the mechanism binding and effect on the protein conformation by fluorescence and circular dichroism techniques-Part I. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.**, p.1-9, 2019. doi: 10.1080/07391102.2019.1630007.
- SOUZA, A. R. DE *et al.* Elucidação da quiralidade induzida na molécula dansilglicina na complexação com a proteína albumina do soro humano (HSA). **Química Nova**, v. 42, n. 2, p. 135–142, 2019.
- SRIVASTAVA, R.; ALAM, M. S. Influence of micelles on protein's denaturation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 252–261, 2020.
- STANHOPE, K. . the Controversy. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 53, n. 1, p. 52–67, 2017.
- STEWART, A. J. *et al.* Interdomain zinc site on human albumin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3701–3706, 2003.

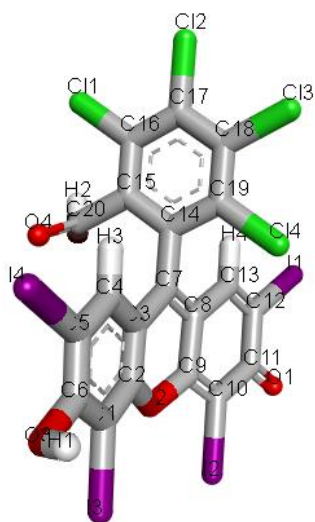
- SUGIO, S. *et al.* Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Engineering**, v. 12, n. 6, p. 439–446, 1999.
- SWINEHART, D. F. The Beer-Lambert law. **Journal of Chemical Education**, v. 39, n. 7, p. 333–335, 1962.
- SZKUDLAREK, A. *et al.* Alteration of human serum albumin tertiary structure induced by glycation. Spectroscopic study. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 153, p. 560–565, 2016.
- TADJBAKSHSH, S. Human Security: Concepts and Implications. **Les Etudes du Cerieri**, p. 1–77, 2005. doi: 10.1177/0094306117744805I.
- TAHERI, R. A. *et al.* Assembly of gold nanorods on HSA amyloid fibrils to develop a conductive nanoscaffold for potential biomedical and biosensing applications. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- TANG, J.; LUAN, F.; CHEN, X. Binding analysis of glycyrrhetic acid to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modeling. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 9, p. 3210–3217, 2006.
- THEE, M. **Armaments, arms control and disarmament**. 2 ed. Paris: UNESCO. 2016.
- THOMAS, E. L. Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: Nitrogen-chlorine derivatives of bacterial components in bactericidal action against *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 23, n. 2, p. 522–531, 1979.
- TURBAY, M. B. E. *et al.* Effect of dye localization and self-interactions on the photosensitized generation of singlet oxygen by rose bengal bound to bovine serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 141, p. 275–282, 2014.
- VANOMMESLAEGHE, K.; GUVENCH, O.; JR, A. D. M. Macromolecular mechanics. **NIH Public Access**, v. 20, n. 20, p. 3281–3292, 2014.
- VIANA, J. DE O. *et al.* Drug discovery and computational strategies in the multitarget drugs era. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. Special Issue, p. 1–25, 2018.
- WAGNER-WYSIECKA, E. *et al.* Ion recognition properties of new pyridine-2,6-dicarboxamide bearing propeller-like pendant residues: multi-spectroscopic approach. **Monatshefte fur Chemie**, v. 151, n. 3, p. 331–343, 2020.
- WANG, R. Validity and Reliability of Benesi-Hildebrand Method. **Acta Physico-**

- Chimica Sinica**, v. 23, n. 9, p. 1353–1359, 2007.
- WANG, S. *et al.* Effect of Rapamycin Microspheres in Sjögren Syndrome Dry Eye: Preparation and Outcomes. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 27, n. 8, p. 1357–1364, 2019.
- WANG, Y. *et al.* Structural mechanism of ring-opening reaction of glucose by human serum albumin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 22, p. 15980–15987, 2013.
- WEISS, S. . ET. AL. Brominating Oxidants Generated by Human Eosinophils. **Science**, v. 234, n. 4773, p. 200–203, 1986.
- WLODAWER, A.; LI, M.; DAUTER, Z. High-Resolution Cryo-EM Maps and Models: A Crystallographer's Perspective. **Structure**, v. 25, n. 10, p. 1589-1597.e1, 2017.
- 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 - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1295, n. 2, p. 147–157, 1996.
- YE, W. L. *et al.* Improving docking-based virtual screening ability by integrating multiple energy auxiliary terms from molecular docking scoring. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 9, p. 4216–4230, 2020.
- YEGGONI, D. P. *et al.* Binding and molecular dynamics studies of 7-hydroxycoumarin derivatives with human serum albumin and its pharmacological importance. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, p. 1117–1131, 2014.
- ZEYADA, H. M. *et al.* Spectral, structural, optical and dielectrical studies of UV irradiated Rose Bengal thin films prepared by spin coating technique. **Physica B: Condensed Matter**, v. 506, p. 75–82, 2017.
- ZGLICZYŃSKI, J. M. *et al.* Myeloperoxidase of Human Leukaemic Leucocytes: Oxidation of Amino Acids in the Presence of Hydrogen Peroxide. **European Journal of Biochemistry**, v. 4, n. 4, p. 540–547, 1968.
- ZHANG, G. *et al.* Human serum albumin interaction with paraquat studied using spectroscopic methods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 1, p. 23–29, 2007.
- ZHANG, H. *et al.* Toxic effects of different charged metal ions on the target - Bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and**

- Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, n. 1, p. 523–527, 2011.
- ZHANG, X. F.; ZHANG, I.; LIU, L. Photophysics of halogenated fluoresceins: Involvement of both intramolecular electron transfer and heavy atom effect in the deactivation of excited states. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 3, p. 492–498, 2010.
- ZHENG, X. T.; LAI, Y. C.; TAN, Y. N. Nucleotide-derived theranostic nanodots with intrinsic fluorescence and singlet oxygen generation for bioimaging and photodynamic therapy. **Nanoscale Advances**, v. 1, n. 6, p. 2250–2257, 2019.
- ZHU, J. *et al.* Fluorescent analogues of human α -calcitonin gene-related peptide with potent vasodilator activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 3–5, 2020.
- ZSILA, F. 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, 2013.

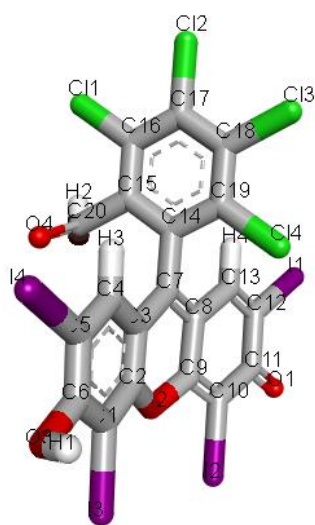
APÊNDICE

Figura S1. Coordenadas do confômero (-2,34 kcal.mol⁻¹) obtido nos estudos de *docking* molecular ao sítio de Sudlow I, utilizando o software Autodock.



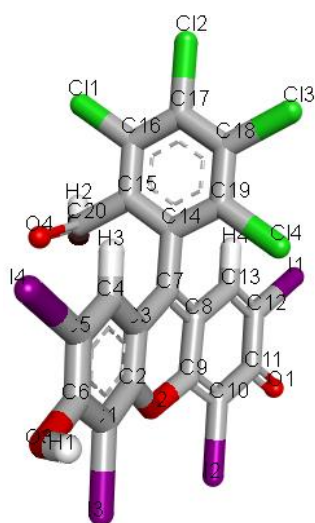
	x	y	z
C1	-3.296830	-1.194700	-2.005750
C2	-3.519540	-0.758593	-3.319290
C3	-2.453580	-0.676433	-4.226350
C4	-1.171940	-1.099740	-3.829490
C5	-0.945645	-1.502000	-2.505820
C6	-2.006760	-1.549700	-1.594380
C7	-0.018665	-1.140850	-4.839280
C8	-0.321132	-0.965326	-6.138110
C9	-1.736210	-0.511849	-6.533100
C10	-2.075420	-0.443631	-7.844330
C11	-1.026260	-0.746643	-8.931450
C12	0.410317	-1.129250	-8.529400
C13	0.740033	-1.232230	-7.220480
I1	1.853900	-1.494930	-10.010200
I2	-4.030220	0.088503	-8.395820
I3	-5.454560	-0.216740	-3.926810
I4	-1.664260	-2.155690	0.386741
O1	-1.342500	-0.679234	-10.146800
O2	-2.705360	-0.140319	-5.539170
O3	-4.388020	-1.273510	-1.085300
H1	-4.584960	-2.195160	-0.899792
C14	1.390190	-1.592400	-4.410660
C15	2.249500	-0.690731	-3.768560
C16	3.531050	-1.101110	-3.378710
C17	3.953480	-2.413620	-3.630080
C18	3.093520	-3.316250	-4.271390
C19	1.811500	-2.905140	-4.660750
C20	3.623430	-4.964320	-4.586510
O4	1.155060	1.018830	-2.436680
O5	2.073970	1.787740	-4.434970
H2	3.022600	1.935610	-4.466050
H3	0.058985	-1.778270	-2.185670
H4	1.755870	-1.503870	-6.933430

Figura S2. Coordenadas do confômero (-2,26 kcal.mol⁻¹) obtido nos estudos de *docking* molecular ao sítio de FA1, utilizando o software Autodock.



	x	y	z
C1	-1.31771	-3.03158	1.33685
C2	-0.35755	-2.38569	0.543783
C3	-0.16582	-0.9992	0.682431
C4	-0.99743	-0.25649	1.53038
C5	-1.9772	-0.90222	2.29528
C6	0.960928	-0.29087	-0.07928
C7	-2.12473	-2.29182	2.21172
C8	1.87114	-1.06017	-0.70247
C9	1.63076	-2.5736	-0.82418
C10	2.59745	-3.3645	-1.35152
C11	3.89823	-2.74036	-1.89274
C12	4.10227	-1.21574	-1.83452
C13	3.15321	-0.42885	-1.27674
I1	5.85317	-0.35953	-2.6159
I2	2.31733	-5.44406	-1.44164
I3	-1.55066	-5.11363	1.2075
I4	-3.22021	0.211698	3.56903
O1	4.7921	-3.47732	-2.38392
O2	0.390821	-3.16702	-0.40658
O3	-3.10162	-2.95715	3.01611
H1	-2.76477	-3.06059	3.90896
C14	1.17167	1.22908	0.057362
C15	2.20833	1.72215	0.861003
C16	2.40069	3.10478	0.985841
C17	1.55639	3.99435	0.307037
C18	0.520194	3.50106	-0.49746
C19	0.328463	2.11727	-0.62282
C20	3.13592	0.746295	1.60788
O4	3.52905	-0.30698	1.04253
O5	3.55248	1.03917	2.9448
H2	2.8564	1.52053	3.39748
H3	-0.88194	0.825445	1.59505
H4	3.29595	0.650914	-1.23389

Figura S3. Coordenadas do confômero (-3,25 kcal.mol⁻¹) obtido nos estudos de *docking* molecular ao sítio de FA6, utilizando o software Autodock.

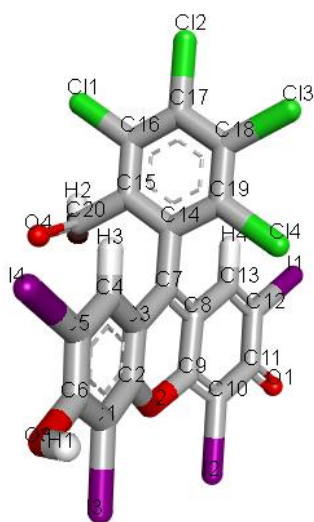


	x	y	z
C1	3.52123	-1.79537	-3.04012
C2	3.03497	-2.62735	-2.02311
C3	2.67775	-2.08814	-0.77878
C4	2.74589	-0.69644	-0.58239
C5	3.26518	0.128605	-1.58892
C6	3.65321	-0.41981	-2.81831
C7	4.42814	0.819819	-4.32524
C8	2.24072	-0.07002	0.722202
C9	1.54894	-0.85765	1.56465
C10	1.48902	-2.37222	1.31162
C11	0.701996	-3.1516	2.09328
C12	-0.069	-2.53219	3.27537
C13	0.053505	-1.02668	3.56913
I1	0.811325	-0.24195	2.76778
I2	-0.95742	-0.18958	5.20887
I3	-0.79562	-3.2584	4.00099
I4	0.540727	-5.20876	1.70119
O1	2.26641	-2.9858	0.269307
O2	2.32253	1.45087	0.95013
O3	1.14786	2.2067	1.05868
H1	1.22071	3.59103	1.26644
C14	2.46968	4.21875	1.36509
C15	3.64574	3.46372	1.2572
C16	3.57075	2.07894	1.04993
C17	5.0473	1.12999	0.91387
Cl1	5.21375	4.25218	1.38203
C18	2.56186	5.9566	1.62544
Cl2	-0.25509	4.53963	1.40135
C19	-0.22522	1.51678	0.94963
Cl3	-1.06784	1.64247	1.87543
Cl4	-0.54173	0.73479	-0.20529
C20	-0.15174	-0.13771	-0.11628
O4	2.85021	-4.69177	-2.35954
O5	3.8857	-2.35273	-4.30643
H2	4.62721	-2.95292	-4.18999
H3	3.36749	1.19976	-1.41495
H4	0.899297	0.824741	2.97402

Figura S4. Representação da sequência do alinhamento dos aminoácidos referentes as estruturas PDB 2BX8 e PDB 2BXE.

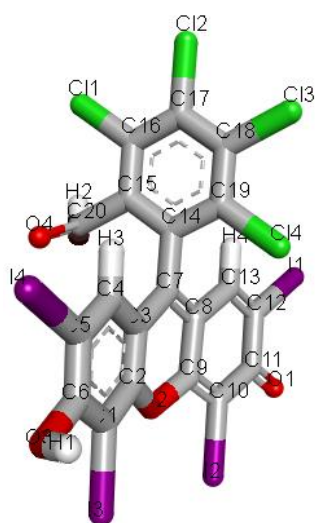
	1	11	21	31	41		
RMSD: ca							
2BX8, chain A	1	SEVAHRFKDL	GEENFKALVL	I AFAQYLQQC	PFEDHVKLVN	EVTEFAKTCV	
2BXE, chain A	1	SEVAHRFKDL	GEENFKALVL	I AFAQYLQQC	PFEDHVKLVN	EVTEFAKTCV	
	51	61	71	81	91		
RMSD: ca							
2BX8, chain A	51	ADESAENC DK	SLHTLFGDKL	CTVATLRETY	GEMADCCAKQ	EPERNECFLQ	
2BXE, chain A	51	ADESAENC DK	SLHTLFGDKL	CTVA.....	ADCCAKQ	EPERNECFLQ	
	101	111	121	131	141		
RMSD: ca							
2BX8, chain A	101	HKDDNP NLPR	LVRPEVDVMC	TAFHDNEETF	LKKYLYE IAR	RHPYFYAPEL	
2BXE, chain A	92	HKDDNP NLPR	LVRPEVDVMC	TAFHDNEETF	LKKYLYE IAR	RHPYFYAPEL	
	151	161	171	181	191		
RMSD: ca							
2BX8, chain A	151	LFFAKRYKAA	FTECCQAADK	AACLLPK LDE	LRDEGKASSA	KQRLK CASLQ	
2BXE, chain A	142	LFFAKRYKAA	FTECCQAADK	AACLLPK LDE	LRDEGKASSA	KQRLK CASLQ	
	201	211	221	231	241		
RMSD: ca							
2BX8, chain A	201	KFGERAFKAW	AVARLSQRFP	KAFAEVS KL	VTDLT KVHTE	CCHGDLLECA	
2BXE, chain A	192	KFGERAFKAW	AVARLSQRFP	KAFAEVS KL	VTDLT KVHTE	CCHGDLLECA	
	251	261	271	281	291		
RMSD: ca							
2BX8, chain A	251	DDRADLAKYI	CENQDSISSK	LKECCEKPLL	EKSHCIAEVE	NDEMPADLPS	
2BXE, chain A	242	DDRADLAKYI	CENQDSISSK	LKECCEKPLL	EKSHCIAEVE	NDEMPADLPS	
	301	311	321	331	341		
RMSD: ca							
2BX8, chain A	301	LAADFVESKD	VCKNYAEAKD	VFLGMFLY EY	ARRHPDYSVV	LLLRLAKTYE	
2BXE, chain A	292	LAADFVESKD	VCKNYAEAKD	VFLGMFLY EY	ARRHPDYSVV	LLLRLAKTYE	
	301	311	321	331	341		
RMSD: ca							
2BX8, chain A	301	LAADFVESKD	VCKNYAEAKD	VFLGMFLY EY	ARRHPDYSVV	LLLRLAKTYE	
2BXE, chain A	292	LAADFVESKD	VCKNYAEAKD	VFLGMFLY EY	ARRHPDYSVV	LLLRLAKTYE	
	351	361	371	381	391		
RMSD: ca							
2BX8, chain A	351	TTLEKCCAAA	DPHECYAKVF	DEFKPLVEEP	QNLIKQNC EL	FEQLGEYKFQ	
2BXE, chain A	342	TTLEKCCAAA	DPHECYAKVF	DEFKPLVEEP	QNLIKQNC EL	FEQLGEYKFQ	
	401	411	421	431	441		
RMSD: ca							
2BX8, chain A	401	NALLVRYTKK	VPQVSTPTLV	EVS RN LGKVG	SKCCKHPEAK	RMPCAEDYLS	
2BXE, chain A	392	NALLVRYTKK	VPQVSTPTLV	EVS RN LGKVG	SKCCKHPEAK	RMPCAEDYLS	
	451	461	471	481	491		
RMSD: ca							
2BX8, chain A	451	VVLNQLCVLH	EKTPVSDRVT	KCTESLVNR	RPCFSALEVD	ETYPK EFN A	
2BXE, chain A	442	VVLNQLCVLH	EKTPVSDRVT	KCTESLVNR	RPCFSALEVD	ETYPK EFN A	
	501	511	521	531	541		
RMSD: ca							
2BX8, chain A	501	E T F .	TFHADI	CTLSEKERQI	KKQTALVELV	KHKPKATKEQ	LKAVMDDFAA
2BXE, chain A	492	E . T F	TFHADI	CTLSEKERQI	KKQTALVELV	KHKPKATKEQ	LKAVMDDFAA
	551	561	571				
RMSD: ca							
2BX8, chain A	550	FVEKCKADD	KETCF AEEGK	KLVAASQAA			
2BXE, chain A	541	FVEKCKADD	KETCF AEEGK	KLVAASQAA			

Figura S5. Coordenadas do resultado $-52,13 \text{ kJ.mol}^{-1}$ obtidos pelo *docking* molecular para o sítio Sudlow I, utilizando o software GOLD.



	x	y	z
C1	7.17740	-7.03520	5.26220
C2	6.91890	-8.26820	5.73000
C3	5.82340	-8.58270	6.51380
C4	4.91220	-7.54760	6.78790
C5	5.16060	-6.28080	6.30970
C6	6.26210	-5.98100	5.49460
C7	5.63230	-9.90930	6.99220
C8	6.59410	-10.86800	6.70870
C9	7.69430	-10.51380	5.85530
C10	8.63090	-11.45300	5.48840
C11	8.52190	-12.80640	5.84940
C12	7.45830	-13.12400	6.82290
C13	6.54810	-12.19360	7.20030
I1	10.27040	-10.88240	4.32070
I2	7.42780	-15.02830	7.63420
I3	3.81900	-4.73390	6.82100
I4	8.83640	-6.64470	4.02650
O1	9.29750	-13.68710	5.38330
O2	7.86420	-9.24810	5.44770
O3	6.54010	-4.79460	4.99440
H1	7.37440	-4.49130	5.36300
C14	4.54110	-10.19460	7.94080
C15	3.17150	-10.06920	7.63610
C16	2.20580	-10.44640	8.57100
C17	2.58480	-10.90120	9.79910
Cl1	0.49410	-10.33660	8.17650
C18	3.91910	-11.02600	10.14170
Cl2	1.35230	-11.33520	10.97810
C19	4.86780	-10.66430	9.20950
Cl3	4.38490	-11.63950	11.72410
Cl4	6.57150	-10.79500	9.63130
C20	2.76880	-9.51220	6.33280
O4	3.16000	-10.29570	5.32300
O5	2.14700	-8.46700	6.18480
H2	1.86980	-7.89790	7.02250
H3	4.02350	-7.74180	7.36440
H4	5.75360	-12.46830	7.87370

Figura S6. Coordenadas do resultado $-58,19 \text{ kJ.mol}^{-1}$ obtidos pelo *docking* molecular para o sítio FA1, utilizando o software GOLD.

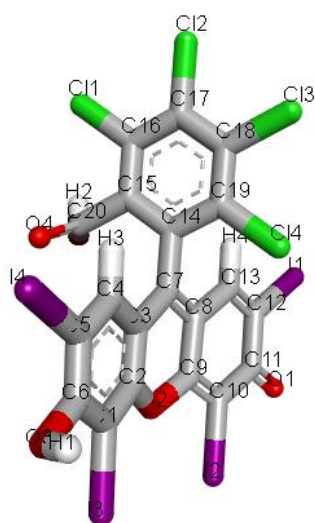


	x	y	z
C1	2.5148	8.1924	9.3547
C2	2.2985	9.4894	9.0773
C3	1.4637	9.9343	8.0682
C4	0.7725	8.9575	7.3298
C5	0.9791	7.6251	7.6073
C6	1.8089	7.188	8.6503
C7	1.3062	11.3267	7.8198
C8	2.0495	12.2281	8.5679
C9	2.8716	11.7298	9.6356
C10	3.5677	12.5938	10.4497
C11	3.4508	13.9898	10.3414
C12	2.7027	14.4786	9.1662
C13	2.0339	13.6261	8.3522
I1	2.7456	16.51	8.7696
I2	4.8276	11.8315	11.9357
I3	3.7568	7.5921	10.945
I4	-0.0042	6.1874	6.4155
O1	3.9695	14.7716	11.1864
O2	3.0246	10.4113	9.8232
O3	2.03	5.9302	8.973
H1	1.8654	5.3797	8.2025
C14	0.5273	11.7781	6.653
C15	-0.7623	12.3396	6.7287
C16	-1.3886	12.8202	5.5773
C17	-0.7699	12.7117	4.3672
C18	0.4904	12.1543	4.249
C19	1.1089	11.6936	5.3914
C13	1.2803	12.0479	2.6798
C14	2.7042	10.9615	5.2618
C20	-1.4534	12.391	8.0289
O4	-0.6516	12.8551	8.9923
O5	-2.6186	12.0589	8.2114
H2	-3.0137	12.0431	9.1841
H3	0.083	9.2464	6.5546
H4	1.4556	14.0165	7.5317

Figura S7. Representação da sequência do alinhamento dos aminoácidos referentes as estruturas PDB 2BXE e PDB 2BXF.

RMSD: ca	1	11	21	31	41		
2BXF, chain A	1	SEVAHRFKDL	GEENFKALVL	I AFAQYLQQC	PFEDHVKLVN	EVTEFAKTCV	
2BXE, chain A	1	SEVAHRFKDL	GEENFKALVL	I AFAQYLQQC	PFEDHVKLVN	EVTEFAKTCV	
RMSD: ca	51	61	71	81	91		
2BXF, chain A	51	ADESAENC DK	SLHTLFGDKL	CTVA	TLRETY	GEMADCCAKQ	EPERNECFLQ
2BXE, chain A	51	ADESAENC DK	SLHTLFGDKL	CTVA	TLRETY	ADCCAKQ	EPERNECFLQ
RMSD: ca	101	111	121	131	141		
2BXF, chain A	101	HKDDNP NLPR	LVRPEVDVMC	TAFHDNEETF	LKKYLYE IAR	RHPYFYAPEL	
2BXE, chain A	92	HKDDNP NLPR	LVRPEVDVMC	TAFHDNEETF	LKKYLYE IAR	RHPYFYAPEL	
RMSD: ca	151	161	171	181	191		
2BXF, chain A	151	LFFAKRYKAA	FTECCQAADK	AACLLPKLDE	LRDEGKASSA	KQRLKCASLQ	
2BXE, chain A	142	LFFAKRYKAA	FTECCQAADK	AACLLPKLDE	LRDEGKASSA	KQRLKCASLQ	
RMSD: ca	201	211	221	231	241		
2BXF, chain A	201	KFGERAFKAW	AVARLSQRFP	KAEF AEVSKL	VTDLTKVHTE	CCHGDLLECA	
2BXE, chain A	192	KFGERAFKAW	AVARLSQRFP	KAEF AEVSKL	VTDLTKVHTE	CCHGDLLECA	
RMSD: ca	251	261	271	281	291		
2BXF, chain A	251	DDRADLAKYI	CENQDSISSK	LKECCEKPLL	EKSHCIAEVE	NDEMPADLPS	
2BXE, chain A	242	DDRADLAKYI	CENQDSISSK	LKECCEKPLL	EKSHCIAEVE	NDEMPADLPS	
RMSD: ca	301	311	321	331	341		
2BXF, chain A	301	LAADFVESKD	VCKNYAEAKD	VFLGMFLY EY	ARRHPDYSVV	LLLRLAKTYE	
2BXE, chain A	292	LAADFVESKD	VCKNYAEAKD	VFLGMFLY EY	ARRHPDYSVV	LLLRLAKTYE	
RMSD: ca	351	361	371	381	391		
2BXF, chain A	351	TTLEKCCAAA	DPHECYAKVF	DEFKPLVEEP	QNLIKQNC EL	FEQLGEYK FQ	
2BXE, chain A	342	TTLEKCCAAA	DPHECYAKVF	DEFKPLVEEP	QNLIKQNC EL	FEQLGEYK FQ	
RMSD: ca	401	411	421	431	441		
2BXF, chain A	401	NALLVRYTKK	VPQVSTPTLV	EVS RN LGKVG	SKCCKHP	EA	KRMPCAEDYL
2BXE, chain A	392	NALLVRYTKK	VPQVSTPTLV	EVS RN LGKVG	SKCCKHP	EA	KRMPCAEDYL
RMSD: ca	451	461	471	481	491		
2BXF, chain A	450	SVVLNQLCVL	HEKTPVSDRV	TKCCTESLVN	RRPCFSALEV	DETYVPKEFN	
2BXE, chain A	441	SVVLNQLCVL	HEKTPVSDRV	TKCCTESLVN	RRPCFSALEV	DETYVPKEFN	
RMSD: ca	501	511	521	531	541		
2BXF, chain A	500	AETFTFHADI	CTLSEKERQI	KKQTALVELV	KHKPKATKEQ	LKAVMDDFAA	
2BXE, chain A	491	AETFTFHADI	CTLSEKERQI	KKQTALVELV	KHKPKATKEQ	LKAVMDDFAA	
RMSD: ca	551	561	571				
2BXF, chain A	550	FVEKCKADD	KETCF AEEGK	KLVAASQAA			
2BXE, chain A	541	FVEKCKADD	KETCF AEEGK	KLVAASQAA			

Figura S8. Coordenadas do resultado $-67,55 \text{ kJ.mol}^{-1}$ obtidos pelo *docking* molecular para o sítio FA6, utilizando o software GOLD.



	x	y	z
C1	-3.8017	-16.027	-12.1003
C2	-3.7992	-17.33	-11.7717
C3	-2.9621	-17.8849	-10.8205
C4	-2.1023	-17.0097	-10.1336
C5	-2.0987	-15.6711	-10.4549
C6	-2.9708	-15.1172	-11.4037
C7	-3.0022	-19.2808	-10.5466
C8	-3.8528	-20.0848	-11.2913
C9	-4.7378	-19.4656	-12.2387
C10	-5.6493	-20.2165	-12.9451
C11	-5.8239	-21.593	-12.7239
C12	-4.8264	-22.2294	-11.8408
C13	-3.9152	-21.4919	-11.1608
I1	-4.8307	-24.2953	-11.7088
I2	-5.1459	-15.2451	-13.5192
I3	-0.7279	-14.4056	-9.4682
I4	-6.8587	-19.2972	-14.3835
O1	-6.7632	-22.2427	-13.2624
O2	-4.653	-18.153	-12.4977
O3	-3.0248	-13.8444	-11.7384
H1	-2.173	-13.5828	-12.0987
C14	-2.0079	-19.8763	-9.6362
C15	-2.3008	-20.3536	-8.3437
C16	-1.3118	-20.983	-7.5857
C17	-0.0462	-21.103	-8.0785
Cl1	-1.686	-21.6237	-5.9897
C18	0.2848	-20.6352	-9.3373
Cl2	1.1965	-21.8649	-7.0922
C19	-0.6994	-20.0265	-10.086
Cl3	1.919	-20.8239	-9.9629
Cl4	-0.2955	-19.405	-11.6823
C20	-3.6524	-20.1591	-7.7902
O4	-4.0124	-18.8722	-7.8167
O5	-4.3661	-21.0592	-7.3639
H2	-3.9721	-22.0233	-7.2312
H3	-1.4527	-17.3801	-9.3587
H4	-3.2325	-21.9796	-10.4853

Figura S9. Gráficos obtidos dos experimentos de adição de proteína HSA no corante RB (triplicata) e gráficos para a obtenção da constante de associação utilizando a equação de Benesi-Hildebrand.

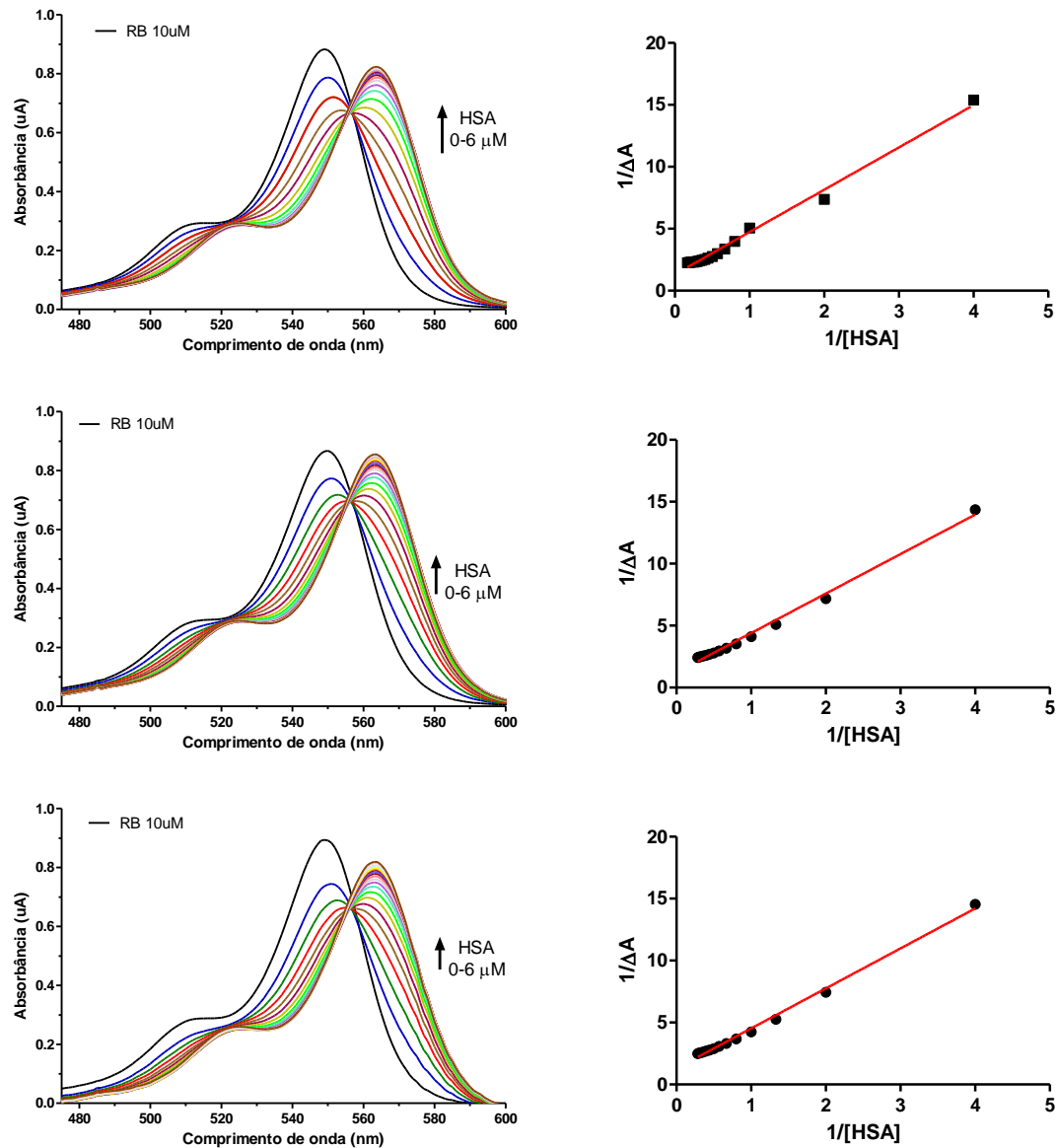


Figura S10. Espectros de UV-vis normalizados do experimento do RB sob a influência da polaridade do meio reacional. a) THF. b) Etanol. c) Acetonitrila. d) DMF. e) Acetona. f) Metanol.

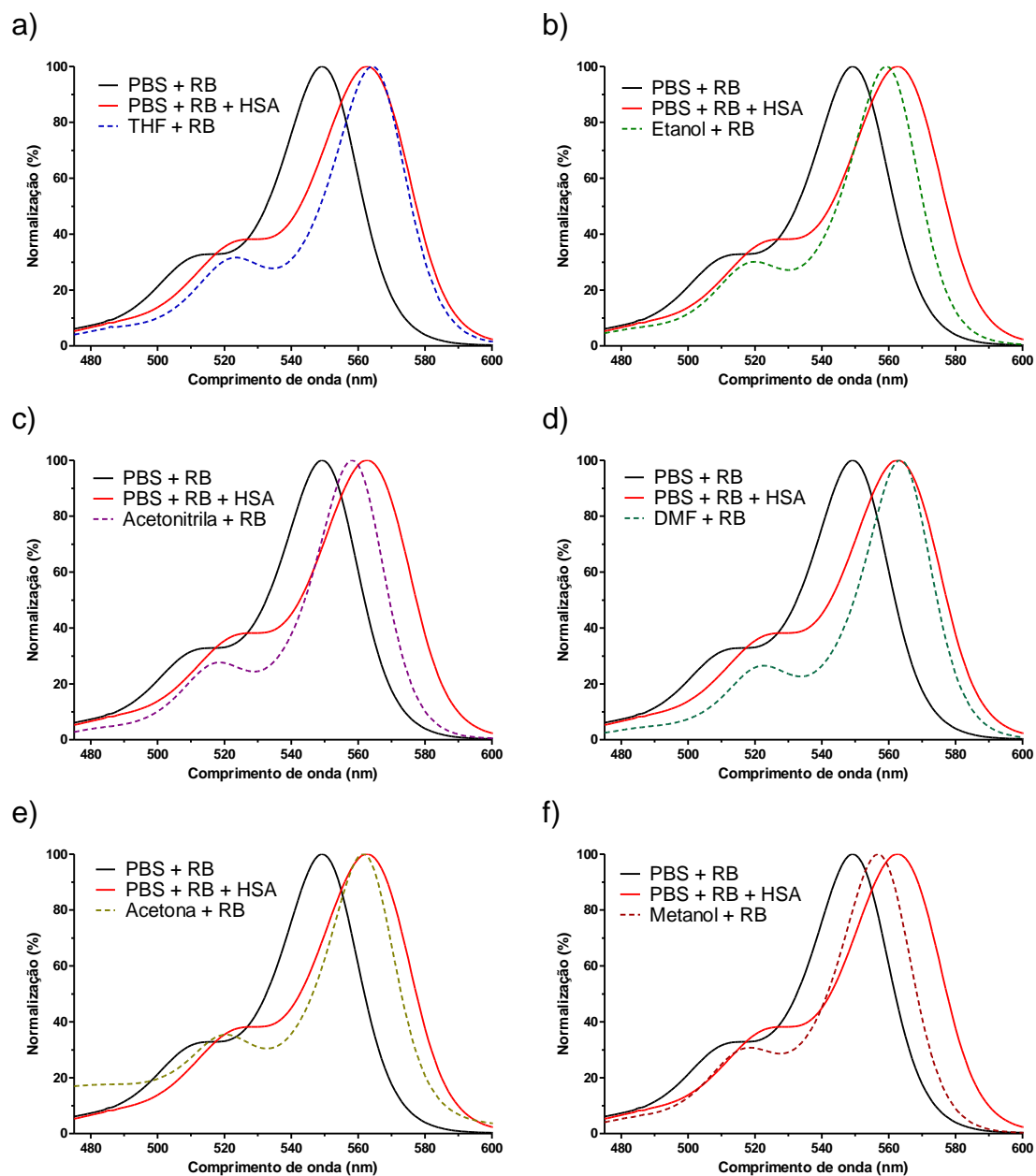


Figura S11. Espectros de UV-vis obtidos no experimento do RB sob a influência da alteração do valor de acidez (pH 3,7; 7,4; 8,0) do meio reacional.

