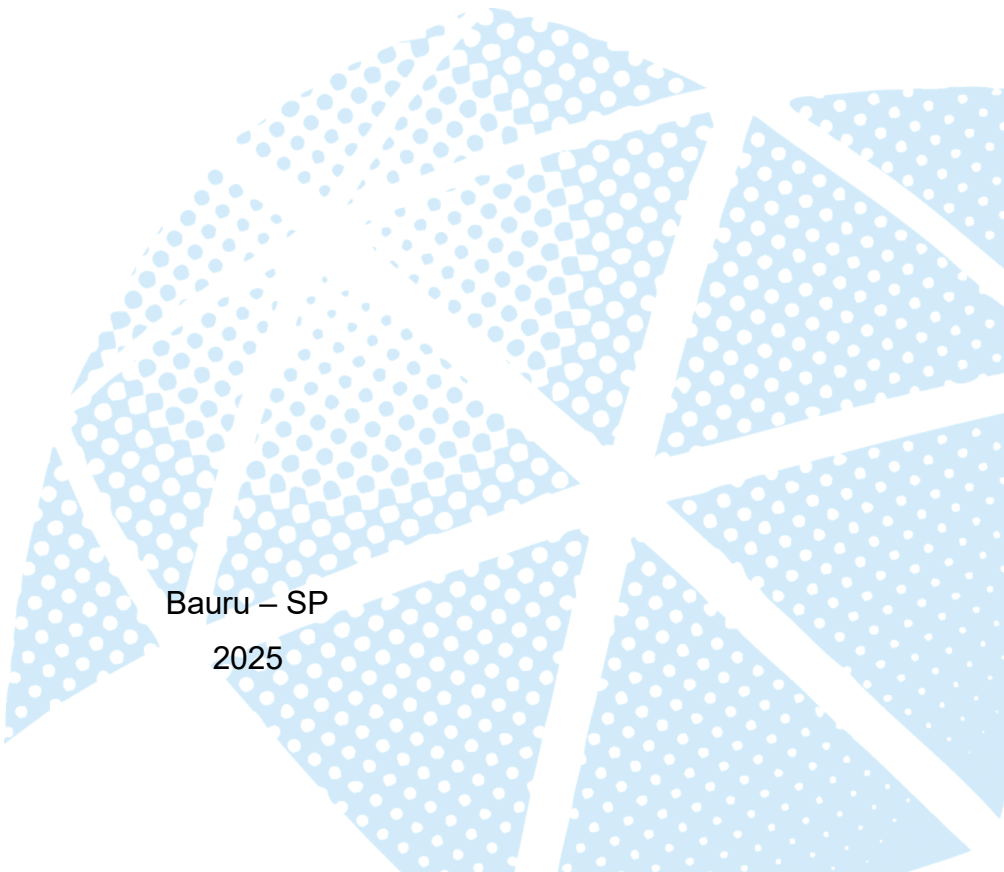


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

CARMEN REGINA DE SOUZA

**ESTUDO EXPERIMENTAL E COMPUTACIONAL DO COMPLEXO DE
CUMARINA-343 COM A ALBUMINA DE SORO HUMANO E DE SORO BOVINO**

Bauru – SP
2025



CARMEN REGINA DE SOUZA

**ESTUDO EXPERIMENTAL E COMPUTACIONAL DO COMPLEXO DE
CUMARINA-343 COM A ALBUMINA DE SORO HUMANO E DE SORO BOVINO**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru, para obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Materiais.

Área de Concentração: Química dos Materiais

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Robinson de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Bauru – SP

2025

Souza, Carmen Regina de.

Estudo experimental e computacional do
complexo cumarina-343 com a albumina de soro
humano e de soro bovino / Carmen Regina de Souza.
- Bauru, 2025

99 f. : il.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru
Orientador: Aguinaldo Robinson de Souza

1. Cumarina. 2. HSA. 3. BSA. 4. *Docking*
molecular. 5. fluorescência. 6. ECD. I.
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Ciências. II. Título.

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

Aos 07 dias do mês de maio do ano de 2025, às 14h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de CARMEN REGINA DE SOUZA, intitulada **Estudo experimental e computacional do complexo de Cumarina - 343 com a Albumina de Soro Humano e de Soro Bovino**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Assoc. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - Unesp/Câmpus de Bauru, Prof. Dr. FERNANDO LUIS BARROSO DA SILVA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Moleculares / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Prof. Dra. EDIJANE MATOS SALES (Participação Virtual) do(a) Departamento de Farmácia / Centro Universitário Ruy Barbosa - UniRuy, 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/ Câmpus de Bauru. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final **APROVADA**. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Documento assinado digitalmente
 **AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA**
Data: 09/05/2025 16:18:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Assoc. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA

AGRADECIMENTOS

Pensando na trajetória que vivi até aqui e refletindo sobre cada passo dado, percebo que ninguém conquista nada sozinho. Jamais teria chegado a este momento sem a ajuda e o apoio constante de pessoas que realmente se importaram com o meu trabalho, com a Ciência, com a pesquisa e que demonstraram um carinho genuíno por mim.

Agradeço, primeiramente, a **Deus** e à espiritualidade maior, que nunca me desampararam e estiveram comigo nos momentos de dificuldade, mantendo-me firme e perseverante.

O apoio e o carinho da minha família — de sangue e de vida — foram fundamentais. Assim, expresso minha profunda gratidão:

Danilo, obrigada por sua paciência e por toda a ajuda nesses cinco anos de doutorado. Você foi essencial para que eu não desistisse. Amo você.

Pauo, Mãe e minha irmã **Patrícia**, obrigada por acreditarem em mim, mesmo quando minhas dificuldades e limitações pareciam me impedir de continuar. Vocês estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Ao professor **Aguinaldo**, minha sincera gratidão. Ainda me lembro do convite para voltar a estudar, no início do mestrado, por volta de 2013. Fiquei assustada com a possibilidade, mas sua segurança e calma me deram coragem para aceitar. Tenho certeza de que, com outro orientador, eu não teria conseguido. Obrigada por sua paciência, por sua ajuda e pelas incontáveis conversas sobre pesquisa e sobre a vida. Professores como o senhor são essenciais para a educação e para a vida dos alunos.

Ao professor **Valdecir**, meu muito obrigada. Lembro-me com clareza de quando o senhor iniciou seu trabalho no Departamento de Química. Minha turma ficou encantada com sua inteligência e com a clareza das explicações. Tive o privilégio de vivenciar isso ainda mais de perto no laboratório. Agradeço pelo apoio e por todo o aprendizado.

Com muita emoção, agradeço a você, **Maurício**. Sua bondade e generosidade são raríssimas. Não é comum encontrar alguém que se disponha a ensinar quem vive na loucura de aulas como eu, encontrando tempo e paciência para explicar, inúmeras vezes, como fazer um *docking*, como escrever, como fazer

imagens (o que, confesso, ainda não aprendi). Você é essencial neste mundo. Obrigada pelo apoio, pela gentileza, pela ajuda, pelo carinho e pela atenção.

À querida **Nathalia**, que professora maravilhosa você foi para mim! Quanta inteligência, quanta ajuda, quantas conversas e cafés compartilhamos. O mundo precisa de mais mulheres como você. Muito obrigada por me ensinar e me incentivar sempre.

Giulia, minha filha, você é maravilhosa. Uma mulher linda por dentro e por fora. Sou verdadeiramente abençoada por ter você em minha vida. Obrigada pelas explicações incríveis sobre DFT. Você é um exemplo de cientista e de ser humano.

É até difícil lembrar de todas as pessoas que fizeram parte desta caminhada — que, diga-se de passagem, foi a mais desafiadora da minha vida. Mas deixo aqui meu muito obrigada a: **Marília, Tainá, Luiza, Patricia Garavelli, Kátina, Francely, Selma Spunar, Paula, Isadora Barbosa, Rodolfo Rossi, Ana Llobet**, as meninas da **ONG Patas de Rua, Marcelo Pelissari, Daniela Mancuso, Neivaldo, Sofia Borin, tia Regina, Vitor Arthur, Helen, Ana Carolina, Juliana, Jaqueline**, minhas amigas de infância — **Ana Elisa, Alessandra, Alessandrinha, Viviane, Priscila, Lilian, Renata** —, **Rodrigo Vóros, Camila Michele** e, por fim, a todos os **meus alunos**.

Há ainda tantas outras pessoas que, de alguma forma, me incentivaram e me ajudaram, seja com apoio na pesquisa ou até mesmo com um ombro amigo. A todos, meu mais sincero agradecimento.

Se eu pudesse deixar ao leitor deste trabalho algumas palavras que sempre me confortaram, seriam estas:

"Confia sempre"

Não percas a tua fé entre as sombras do mundo.

Crê e trabalha. Esforça-te no bem e espera com paciência.

Tudo passa e tudo se renova na Terra, mas o que vem do Céu permanecerá.

Confia sempre, pois a fé reforça a confiança na Providência Divina.

Psicografia de Francisco Cândido Xavier, pelo Espírito Meimei.

RESUMO

As cumarinas são amplamente conhecidas por suas interações com proteínas e apresentam uma vasta gama de atividades biológicas. Portanto, este trabalho tem como objetivo analisar e compreender a interação entre a cumarina-343 (C343) e a albumina sérica humana (HSA) e bovina (BSA). As técnicas utilizadas para entender a formação do complexo ligante-proteína basearam-se em metodologias de espectroscopia de fluorescência e em simulações teóricas, como a Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (Time Dependent Density Functional Theory (TD-DFT) e o *Docking* Molecular. Os resultados demonstraram que a C343 apresenta afinidade por ambas as proteínas albumina, sendo que a constante de ligação, determinada por extinção de fluorescência, foi de $2,1 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (HSA) e $6,5 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (BSA). Considerando que essa complexação apresenta estequiometria 1:1 (proteína-ligante) em ambos os ensaios, foram então utilizados marcadores de sítios de ligação para determinar qual região é preferencial para a formação do complexo, estabelecendo-se que o sítio I de ligação de fármacos (DS1), localizado no subdomínio IIA, foi a região preferencial para a formação do complexo em ambas as proteínas. Os estudos computacionais corroboraram os resultados experimentais, indicando maior afinidade pelo DS1 com valores de energia de $-69,02 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (HSA) e $-67,22 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (BSA). Apesar dos bons resultados obtidos para a formação do complexo entre a C343 e ambas as proteínas, foi observado um resultado distinto para o sinal de Dicroísmo Circular Induzido (ECD). O sinal de ECD para a HSA foi significativamente diferente tanto em intensidade quanto no máximo de absorção, em comparação ao da BSA. Nos resultados de Molecular *Docking*, observou-se que a conformação da C343 na HSA difere daquela na BSA, o que levou a uma discrepância significativa no sinal de ECD.

Palavras-chave: Cumarina 343; HSA; BSA; *docking* molecular; fluorescência; ECD.

ABSTRACT

Coumarins are well known for their interactions with proteins and exhibit a wide range of biological activities. Therefore, this work aims to analyze and understand the interaction between coumarin-343 (C343) and human (HSA) and bovine (BSA) serum albumin. The techniques used to understand the formation of the ligand-protein complex were based on fluorescence spectroscopy methodologies and theoretical simulations, such as Time Dependent Density Functional Theory (TD-DFT) and Molecular Docking. The results demonstrated that C343 has affinities for both albumin proteins, in which the binding constant, determined by fluorescence quenching, was $2.1 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (HSA) and $6.5 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (BSA). As this complexation has a 1:1 stoichiometry (protein-ligand) for both assays, binding site markers were then used to determine which region is preferential for complex formation, thus determining that site I of the drug (DS1), located in subdomain II A, was the preferential region for complex formation for both proteins. Computational studies corroborated the experimental results, showing a greater affinity for DS1 with an energy value of $-69.02 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (HSA) and $-67.22 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (BSA). Despite the good results obtained for the formation of the complex of C343 and both proteins, a different result for the induced Circular Dichroism (ECD) signal was obtained. The ECD signal for HSA was very different both for the intensity and maximum of absorption, than for BSA. In the Molecular Docking results, it was observed that the conformation of C343 in HSA is different than that in BSA leading to a significantly discrepancy in the ECD signal.

Keywords: Coumarin-343; HSA; BSA; molecular docking; DFT; fluorescence; ECD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplo da formação de uma ligação peptídica entre amonoácidos.	15
Figura 2 – Classificação dos sítios de interação.	17
Figura 3 – Estrutura do PDB 4F5S referente à estrutura cristalográfica da BSA	18
Figura 4 – Comparação entre os aminoácidos dos PDBs da HSA (1AO6) e da BSA (4F5S).	20
Figura 5 – Estrutura da cumarina – 1,2 benzopironas.....	22
Figura 6 – Estrutura da cumarina 343 desprotonada:	23
Figura 7 – Espectro da supressão de fluorescência da HSA com adição de cumarina.	39
Figura 8 – Gráfico da regressão linear dos resultados obtidos nos espectros de fluorescência do complexo C343-HSA.	43
Figura 9 – Gráfico das constantes de Stern-Volmer (KSV) em diferentes temperaturas.....	49
Figura 10 – Gráfico de $\log F_0 - FF$ por $\log [C343]$ em diferentes temperaturas: 293 K (azul) e 313 K (vermelho).	50
Figura 11 – Gráfico de Job's plot.	52
Figura 12 – Espectro de fluorescência na C343 com a titulação de HSA.	54
Figura 13 – Espectros de fluorescência de C343 (azul) e do complexo C343+HSA (vermelho) de mesma concentração ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$).	55
Figura 14 – Espectros de fluorescência das análises da interferência dos fármacos:	56
Figura 15 – Mecanismo de competição de sítio com os possíveis caminhos, sendo P = proteína, L = ligante e M = marcador	58
Figura 16 – Espectros de fluorescência da C343 com adições de proteína e varfarina.	59
Figura 17 – Espectros de Fluorescência da C343 com adições de proteína e Ibuprofeno.....	60
Figura 18 – Espectros de fluorescência da C343 nas adições de proteína e digitoxina com a imagem do zoom dado no pico do espectro.	62
Figura 19 – Estrutura da Cumarina 343 bidimensional.	63
Figura 20 – Espectros de ECD de C343 livre, proteína livre e C343 + proteína .	63
Figura 21 – Valor de pKa da estrutura cumarina 343 obtida no site MolGpKa....	66
Figura 22 – Estruturas cristalográficas da proteína HSA com os seus respectivos ligantes obtidas no PDB	67
Figura 23 – Sobreposição das estruturas cristalográficas PDB 2XW0 e 2BX8 da	

proteína HSA obtidas no software DS.	69
Figura 24 – Fila de aminoácidos das estruturas PDB 2BXE e 2BX8 obtidas no software Chimera.....	70
Figura 25 – Confômero da cumarina 343 obtido no estudo de <i>docking</i> molecular para o sítio DS1 da HSA com ampliação da C343 no sítio.	72
Figura 26 – Possíveis interações da Cumarina 343 com a proteína HSA no sítio DS1.	73
Figura 27 – Confômero da cumarina 343 obtido no estudo de <i>docking</i> molecular ao sítio DS2 da proteína HSA com ampliação da C343 no sítio.	74
Figura 28 – Possíveis interações da Cumarina 343 com a proteína HSA no sítio DS2.	75
Figura 29 – Confômero da cumarina 343 obtida nos estudos de <i>docking</i> molecular ao sítio DS3 da proteína HSA.	76
Figura 30 – Possíveis interações da cumarina 343 na proteína HSA do sítio DS3.	77
Figura 31 – Confômero da cumarina 343 obtida nos estudos de <i>docking</i> molecular ao sítio DS3 da proteína HSA com ampliação da C343 no sítio.	78
Figura 32 – Possíveis interações da cumarina 343 na proteína BSA do sítio DS1	79
Figura 33 – ECD da interação entre C343 e HSA com funcional PBE1PBE.....	81
Figura 34 – ECD da interação entre C343 e HSA em meio com DMSO.	81
Figura 35 – Espectro de ECD da Cumarina 343 sob a presença do aminoácido Arginina 222.....	82
Figura 36 – Estrutura da Cumarina 343 obtida nos estudos de <i>docking</i> molecular sob a presença da Arginina 222, com indicação dos valores do diedro e distância	83
Figura 37 – Espectro de ECD da estrutura da Cumarina 343 obtida nos estudos de <i>docking</i> molecular sob a presença do aminoácido Arginina 194 da proteína BSA	84
Figura 38 – Espectro de ECD da estrutura da Cumarina 343 obtida nos estudos de <i>docking</i> molecular na presença do aminoácido Arginina 194 da proteína BSA com a influência de solvente	85
Figura 39 – Espectro de ECD da Cumarina 343	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variação das concentrações de C343 e HSA resultando na fração molar final de 11 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	34
Tabela 2 – Valores obtidos e calculados a 20°C para determinação da constante de ligação (K_a).....	42
Tabela 3 – Alguns valores de K_a da formação do complexo Ligante-HSA.	44
Tabela 4 – Valores de entalpia, entropia e energia livre de Gibbs.....	45
Tabela 5 – Valores de K_a e desvio padrão nas temperaturas de 293K e 313K. .	47
Tabela 6 – Valores das constantes de Stern-Volmer, constante de supressão bimolecular e o erro nas medições.	50
Tabela 7 – Valores do comprimento de onda de excitação e emissão dos fármacos varfarina, ibuprofeno e digitoxina.	56
Tabela 8 – Interação da cumarina 343 aos aminoácidos do DS1 da proteína HSA com os valores da distância e suas classificações.....	73
Tabela 9 – Interações do confômero obtido no <i>docking</i> molecular ao sítio DS2 da proteína HSA.	75
Tabela 10 – Interações do confômero obtido no <i>docking</i> molecular ao sítio DS3 da proteína HSA.	77
Tabela 11 – Interações do confômero obtido no <i>docking</i> molecular ao sítio DS1 da proteína BSA.	79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 PROTEÍNA ALBUMINA	14
1.1.1 Proteína Albumina do Soro Humano	15
1.1.2 Albumina do Soro Bovino.....	17
1.1.3 Comparação entre as Proteínas Albuminas do Soro Humano e Bovino	19
1.2 CUMARINA 343	20
2 METODOLOGIA	24
2.1 ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA	24
2.2 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO ALBUMINA-PROTEÍNA	25
2.3 TÉCNICA DE DICROÍSMO CIRCULAR ELETRÔNICO – ECD	25
2.4 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS	26
2.4.1 <i>Docking</i> Molecular	27
2.5 ESTUDOS DE DFT	27
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 MATERIAIS	30
4.1 EQUIPAMENTOS	30
4.2 SOFTWARES.....	30
4.3 SOLUÇÕES	30
4.3.1 HSA	30
4.3.2 BSA.....	30

4.3.3	Cumarina-343.....	31
4.3.4	Varfarina	31
4.3.5	Ibuprofeno	31
4.3.6	Digitoxina	31
5	PROCEDIMENTO	32
5.1	VERIFICAÇÃO DA COMPLEXAÇÃO ENTRE C343-HSA ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	32
5.2	ESTUDOS TERMODINÂMICOS	32
5.3	DETERMINAÇÃO ESTEQUIOMÉTRICA DE C343 E HSA ATRAVÉS DO MÉTODO DE JOB'S PLOT.	33
5.4	DETERMINAÇÃO DE SÍTIO PREFERENCIAL DA C343 NA HSA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	35
5.5	ESTUDOS DE DICROÍSMO CIRCULAR INDUZIDO NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO ENTRE A CUMARINA 343 E AS PROTEÍNAS ALBUMINAS HUMANA (HSA) E BOVINA (BSA).	35
5.6	ESTUDOS DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	36
5.7	ESTUDOS DE DFT PARA C343 NA HSA E NA BSA	37
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
6.1	A FORMAÇÃO DO COMPLEXO HSA-C343.....	39
6.2	DETERMINAÇÃO DO K_A A PARTIR DA EQUAÇÃO	40
6.3	ESTUDOS TERMODINÂMICOS.....	44
6.4	SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA	47
6.5	DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA PELO MÉTODO JOB'S PLOT.....	51
6.6	DETERMINAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO NA HSA – MÉTODO DE COMPETIÇÃO DE SÍTIOS	53
6.6.1	Estudos da formação do complexo proteína-ligante com [HSA] variando e [C343] constante.	54

6.6.2 Estudo da interferência dos fármacos e C343	55
6.6.3 Competição de sítios	58
6.6.4 Competição de sítio utilizando Varfarina.....	59
6.6.5 Competição de sítio utilizando Ibuprofeno	60
6.6.6 Competição de sítio utilizando Digitoxina.....	61
6.7 DICROÍSMO CIRCULAR	62
6.8 ESTUDOS DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	65
6.8.1 Análise das estruturas cristalográficas da proteína albumina do soro humano, HSA.....	68
6.8.2 Estudos de <i>redocking</i> molecular.....	71
6.8.3 Estudos de <i>docking</i> molecular aos sítios específicos na proteína HSA.....	71
6.8.4 <i>Docking</i> molecular ao sítio DS1 da proteína HSA	71
6.8.5 <i>Docking</i> molecular ao sítio DS2 da proteína HSA	73
6.8.6 <i>Docking</i> molecular ao sítio DS3 da proteína HSA	75
6.8.7 <i>Docking</i> molecular ao sítio DS1 da proteína BSA.....	78
6.9 ESTUDOS DE <i>DOCKING</i> E TD-DFT NO ECD DA C343 COM HSA E BSA.....	79
7 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

A interação entre macromoléculas biológicas, como proteínas e DNA, com fármacos e/ou medicamentos é uma área de pesquisa de grande relevância no campo das ciências da vida (GUIDO et al., 2010; YOGUIM, 2021).

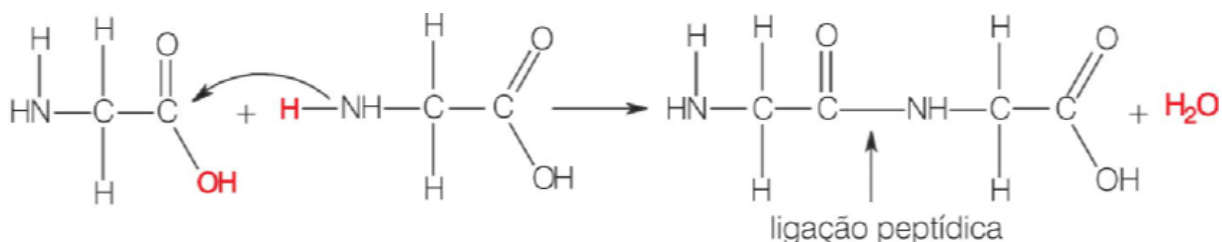
Esse campo de estudo está fundamentado em abordagens interdisciplinares que envolvem características químicas, físicas e biológicas, buscando compreender como interações intermoleculares, tais como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas, influenciam a estrutura e a função de sistemas biológicos complexos. Tais interações desempenham um papel essencial em processos biológicos, como a ligação de substratos a proteínas receptoras, a catálise de reações enzimáticas e outros fenômenos biomoleculares (LEHN, 1995; PACHECO, 2023).

1.1 PROTEÍNA ALBUMINA

As proteínas são macromoléculas compostas por cadeias polipeptídicas formadas por aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Cada aminoácido consiste em um grupo carboxila ($-\text{COOH}$) e um grupo amina ($-\text{NH}_2$) ligados a um átomo de carbono central (carbono α), além de um grupo lateral (R), cuja natureza química determina as propriedades específicas de cada aminoácido (JUNIOR, et al, 2006).

A albumina sérica, uma das proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo, desempenha funções essenciais no transporte de moléculas endógenas e exógenas, incluindo fármacos, hormônios e ácidos graxos. Sua capacidade de interagir com diferentes ligantes é amplamente estudada devido à sua relevância na farmacocinética e biodisponibilidade de compostos bioativos.

Figura 1 – Exemplo da formação de uma ligação peptídica entre aminoácidos.



Fonte: JUNIOR, et al (2006).

O aminoácido mais simples é a glicina ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$), cujo grupo lateral (R) consiste em um único átomo de hidrogênio. A variação da estrutura do grupo R permite a formação de uma ampla diversidade de moléculas, porém, nas proteínas, são encontrados aproximadamente 20 aminoácidos distintos (Aminoácidos Proteinogênicos) e 2 aminoácidos expandidos (selenocisteína e pirrolisina). As propriedades químicas desses aminoácidos – como acidez, basicidade e polaridade – são determinadas pelas características do grupo R, influenciando diretamente a estrutura e a função das proteínas (Figura 1).

1.1.1 Proteína Albumina do Soro Humano

A albumina sérica humana (HSA) é uma proteína amplamente estudada devido ao seu papel essencial no transporte e na distribuição de compostos endógenos (substâncias produzidas pelo organismo) e exógenos (substâncias de origem externa). Além disso, é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, correspondendo a aproximadamente 60% do total de proteínas plasmáticas (LINDUP et al., 1981). O estudo da interação entre fármacos e HSA é fundamental para elucidar as propriedades do complexo fármaco-proteína, fornecendo informações valiosas sobre as características estruturais e a eficácia terapêutica dos medicamentos (ZHANG et al., 2013).

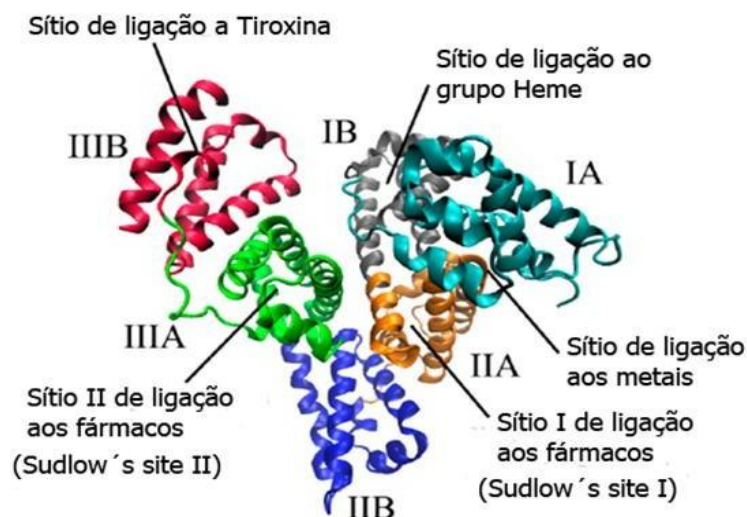
A HSA é sintetizada no fígado e sofre modificações pós-translacionais no complexo de Golgi. Suas principais características incluem um peso molecular de aproximadamente 66,5 kDa, pH fisiológico entre 7,35 e 7,45 atuando como um importante tampão, possui ponto isoelétrico (pI) de 4,7 e alta solubilidade em meio aquoso (AL-HARTHI et al., 2019; SRIVASTAVA et al., 2020).

Estruturalmente, a HSA é composta por uma única cadeia polipeptídica contendo 585 resíduos de aminoácidos, incluindo 35 resíduos de cisteína que formam 17 pontes dissulfeto, fundamentais para a estabilidade da proteína. Sua estrutura tridimensional é organizada em três domínios principais (I, II e III), cada um subdividido em dois subdomínios, A e B (NELSON; COX, 2006).

Essas subdivisões formam regiões específicas para a ligação de ligantes, conhecidas como sítios de ligação. Os principais sítios de interação com fármacos são os sítios I (DS1) e II (DS2). A maioria dos ligantes se liga preferencialmente ao DS1, enquanto um número menor interage com o DS2 (CARTER et al., 1994). A HSA possui um único resíduo de triptofano (Trp-214), localizado no domínio II, próximo ao sítio I, sendo responsável pela fluorescência intrínseca da proteína. O sítio II, localizado no subdomínio IIIA, apresenta uma cavidade predominantemente apolar, com um único agrupamento polar na entrada do sítio (GHUMAN et al., 2005; RYAN et al., 2011). A afinidade dos ligantes pela HSA é frequentemente quantificada pela constante de associação (K_a), cujo intervalo varia entre 10^4 e 10^6 mol·L⁻¹. Valores dentro desse intervalo indicam uma interação significativa entre o ligante e a proteína (TRYNDA-LEMIESZ, 2010).

Além dos sítios I e II, também foi identificado o sítio III (DS3), descrito nos estudos de Peters (1995). Essa região, também conhecida como sítio da digitoxina, foi reconhecida como um novo local de interação com fármacos apenas vinte anos após os estudos de Sudlow, tornando-se a terceira região mais relevante para investigações sobre a ligação de fármacos à HSA (ASCENZI et al., 2015; BHATTACHARYA et al., 2000).

Figura 2 – Classificação dos sítios de interação.



Fonte: Modificado de KHAIBRAKHMANOVA et al. (2020).

1.1.2 Albumina do Soro Bovino

A albumina sérica bovina (BSA) é a proteína mais abundante no plasma bovino, desempenhando um papel crucial no transporte de compostos endógenos e exógenos. Essa função de carreação ocorre nos dois principais sítios de ligação da proteína, localizados nos subdomínios IIA e IIIA. Ambos os sítios são caracterizados por sua natureza hidrofóbica (BOLATTIN et al., 2016; WANG et al., 2019).

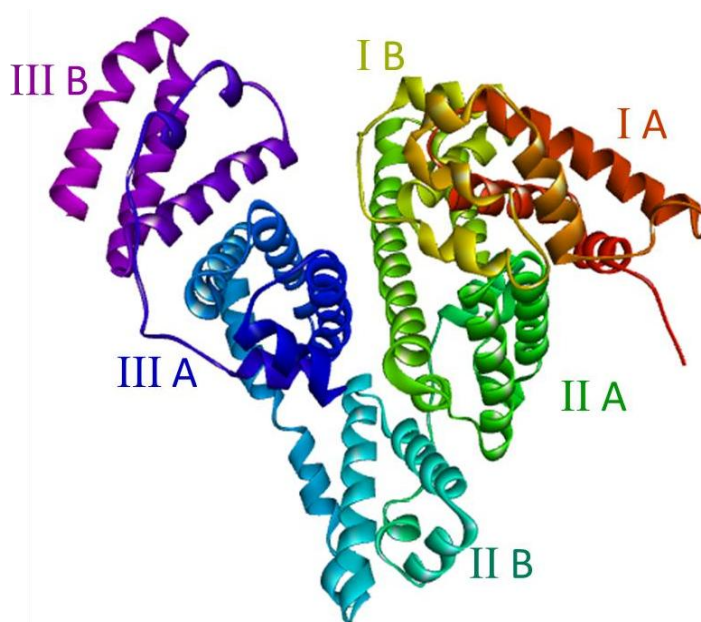
A BSA possui três resíduos considerados fluoróforos, que emitem fluorescência: triptofano (Trp), responsável pela maior parte da fluorescência, além de tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). Devido à presença de resíduos de Trp em sua estrutura, a BSA emite fluorescência quando excitada a 295 nm (JAHANBAN-ESFAHLAN et al., 2016). No entanto, quando a BSA interage com pequenas moléculas próximas aos resíduos de Trp, a fluorescência intrínseca diminui à medida que a concentração do ligante aumenta.

A BSA é composta por 582 resíduos de aminoácidos (SHAHABADI, N.; HADIDI, S, 2014), com 17 pares de pontes dissulfeto e uma cisteína livre (SUGIO et al., 1999), além de dois resíduos de triptofano. Sua estrutura é bastante semelhante à da albumina sérica humana (HSA) (ROY et al, 2016; KSENOFONTOV et al, 2021). Os resíduos de triptofano da BSA estão localizados nos subdomínios IB e IIA, especificamente em Trp-134 e Trp-212 (SULKOWSKA, 2002; KANDAGAL et al., 2006), enquanto os domínios I, II e III contêm os resíduos de aminoácidos nas posições 1-195, 196-383 e 384-582, respectivamente vide figura 3 (MORIYAMA et al., 1996; STANet al., 2009).

O sítio I é o principal responsável pelo reconhecimento da albumina e pela ligação de uma grande variedade de ligantes. Esse sítio está associado a ligantes como varfarina, fenilbutazona e piroxicam, sendo o local preferencial de ligação de moléculas não polares heterocíclicas volumosas, geralmente com uma carga negativa centralmente deslocalizada (ABBOUD et al., 2017; DATTA et al., 2013).

O sítio II, por sua vez, é de menor volume e não possui uma afinidade tão ampla para ligantes. Ele normalmente segue uma estequiometria de 1:1 na proporção proteína-ligante. Esse sítio apresenta maior afinidade por ligantes que contêm uma carga negativa localizada no carbono de um composto aromático com grupos de ácido carboxílico (GRACIANI e XIMENES, 2013; OLSON e CHRIST, 1996).

Figura 3 – Estrutura do PDB 4F5S referente à estrutura cristalográfica da BSA



Fonte: Modificado de RCSB PDB (2023). Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/4F5S>. Acesso em: 8 abr. 2025.

1.1.3 Comparação entre as Proteínas Albuminas do Soro Humano e Bovino

A albumina sérica bovina (BSA) é uma das proteínas mais amplamente estudadas e comumente utilizada como modelo em investigações de interação proteína-ligante. Isso se deve à sua abundância, baixo custo, facilidade de purificação e ao comportamento semelhante ao da albumina sérica humana (HSA) em diversos experimentos (ROY et al, 2016; KSENOFONTOV et al, 2021). No entanto, o uso da BSA como modelo nem sempre garante que a interação de um composto com a HSA siga o mesmo padrão observado na BSA.

A proteína bovina apresenta uma sequência homóloga de 80% e uma similaridade de estrutura terciária de 76% quando comparada à HSA (PETERS, 1995).

Embora a BSA e a HSA compartilhem muitas semelhanças, uma das principais diferenças entre elas reside no número de resíduos de triptofano (Trp). A HSA possui apenas um resíduo de triptofano (Trp214), enquanto a BSA contém dois resíduos de triptofano (Trp134 e Trp212). Essa diferença torna a BSA uma escolha frequente, em vez da HSA, para estudos farmacológicos, devido ao seu menor custo, além de sua importância médica, abundância, facilidade de purificação, alta solubilidade em meio aquoso e estabilidade físico-química (ROY et al., 2016; KSENOFONTOV et al., 2021; SHAHABADI e HADIDI, 2014).

Assim, apesar da alta homologia entre essas proteínas, a afinidade de ligação da BSA e da HSA por ligantes pode ser substancialmente diferente (BOLEL et al., 2012).

A Figura 4 ilustra essa similaridade entre as estruturas das proteínas, com base na comparação dos aminoácidos presentes nas respectivas estruturas cristalográficas. As estruturas foram obtidas no Protein Data Bank (PDB) e analisadas no software Chimera versão 1.17. A estrutura da HSA utilizada foi a 1AO6 (SUGIO et al., 1999), e para a BSA, a 4F5S (BUJACZ, 2012).

Figura 4 – Comparação entre os aminoácidos dos PDBs da HSA (1AO6) e da BSA (4F5S).

1ao6.pdb (#0) chain A	1	5	- - - SEVAHR	11	FKDLGGEENFK	21	ALVLIIFAQY	31	LQQCFEDHV	41	KLVNEVTEFA
4f5s.pdb (#1) chain A	1	5	DTHKSEIAHR	11	FKDLGGEHFK	21	GLVLIIFSQY	31	LQQCFDEHV	41	KLVNELTEFA
1ao6.pdb (#0) chain A	51	51	KTCVADESAE	61	NCDKSLHTLF	71	GDKLCTVATL	81	RETYGEMADC	91	CAKQEPERNE
4f5s.pdb (#1) chain A	51	51	KTCVADESHA	61	GCEKSLHTLF	71	GDELCKVASL	81	RETYGDMADC	91	CEKQEPERNE
1ao6.pdb (#0) chain A	101	101	CFLQHKDDNP	111	NLPRLVRPEV	121	DVMCTAFHDN	131	EETFLKLYLY	141	EIARRHPYFY
4f5s.pdb (#1) chain A	101	101	CFLSHKDDSP	111	DLPKL - KPDP	121	NTLCDEFKAD	131	EKKFWGKYLY	141	EIARRHPYFY
1ao6.pdb (#0) chain A	151	151	APELLFFAKR	161	YKAAFTCECC	171	AADKAACLLP	181	KLDELRLDEGK	191	ASSAKQRLKC
4f5s.pdb (#1) chain A	150	150	APELLYYANK	161	YNGVFQECQ	171	AEDKGACLLP	181	KIETMRKEVVL	191	TSSARQRLRC
1ao6.pdb (#0) chain A	201	201	ASLQKFGERA	211	FKAWAVARLS	221	QRFPKAEFAE	231	VSKLVTDLTk	241	VHTECCHGDL
4f5s.pdb (#1) chain A	200	200	ASIQKFGERA	211	LKAWSVARLS	221	QKFPKAEFVE	231	VTCLVTDLTk	241	VHKECCHGDL
1ao6.pdb (#0) chain A	251	251	LECADDRADL	261	AKYICENQDS	271	ISSKLKECCE	281	KPLLEKSHCI	291	AEVENDEMPA
4f5s.pdb (#1) chain A	250	250	LECADDRADL	261	AKYICDNQDT	271	ISSKLKECCD	281	KPLLEKSHCI	291	AEVEKDAIPE
1ao6.pdb (#0) chain A	301	301	DLPSLAADFV	311	ESKDVCKNYA	321	EAKDVFLGMF	331	LYEYARRHPD	341	YSVVLRLRLA
4f5s.pdb (#1) chain A	300	300	NLPPLTADFA	311	EDKDVCKNYQ	321	EAKDAFLGSF	331	LYEYSRRHPE	341	YAVSVLLRLA
1ao6.pdb (#0) chain A	351	351	KTYETTLEKC	361	CAAADPHECY	371	AKVFDEFKPL	381	VEEPQNLIKQ	391	NCELFEQLGE
4f5s.pdb (#1) chain A	350	350	KEYEATLEEC	361	CAKDDPHACY	371	STVFDKLLHL	381	VDEPQNLIKQ	391	NCDQFEKLGE
1ao6.pdb (#0) chain A	401	401	YKFQNALIVR	411	YTKKVPQVST	421	PTLVEVSRNL	431	GKVGSKCCKH	441	PEAKRMPCAE
4f5s.pdb (#1) chain A	400	400	YGFQNALIVR	411	YTRKVPQVST	421	PTLVEVSRSL	431	GKVGTRCCTK	441	PESERMPCTE
1ao6.pdb (#0) chain A	451	451	DYLSVVLNQL	461	CVLHEKTPVS	471	DRVTKCCTES	481	LVNRRPCFSA	491	LEVDETYVPK
4f5s.pdb (#1) chain A	450	450	DYLSLILNRL	461	CVLHEKTPVS	471	EKVTKCCTES	481	LVNRRPCFSA	491	LTPDETYVPK
1ao6.pdb (#0) chain A	501	501	EFNAETFTFH	511	ADICTLSEKE	521	RQIKKQTALV	531	ELVKHKPKAT	541	KEQLKAVMDD
4f5s.pdb (#1) chain A	500	500	AFDEKLFTFH	511	ADICTLPDTE	521	KQIKKQTALV	531	ELLKHKPKAT	541	EEQLKTVMEN
1ao6.pdb (#0) chain A	551	551	FAAFVEKCCK	561	ADDKETCFAE	571	EGKKLVAAASQ	581	AA - -		
4f5s.pdb (#1) chain A	550	550	FVAFVDKCCA	561	ADDKEACFAV	571	EGPKLVVSTQ	581	TALA		

Fonte: elaborado pela autora.

1.2 CUMARINA 343

A cumarina foi isolada pela primeira vez por Vogel em 1820 a partir da planta *Dipteryx odorata*, comumente conhecida como cumaru (BORGES et al., 2005). Desde então, diversos estudos têm sido realizados, com publicações que abordam o isolamento e a síntese de cumarinas e seus análogos a partir de outras espécies vegetais (SOUZA et al., 2016). Esses compostos têm se destacado na pesquisa científica, especialmente pela sua capacidade de promover interações não covalentes com estruturas proteicas, o que lhes confere um amplo espectro de atividades biológicas, tornando-as potenciais candidatas para a prevenção e tratamento de diversas doenças (PENG et al., 2013). Mais de 1300 tipos de cumarinas foram identificadas a partir de fontes naturais, especialmente de plantas verdes (HOULT et al., 1996). A biossíntese de cumarinas, cuja principal rota envolve o ácido chiquímico (PEREIRA et al., 2018), não se limita às plantas; também é realizada por algumas

espécies de fungos, como *Armillariella tabescens* e *Fomitopsis officinalis*, bem como por bactérias, como *Streptomyces niveus* e *Escherichia coli*.

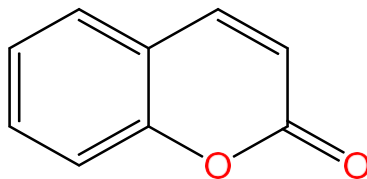
O interesse crescente por esses compostos se deve, em grande parte, à facilidade com que a cor e a fluorescência das cumarinas podem ser modificadas por meio da introdução de substituintes, como grupos eletrodoadores e/ou eletroatratores. Esses substituintes intensificam a transferência de carga intramolecular (ICT), induzida pela luz, característica fundamental das cumarinas (LIU et al., 2009).

Além das bioatividades associadas às cumarinas, suas propriedades luminescentes também são amplamente exploradas pela indústria. Esse fenômeno luminescente é resultado da transferência interna de carga do sistema conjugado p-p*, rico em elétrons. As cumarinas têm uma vasta gama de aplicações, incluindo sondas fluorescentes, agentes de monitoramento de inibição enzimática, fornecimento de informações farmacológicas em tempo real, corantes (VITORIO et al., 2015), sensores de pH (PEREIRA et al., 2018) e potenciais agentes de biorredução. A diversidade de suas aplicações reforça a importância contínua da pesquisa e desenvolvimento de compostos análogos (FRANCO et al., 2021).

As cumarinas, classificadas como 1,2-benzopironas, estão amplamente distribuídas em plantas e também em várias espécies de fungos e bactérias. Hoje, diversos procedimentos sintéticos possibilitam a descoberta de cumarinas com uma maior diversidade química. A capacidade dessas substâncias de exercer interações não covalentes com enzimas e receptores em organismos vivos resulta em uma ampla gama de atividades e aplicações biológicas.

A estrutura química das cumarinas é caracterizada pela presença de um anel pirano fundido a um anel benzeno, com uma carbonila na pirona. A principal diferença entre as diversas cumarinas reside na natureza dos substituintes nos dois anéis. A 1,2-benzopirona, a forma mais simples da cumarina, possui um hidrogênio no anel pirano e um grupo hidroxila no anel benzeno (CARNEIRO et al., 2021).

Figura 5 – Estrutura da cumarina – 1,2 benzopironas



Fonte: Wikimedia Commons (2024). Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1873546>. Acesso em: 08 abr. 2025.

Analisando os trabalhos de Carneiro et al. (2021) e Franco et al. (2021), observa-se que os grupos substituintes nas cumarinas geram novas estruturas, as quais são responsáveis por determinar suas ações farmacológicas e farmacocinéticas. Esse fato torna o estudo e a utilização das cumarinas de extrema relevância no contexto medicinal.

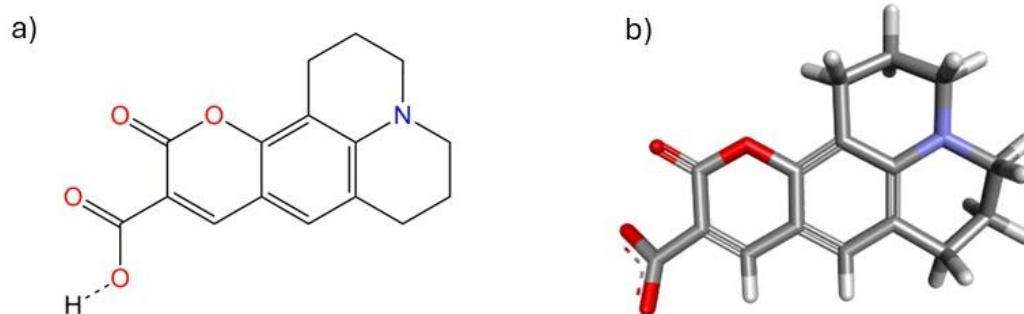
Para este estudo, foi escolhida a cumarina 343 (C343) (2,3,6,7-tetrahidro-11-oxo-1H,5H,11H-benzopirano[6,7,8]quinolizina-10-ácido carboxílico). Trata-se de uma sonda fluorescente frequentemente empregada em pesquisas nas áreas de bioquímica e biologia molecular, com ênfase na investigação das interações entre compostos cumarínicos e proteínas, particularmente na interação com a albumina sérica humana (HSA) (FRANCO et al., 2021). A C343 é um cromóforo de alta intensidade, utilizado em uma ampla gama de aplicações, como corantes para laser e como ferramenta para sondar a dinâmica de ambientes em fase condensada, tanto em soluções quanto em sistemas mais complexos, como proteínas e outros sistemas organizados.

As propriedades que tornam a C343 eficaz para esses propósitos incluem sua rigidez estrutural, altas taxas radiativas e forte solvatocromismo (GUTIERREZ et al., 2010).

Portanto, com o intuito de contribuir para futuros estudos farmacológicos, este trabalho fornece informações relevantes que podem ampliar a utilização da C343 no desenvolvimento de novos compostos e terapias.

Figura 6 – Estrutura da cumarina 343 desprotonada:

a) Estrutura 2D obtida no PubChem e b) Estrutura 3D no software DS.



Fonte: Modificado de PubChem (2025). Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/108770>. Acesso em: 8 abr. 2025.

2 METODOLOGIA

2.1 ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas mais utilizadas para se estudar as interações entre a proteína e o ligante (LAKOWICZ, 2006). A fluorescência ocorre quando uma molécula absorve um fóton de luz e, em seguida, emite um fóton de luz com energia menor. A diferença de energia entre os dois fótons é igual à energia perdida pela molécula no processo de fluorescência (LAKOWICZ, 2006).

A fluorescência da HSA, é devida ao seu único resíduo de triptofano, Trp-214, este localizado no DS1, desconsiderando a contribuição de outros fluoróforos, como tirosina e fenilalanina. Assim a supressão da fluorescência da HSA pode ser provocada pela desativação ocasionada por colisões entre a proteína e o ligante (quenching dinâmico) ou pela formação de um complexo HSA-ligante (quenching estático) (LAKOWICZ, 2006).

A fluorescência observada na BSA se deriva dos seus dois triptofanos, Trp-134 e Trp-212 localizados no subdomínio IB e IIA respectivamente (SHAHABADI, N.; HADIDI, 2014). O complexo ligante-proteína forma-se da mesma maneira que na HSA com supressão da fluorescência.

Dos três fragmentos de triptofano da HSA e BSA, a emissão dos resíduos de triptofano da BSA (Trp-134 e Trp-212) e HSA (Trp-214) é a mais significativa em relação aos outros aminoácidos fluoróforos, devido à natureza química do microambiente ao redor desses grupos (SELVARAJ. et al, 2013).

Em comparação a outras metodologias, a espectroscopia de fluorescência apresenta vantagem operacional de ser possível realizar os experimentos com baixas concentrações de reagentes o que reduz os custos e comprova a sensibilidade do método. Assim, uma vez que a substância exibe um sinal de fluorescência característico, as variações neste sinal somente serão observadas se alguma transformação acontecer na molécula, alterando o seu decaimento para o estado fundamental (LAKOWICZ, 2006; BERTOZZO, 2021).

2.2 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO ALBUMINA-PROTEÍNA

Utilizando os valores dos espectros obtidos na supressão da fluorescência com e sem a presença do ligante nas proteínas e as concentrações das proteínas e ligantes, determinou-se a constante de associação, K_a . Todos os valores utilizados para o cálculo do K_a , foram obtidos nas titulações de HSA com a C343 com a finalidade da formação do complexo HSA-C343. Assim, utilizando a equação 1, onde F_0 , e F são, respectivamente, a fluorescência na ausência de proteína, n a relação estequiométrica entre proteína e ligante e a fluorescência em uma concentração intermediária de proteína e L a concentração do ligante.

$$\text{Log } K_a + n \cdot \text{Log } L = \text{Log } \frac{F_0 - F}{F} \quad (1)$$

Os valores das fluorescências foram corrigidos devido ao efeito do filtro interno utilizando a equação 2, onde F_{corr} é a fluorescência corrigida, F_{obs} é a fluorescência observada, A_{exc} é a absorbância de excitação e A_{em} é a absorbância de emissão. O valor de F_{corr} obtido, foi determinado utilizando os valores da absorbância em 295 nm e em 340 nm, comprimentos de onda atribuídos à absorção e emissão de fluorescência da HSA, em relação ao triptofano (LAKOWICZ, 2006).

$$F_{corr} = F_{obs} * 10^{\frac{(A_{exc} + A_{em})}{2}} \quad (2)$$

2.3 TÉCNICA DE DICROÍSMO CIRCULAR ELETRÔNICO – ECD

A espectroscopia de Dicroísmo circular ou ECD (Electronic Circular Dichroism), é uma técnica espectroscópica que mede a diferença na absorção de luz polarizada circularmente para a esquerda e para a direita. A luz polarizada circularmente é composta por duas componentes, uma girando no sentido horário e outra girando no sentido anti-horário. A ECD é uma técnica sensível à estrutura e à configuração de moléculas opticamente ativas (BEROVA, *et al.*, 2000).

A proteína albumina sérica humana, HSA, é um composto quiral e

apresenta um espectro característico de dicroísmo, assim, interações com ligantes podem provocar mudanças no espectro de dicroísmo da proteína. Este método é muito sensível a pequenas mudanças no ambiente, revelando informações sobre alterações na estrutura da HSA (PISTOLOZZI; BERTUCCI, 2008; ZHIVKOVA, ZVETANKA D, 2015). O mesmo se verifica na sensibilidade do método com o uso da albumina sérica bovina, BSA, que também é quiral.

No ECD, podemos ainda observar o fenômeno chamado dicroísmo circular induzido (ICD) que ocorre quando há a indução de atividade ótica de um composto aquiral (ligante) a partir de sua colocação em um meio quiral (molécula indutora de quiralidade). Esse fenômeno é observado nos espectros de CD a partir do aparecimento ou deslocamento de uma banda onde antes da complexação das duas unidades não havia sinal. Quando colocado em um meio quiral, a molécula pode sofrer desde interações com o meio anisotrópico ou até mesmo restringir seu grau de liberdade, entre outros efeitos, e assim apresentar esse novo sinal. Através do ECD é possível se obter parâmetros termodinâmicos de ligação, informações sobre a estequiometria e o constante de afinidade entre o ligante e a molécula indutora de sinal. (GAWROŃSKI, J, et al, 2003; ALLENMARK, S, 2003; PASTRELLO, B, 2021).

Assim, o ECD, favorece o estudo da interação de ligantes, como fármacos que podem ou não apresentar quiralidade e as proteínas que são quirais.

Neste trabalho, fizemos uma comparação preliminar entre a interação da C343 com a HSA e com a BSA, obtendo assim resultados importantes para futuros estudos, especialmente no uso da BSA como modelo de interação para a HSA.

2.4 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

O estudo computacional é uma metodologia extremamente útil e norteadora em muitos trabalhos, especialmente por podermos simular situações e buscar resultados e hipóteses em relação aos resultados experimentais. Os estudos computacionais podem auxiliar na compreensão físico-químico da formação do complexo proteína-ligante, desse modo busca elucidar, por exemplo a região na qual o ligante está ligado no sítio da proteína, quais são os possíveis aminoácidos que estejam interagindo com o ligante e seus respectivos valores de distanciamento nas interações.

2.4.1 Docking Molecular

O *docking* molecular pode ser usado para modelar a interação entre uma molécula pequena e uma proteína em nível atômico, o que nos permite caracterizar o comportamento de pequenas moléculas no sítio de ligação de proteínas alvo, bem como elucidar processos bioquímicos fundamentais (MCCONKEY *et al.*, 2002). Sendo assim uma técnica computacional que permite prever a orientação e a posição de uma molécula, denominada ligante, em relação a outra molécula, denominada receptor. O objetivo do *docking* molecular é encontrar a conformação do ligante e do receptor que maximiza a interação entre eles (MENG *et al.*, 2011).

As ferramentas de *docking* utilizadas empregam algoritmos de busca, como algoritmos genéticos, algoritmos baseados em fragmentos, algoritmos de Monte Carlo e algoritmos de dinâmica molecular. Além disso, existem algumas ferramentas como AutoDock, GOLD, FlexX e ICM que são usadas principalmente para simulações de *docking* (YOGUIM, 2021).

Assim, com o resultado do *docking*, foi possível obter as interações da C343 com a HSA e BSA em seus sítios específicos e estimar as energias envolvidas nestas interações, bem como determinar as interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio com os aminoácidos das cadeias laterais da HSA e BSA.

2.5 ESTUDOS DE DFT

Os estudos de DFT foram introduzidos por Hohenberg e Kohn, onde se utiliza uma função de onda descrita em termos da densidade eletrônica ao invés de funções de onda individual. O ponto de partida para o seu desenvolvimento foi o método de Thomas-Fermi, da década de 20. Atualmente, esta teoria é a mais utilizada, juntamente com seus funcionais de densidade híbridos (que aplicam uma mistura de funcionais HF e DFT) e dentre os funcionais mais utilizados, encontra-se o B3LYP (BECKE, 1988), já que os resultados teóricos obtidos quando do uso deste aproxima-se mais do experimental.” (LAURENT e JACQUEMIN, 2013).

A DFT surgiu como alternativa aos tradicionais métodos *ab initio* e semi-empíricos no estudo de propriedades do estado fundamental de sistemas moleculares. A grande vantagem desta metodologia sobre os métodos *ab initio* está no ganho da velocidade computacional e espaço em memória. Em contraste com

outros métodos semi-empíricos o hamiltoniano da DFT é bem definido e suas características não são obscurecidas por frequentes e injustificáveis aproximações no procedimento computacional.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi usado o funcional B3LYP. Funcional híbrido que considera 20% do termo de troca HF.

Para otimizações e cálculos de energia no estado fundamental, a componente temporal da equação de Schrodinger pode ser negligenciada. Porém, para simulações espectroscópicas como na região do Ultravioleta (UV), Dicroísmo Circular Eletrônico (do inglês Electronic Circular Dichroism - ECD), espectro de emissão, entre outros, é necessário que a componente temporal seja incluída. Para esses casos, portanto, devemos trabalhar com a Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (Time Dependent Density Functional Theory, em inglês, TD-DFT). A base das equações passa a ser o hamiltoniano com o termo temporal. Assim, buscamos com os valores obtidos, utilizando este método, correlacionar os dados experimentais de ECD e energia com os resultados teóricos envolvendo o *Docking*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a formação do complexo entre a C343 e as proteínas HSA e BSA, sob os aspectos teóricos, *Docking* Molecular e TD-DFT e experimentais de espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular eletrônico (ECD).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a constante de ligação, K_a , da C343 com a HSA e BSA, utilizando a supressão da fluorescência da interação ligante-proteína;
- b) Determinar a proporcionalidade entre a C343 e a HSA através da metodologia de Job's Plot e assim estender a mesma proporção para a BSA;
- c) Determinar o sítio de interação preferencial da C343 na HSA;
- d) Determinar através de estudos termodinâmicos as energias envolvidas na interação da C343 com a HSA;
- e) Buscar hipóteses e respostas para os resultados experimentais de ECD obtidos na interação da HSA e BSA com a C343;
- f) Correlacionar os resultados teóricos de TD-DFT com os resultados obtidos experimentalmente, especialmente de ECD;
- g) Nos estudos de *Docking* molecular confirmar o sítio de interação preferencial da Cumarina com a HSA e com a BSA e as possíveis interações com os aminoácidos das cadeias laterais das proteínas.

4 MATERIAIS

4.1 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados nesse trabalho foram: Espectroscopia de Fluorescência (PerKin Elmer LS55), acoplado a um sistema de aquecimento microprocessador Control MPC (HUBER), balança analítica (AG245 – Mettler Toledo), pipetas (LabMate Soft), medidor de pH (300 Digital – Analyser). Espectrofotômetro Ultravioleta (Agilent Technologies Cary 8454), ECD (Jasco J-815 CD spectrometer), agitador de soluções (agitador de tubos MA 162 Marconi).

4.2 SOFTWARES

Foram utilizados os seguintes softwares nesse trabalho: Genetic Optimization for Ligand *Docking* 2020.3.0 (GOLD), Discovery Studio Visualizer 2021 (DS), OriginPro 8, GraphPad Prism 7, Gaussian 16, Gaussian09, UCSF Chimera 1.17 (Chimera) e Gausview 6.

4.3 SOLUÇÕES

As soluções foram preparadas usando a solução tampão de pH 7,4 de mono e dihidrogeno fosfato de sódio de 50 mmol.L⁻¹.

4.3.1 HSA

Foi medido 0,033g de HSA (A3782 – Livre de globulina) dissolvida em 0,5 ml de solução tampão obtendo uma concentração final de 1,0 mmol.L⁻¹.

4.3.2 BSA

Foi medido 0,033 g de BSA (7030 em Tris) dissolvida em 0,5 ml de solução tampão obtendo uma concentração final de 1,0 mmol.L⁻¹.

4.3.3 Cumarina-343

Foi medido 0,0028g de C343 (Sigma Aldrich 393029) dissolvida em 1,0 ml de solução de DMSO obtendo uma concentração final de $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$. E a partir dessa solução realizou-se as diluições necessárias para cada experimento.

4.3.4 Varfarina

Foi preparada uma solução de Varfarina (Sigma Aldrich) 10 mmol.L^{-1} , assim foi medido 3,09 mg e diluído em 1,0 mL de etanol. E, a partir dessa solução, realizou-se as diluições necessárias para cada experimento.

4.3.5 Ibuprofeno

Foi preparada uma solução de ibuprofeno (Sigma Aldrich) 10 mmol.L^{-1} , assim foi medido 2,06 mg e diluído em 1,0 mL de etanol. E, a partir dessa solução, realizou-se as diluições necessárias para cada experimento.

4.3.6 Digitoxina

Foi preparada uma solução de digitoxina (Sigma Aldrich) 10 mmol.L^{-1} , assim foi medido 7,66 mg e diluído em 1,0 mL de etanol. E, a partir dessa solução, realizou-se as diluições necessárias para cada experimento.

5 PROCEDIMENTO

5.1 VERIFICAÇÃO DA COMPLEXAÇÃO ENTRE C343-HSA ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A investigação sobre a afinidade da cumarina 343 pela proteína HSA foi conduzida por meio de análises no espectro de fluorescência.

Inicialmente, foi preparada solução da proteína com concentração de $10,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, a qual foi transferida para uma cubeta de quartzo de 2,0 mL, com caminho óptico de 10,0 mm. Em seguida, a solução foi submetida à análise no equipamento de fluorescência para a obtenção do espectro da proteína, utilizando excitação em 295 nm e emissão em 340 nm, com varredura na faixa de 310 a 450 nm. Após a obtenção do espectro de fluorescência da proteína, foram realizadas adições sucessivas da solução de C343 ($10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) na forma de titulação, em volumes de $0,5 \mu\text{L}$, até se atingir uma concentração final do ligante de $20,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Cada adição resultava em uma concentração intermediária de $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Após cada adição, a solução foi submetida à agitação por 2 minutos antes da obtenção do espectro de fluorescência.

Os espectros de fluorescência foram registrados para cada adição da C343, utilizando as mesmas condições experimentais aplicadas à solução da proteína. O equipamento de fluorescência estava acoplado a uma fotomultiplicadora de 700 V, com um filtro de 8%.

5.2 ESTUDOS TERMODINÂMICOS

Os estudos termodinâmicos foram realizados por meio da adição da solução de C343 à solução de HSA em diferentes temperaturas, com o objetivo de determinar os valores de entalpia, energia livre de Gibbs e entropia do sistema.

Para isso, uma solução de HSA com concentração de $10,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi adicionada a uma cubeta de quartzo de 2,0 mL, com caminho óptico de 10,0 mm. A amostra foi então submetida à análise no equipamento de fluorescência, utilizando excitação em 295 nm, emissão em 340 nm e varredura na faixa de 310 a 450 nm.

Após essa etapa, a mesma cubeta recebeu adições sucessivas da solução de cumarina 343 ($10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) em volumes de $0,5 \mu\text{L}$, resultando em uma

concentração intermediária de $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na solução. As adições foram realizadas até se atingir uma concentração final de $20,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do ligante. Em seguida, as análises no espectrômetro de fluorescência foram repetidas, mantendo-se os parâmetros utilizados na análise inicial da proteína. O equipamento de fluorescência estava acoplado a uma fotomultiplicadora de 700 V, com um filtro de 8%, e as soluções foram agitadas em intervalos de 2 minutos antes de cada medição.

Os experimentos foram realizados em duas temperaturas diferentes, 20°C (293 K) e 40°C (313 K), permitindo assim a determinação dos valores de entalpia, energia livre de Gibbs e entropia do sistema.

- Entalpia (ΔH)

Para determinar o valor de entalpia utilizamos a Equação 3, onde o K indica a constante de ligação nas duas temperaturas T_1 (293K) e T_2 (313K) e R é a constante dos gases em $\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$.

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (3)$$

- Energia Livre de Gibbs (ΔG)

A partir dos valores de entalpia nas temperaturas T_1 e T_2 e seus respectivos valores de K_a , foi determinada a energia livre de Gibbs utilizando a Equação 4.

$$\Delta G = -RT \ln k \quad (4)$$

- Entropia

Com os valores de entalpia, energia livre de Gibbs e as temperaturas T_1 e T_2 , foi possível calcular a entropia do sistema utilizando a Equação 5.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

5.3 DETERMINAÇÃO ESTEQUIOMÉTRICA DE C343 E HSA ATRAVÉS DO MÉTODO DE JOB'S PLOT.

Este método foi utilizado para determinar as proporções estequiométricas

da complexação entre HSA e C343, resultado que também se estendeu à complexação com BSA.

Foram preparadas dez soluções contendo C343 e a proteína HSA, com concentrações variando de 1 a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para cada uma. No entanto, a soma das molaridades do ligante e da proteína foi mantida constante em 11 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, conforme demonstrado na Tabela 1.

Observa-se, a partir da Tabela 1, que as concentrações de C343 e HSA são inversamente proporcionais: à medida que a molaridade da C343 aumenta, a da proteína HSA diminui.

Tabela 1 – Variação das concentrações de C343 e HSA resultando na fração molar final de 11 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

C343 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	HSA ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
10	1
9	2
8	3
7	4
6	5
5	6
4	7
3	8
2	9
1	10

Fonte: elaborado pela autora

Em seguida, foram realizadas medidas de fluorescência utilizando os seguintes parâmetros: excitação em 340 nm, emissão em 480 nm, filtro em 8%, fotomultiplicadora a 700 V e abertura de fenda de 10 nm.

A partir dos valores de fluorescência obtidos, foi gerado um gráfico no Prisma no qual foram traçadas duas retas e o ponto de interseção dessas retas corresponde à fração molar entre C343 e HSA, determinada com base na Equação 6.

$$X_{C343} = \frac{X_{C343}}{X_{C343} + X_{HSA}} \quad (6)$$

5.4 DETERMINAÇÃO DE SÍTIO PREFERENCIAL DA C343 NA HSA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Os estudos para determinar o sítio preferencial de maior afinidade da C343 basearam-se na análise dos resultados obtidos por fluorescência. Para isso, utilizou-se a técnica de competição por sítios, empregando fármacos específicos para cada um deles. Foram preparadas soluções de Varfarina (Sítio I - DS1), Ibuprofeno (Sítio II- DS2) e Digitoxina (Sítio III - DS3), conforme descrito anteriormente.

Em uma cubeta de quartzo de 10,0 mm de caminho óptico de 2,0 mL, foi adicionada uma solução de C343 a 2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, e sua fluorescência foi medida, obtendo-se o primeiro espectro. Em seguida, adicionou-se a proteína HSA na mesma concentração (2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), registrando-se assim o segundo espectro de fluorescência. Após a obtenção dos espectros da C343 isolada e do complexo C343-HSA, foram adicionadas sucessivas alíquotas de 2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do fármaco competidor. As adições prosseguiram até atingir uma molaridade final de 15,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Esse procedimento foi repetido para os três fármacos testados: varfarina, ibuprofeno e digitoxina (DS1, DS2 e DS3, respectivamente).

O equipamento de fluorescência foi ajustado para uma excitação em 340 nm e emissão em 480 nm, com varredura de 400 a 600 nm, intensidade de 8%, fotomultiplicadora ajustada para 700 V e abertura de fenda de 10 nm.

5.5 ESTUDOS DE DICROÍSMO CIRCULAR INDUZIDO NA FORMAÇÃO DO COMPLEXO ENTRE A CUMARINA 343 E AS PROTEÍNAS ALBUMINAS HUMANA (HSA) E BOVINA (BSA).

Os estudos de Dicroísmo Circular Eletrônico (ECD) foram realizados para investigar o comportamento da C343 na presença das proteínas HSA e BSA.

Para a análise, foram preparadas soluções específicas e transferidas para uma cubeta fechada antes da leitura no equipamento de ECD. As amostras foram divididas em cinco alíquotas: três delas contendo soluções isoladas de C343, HSA e BSA, e as outras duas correspondendo às misturas de C343 com cada proteína

(HSA + C343 e BSA + C343).

A partir de uma solução estoque de C343 com concentração de 10,0 mmol.L⁻¹, foram utilizados 6 µL para obter uma solução final com concentração de 30,0 µmol.L⁻¹, que foi empregada nas etapas seguintes do experimento. Para as proteínas HSA e BSA, partiu-se de soluções previamente preparadas com concentração de 1,0 mmol.L⁻¹, das quais foram retirados 60 µL para obter uma solução final de 30,0 µmol.L⁻¹.

Os três primeiros ensaios foram realizados com as soluções isoladas de C343, HSA e BSA, todas com concentração de 30,0 µmol.L⁻¹. Nos outros dois ensaios, que investigaram o comportamento das proteínas na presença da C343, foram adicionados 60 µL da proteína e 6 µL de C343, deixando-se a solução em repouso por 5 minutos antes da análise.

O procedimento foi realizado em três temperaturas distintas: 20°C, 30°C e 40°C. As análises no equipamento de ECD foram conduzidas com uma varredura de 250 nm a 600 nm e fotomultiplicadora ajustada para 700 nm.

5.6 ESTUDOS DE *DOCKING* MOLECULAR

Os estudos de *docking* molecular foram conduzidos para investigar a interação da C343 com três sítios de ligação para fármacos na proteína HSA, localizados nos subdomínios IB (DS3), IIA (DS1) e IIIA (DS2).

O *docking* molecular desempenha um papel fundamental na predição dos sítios de maior afinidade, permitindo uma análise detalhada das interações moleculares e contribuindo para a compreensão dos mecanismos de reconhecimento molecular da C343 na HSA.

Para garantir a eficiência do estudo, foram selecionadas duas estruturas cristalográficas: o PDB 2XW0 (RYAN, A. et al., 2011), que contém a dansil-L-fenilalanina nos sítios DS1 e DS2 e apresenta uma resolução de 2,40 Å, e o PDB 2BX8 (GHUMAN, J. et al., 2005), que possui a azapropazona nos sítios DS1 e DS3, com uma resolução de 2,70 Å. Essas estruturas foram analisadas nos softwares Discovery Studio (DS) e Chimera 1.7.1 para verificar semelhanças estruturais, garantindo a comparabilidade dos resultados obtidos no *docking*.

A estrutura da C343 foi modelada no software GaussView 6 e posteriormente validada no Discovery Studio Visualizer 2021 (DS) para assegurar a

correta interpretação do input antes da execução dos cálculos de *docking* molecular.

Os estudos de *redocking* e *docking* molecular foram realizados no software GOLD 2022.3.0, utilizando o parâmetro de pontuação chemscore_kinase com a função de pontuação Goldscore, descrita pela Equação 7:

$$Fit\ function = S(hb_ext) + 1.3750 \times S(vdw_ext) + S(int) \quad (7)$$

Onde S (hb_ext) representa a energia das ligações de hidrogênio entre a proteína e o ligante, S (vdw_ext) corresponde à energia das interações do tipo van der Waals, e S (int) é uma penalização para ajustes internos do ligante (JOHNSON et al., 2010; KOZUCH et al., 2013).

O *docking* molecular também permitiu a variação do raio de estudo do ligante e, quando necessário, ajustes nos aminoácidos da proteína, incluindo protonação, rotação e flexibilização das cadeias laterais. Para cada cálculo, foram realizadas 10 corridas, utilizando os parâmetros chemscore_kinase, com a função de pontuação GoldScore, variando raio de estudo sobre o ligante, garantindo assim um conjunto robusto de dados para interpretação.

A avaliação dos resultados foi realizada no software DS, inicialmente por inspeção visual dos confôrmeros gerados, correlacionando suas posições com os valores energéticos obtidos. Em seguida, foram analisadas as interações específicas entre a C343 e os resíduos aminoácidos nos sítios estudados.

A importância do *docking* molecular neste estudo reside na sua capacidade de prever interações moleculares com um bom nível de detalhamento, permitindo não apenas identificar os sítios preferenciais de ligação, mas também compreender a estabilidade e os padrões de interação da C343 com a HSA. Estes resultados são importantes para o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas e farmacológicas, auxiliando no planejamento racional de fármacos e biomarcadores.

5.7 ESTUDOS DE DFT PARA C343 NA HSA E NA BSA

Os estudos utilizando a Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (Time Dependent Density Functional Theory, em inglês, TD-DFT), foram realizados nos clusters do GridUnesp. Os resultados obtidos a partir dos cálculos de *docking* molecular serviram como coordenadas cartesianas iniciais para a geração

dos inputs necessários aos cálculos de TD-DFT e à obtenção do ECD teórico.

Os funcionais empregados foram B3LYP e CAM-B3LYP. O funcional B3LYP, denominado Becke's Three-Parameter Exchange Functional (B3LYP), é uma combinação empírica de funcionais de troca de Hartree-Fock e DFT, associada ao funcional de correlação Lee-Yang-Parr (LYP), desenvolvido por Lee, Yang e Parr. A correlação entre esses funcionais resultou no funcional híbrido B3LYP (NAKATA, A, et al, 2006).

A base utilizada neste estudo foi 6-311++G(2d,p). Nessa notação, 6-311 indica o uso de seis funções gaussianas primitivas e três conjuntos de funções gaussianas. O primeiro "+" indica a adição de funções difusas aos elementos pesados, enquanto o segundo "+" representa a inclusão dessas funções aos átomos de hidrogênio. Já 2d,p refere-se à polarização: 2d indica a adição de dois conjuntos de funções polarizadas do tipo *d* aos átomos pesados, enquanto p representa a polarização do tipo *p* nos átomos de hidrogênio (PITMAN, S, et al, 2023; MAHAMIIYA, V, et al, 2022).

Os estudos também consideraram variações no microambiente, incluindo a adição de solventes implícitos e explícitos, além da realização de cálculos no vácuo. Os solventes utilizados foram água, dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrila e etanol. No entanto, os melhores resultados dos espectros de ECD foram observados nas condições sem adição de solventes.

Além disso, foram realizados estudos com variação de diedros na C343, abrangendo uma varredura de 30° a 360°, com incrementos de 30°. Dessa forma, obteve-se um total de 12 conformações para cada diedro, que foram posteriormente calculadas utilizando o mesmo nível teórico empregado na varredura. Os resultados obtidos a partir dessas análises permitiram a determinação do ECD teórico.

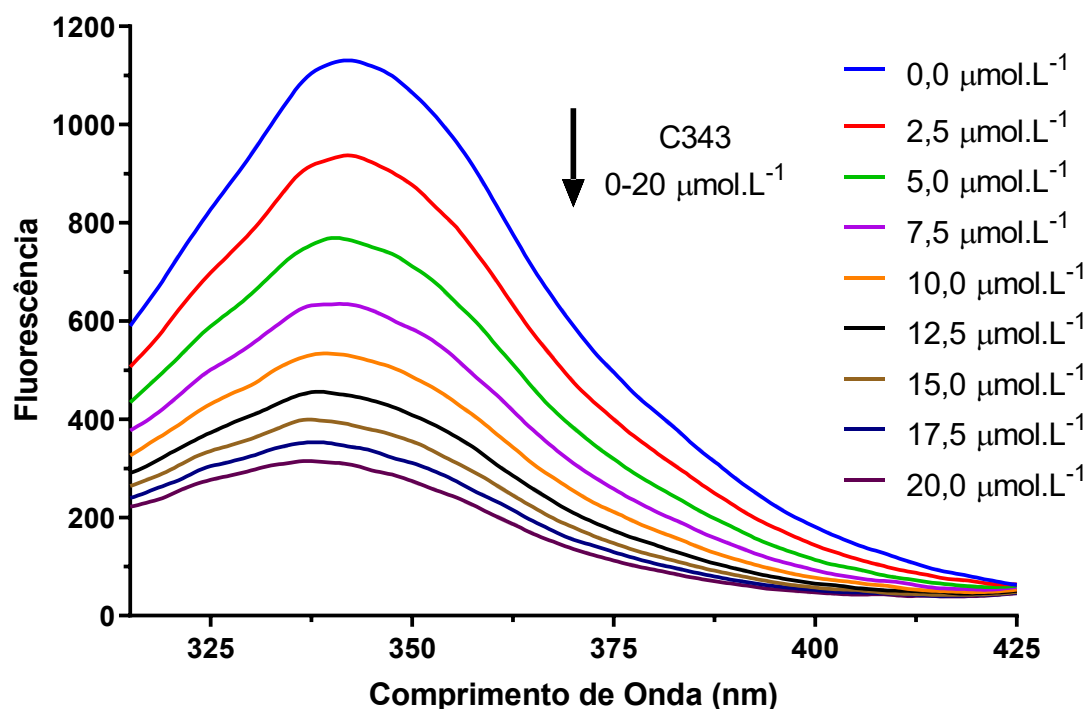
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 A FORMAÇÃO DO COMPLEXO HSA-C343

A C343, quando utilizada como sonda, interage com a proteína HSA, formando um complexo que se encontra em equilíbrio entre suas formas livre e complexada. Os resultados de fluorescência desse complexo estão representados na Figura 7.

Observa-se que o espectro na coloração azulada corresponde ao experimento realizado na presença exclusiva da proteína HSA, ou seja, na condição de proteína livre, sem a presença de C343. Nessa condição, o comprimento de onda máximo de emissão é de 342 nm, característico da HSA, em concordância com os estudos de Zhang et al. (2013) e Bijari et al. (2018).

Figura 7 – Espectro da supressão de fluorescência da HSA com adição de cumarina.



Fonte: elaborado pela autora

Ao adicionar alíquotas de 2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de C343, observa-se uma redução na intensidade dos espectros de fluorescência. Esse fenômeno ocorre devido à

supressão de fluorescência, que indica a interação entre o fluoróforo e o agente supressor (NETO, 2020), corroborando, assim, com o estudo de Datta e Mintu (2014).

Como esses processos refletem um estado de equilíbrio entre as formas livre e complexada da proteína, a adição de C343 promove a interação com a HSA, resultando na formação do complexo. Consequentemente, a quantidade de proteína livre diminui, o que leva à supressão da intensidade de fluorescência.

A fluorescência da proteína HSA é influenciada por aminoácidos presentes em sua estrutura primária, como triptofano, tirosina e fenilalanina. Quando excitada na região de 280 nm até 295 nm, a emissão de fluorescência da cadeia peptídica ocorre principalmente devido ao triptofano, com pico em 350 nm, sendo este o fluoróforo predominante. Já a fenilalanina e a tirosina apresentam baixos rendimentos quânticos nessa região, devido à ionização e aos efeitos de polarização induzidos pelo microambiente ao seu redor (PETERS, 1995; GUIZADO, 2008; AL-HARTHI, 2019; NETO, et al, 2020).

Após confirmar a afinidade da cumarina pela proteína, foi possível calcular a constante de associação (K_a) do complexo C343-HSA a partir dos dados de fluorescência obtidos.

Neste trabalho, é apresentado o valor da constante de associação (K_a) para o complexo BSA-C343. Esses resultados foram obtidos a partir das análises realizadas pelo grupo de pesquisa do professor Valdecir Ximenes, utilizando metodologias similares para ambas as proteínas.

6.2 DETERMINAÇÃO DO K_a A PARTIR DA EQUAÇÃO

A determinação do valor da constante de associação (K_a) é de grande relevância, pois a formação do complexo com a proteína HSA está diretamente relacionada à distribuição, ação e eliminação dos fármacos no organismo humano (DASGUPTA, 2016; NETO et al., 2020).

A obtenção do valor de K_a foi possível por meio da equação 1, derivada de expressões matemáticas que correlacionam a intensidade de fluorescência do complexo em diferentes concentrações de ligantes. Essa equação baseia-se nos estudos de Hildebrand e Benesi (1949), Lakowicz (2006), Rawel, Meidtner e Kroll (2005), Roy (2004) e Zsila, Hazai e Sawyer (2005).

Os valores de K_a foram determinados a partir dos espectros de

fluorescência obtidos no experimento de formação do complexo entre a C343 e a proteína HSA (Seção 4.1). Conforme demonstrado na Figura 7, o pico máximo de emissão de fluorescência ocorre em 342 nm, característica da HSA livre. A partir dessa informação, foi calculada a quantidade de proteína complexada com a C343, considerando a subtração dos espectros obtidos na presença do ligante em relação à proteína livre ($\lambda = 342$ nm). O valor de fluorescência resultante dessa análise foi denominado fluorescência observada (F_{obs}).

Para um melhor resultado, a fluorescência observada foi corrigida (F_{corr}) considerando os valores de absorbância nos estados de excitação (A_{exc}) e emissão (A_{em}), de acordo com a Equação 2.

Essa correção é necessária porque o espectro de excitação corrigido corresponde ao espectro de absorção, desde que o relaxamento radiativo ocorra a partir do nível vibracional fundamental do estado eletrônico excitado (GOÉS FILHO, 2010).

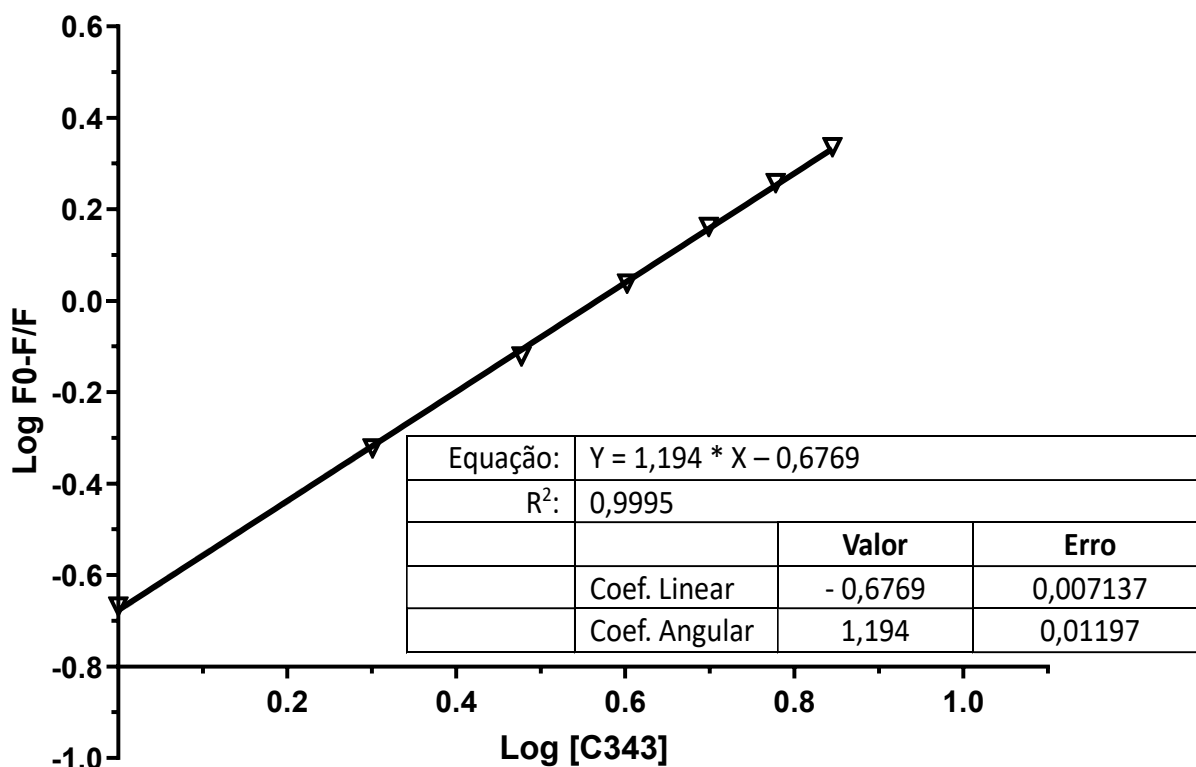
Após a determinação dos valores de fluorescência corrigida, foi realizada a subtração desses valores em relação ao estado inicial e, em seguida, a divisão pelo valor da fluorescência corrigida. Com base nesses resultados, foi gerado um gráfico (Figura 8), permitindo a obtenção da constante de ligação, utilizando a Tabela 2. Os resultados gerados partiram de análises feitas em triplicata.

Tabela 2 – Valores obtidos e calculados a 20°C para determinação da constante de ligação (Ka).

Aexc	Aem	Fobs	Fcorr	F ₀ -F	(F ₀ -F)/F	Log [(F ₀ -F)/F]	[L]	Log [L]
1,90x10 ⁻²	3,94x10 ⁻³	56913	5,72x10 ⁺⁴	0,00	0	0	1	0
2,94x10 ⁻²	8,75 x10 ⁻³	46284	4,68 x10 ⁺⁴	10418,67	0,22	-0,65	2	0,30
3,76x10 ⁻²	1,20 x10 ⁻³	38302	38834,7	1,83E+04	0,47	-0,32	3	0,47
4,61x10 ⁻²	1,56 x10 ⁻³	32304	32889,35	2,43E+04	0,73	-0,13	4	0,60
5,51x10 ⁻²	1,94 x10 ⁻³	26684	27285,66	2,99E+04	1,09	0,04	5	0,69
6,31x10 ⁻²	2,24 x10 ⁻³	22820	23416,4	33755,14	1,44	0,15	6	0,77
7,12x10 ⁻²	2,56 x10 ⁻³	19928	20523,99	36647,55	1,78	0,25	7	0,84
8,01x10 ⁻²	2,93 x10 ⁻³	17651	18257,1	38914,44	2,13	0,32	8	0,90
8,84 x10 ⁻²	3,26 x10 ⁻³	15940	16549,63	40621,91	2,45	0,39	9	0,95
9,70 x10 ⁻²	3,63 x10 ⁻³	14511	15130,55	42040,98	2,77	0,44	10	1

Fonte: elaborado pela autora

Figura 8 – Gráfico da regressão linear dos resultados obtidos nos espectros de fluorescência do complexo C343-HSA.



Fonte: Elaborado pela autora.

Com o auxílio da Figura 8, foi possível calcular o valor da constante de associação (K_a) para a formação do complexo C343-HSA.

A partir dos valores do coeficiente linear ($-0,6769 \pm 0,007137$) e do coeficiente angular ($1,194 \pm 0,1197$), aplicou-se a equação 1 para determinar a constante de ligação, resultando em $2,10 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Como não há registros na literatura sobre o valor da constante de ligação da C343, realizou-se um levantamento de dados de alguns fármacos e de outras cumarinas, conforme apresentado na Tabela 3. Assim esse levantamento permitiu verificar se a ordem de grandeza do valor obtido está dentro dos padrões relatados na literatura. Observa-se que os valores de K_a para diferentes ligantes geralmente variam entre 10^4 e $10^6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, o que confirma a coerência do valor encontrado para a C343.

Tabela 3 – Alguns valores de Ka da formação do complexo Ligante-HSA.

LIGANTE	Ka (mol.L ⁻¹)	REFERÊNCIAS
Varfarina (S)	1,05 x 10 ⁵	Rimac <i>et al.</i> , 2017
Digitoxina	1,5 x 10 ⁵	Kragh-Hansen, 1985
Indometacina	1,4 x 10 ⁵	Rimac <i>et al.</i> , 2020
Fenitoina	745 a 2,0 x 10 ⁴	Chen <i>et al.</i> , 2004
Furosemida	4,09 x 10 ⁵	Zaidi <i>et al.</i> , 2013
Diazepam (S)	2,5 x 10 ⁵	Maruyama <i>et al.</i> , 1985
Ibuprofeno	≥ 2,0 x 10 ⁶	Evoli <i>et al.</i> , 2016
Naproxeno	1,2 a 1,8 x 10 ⁶	Lejon <i>et al.</i> , 2008
Cumarina 152	1,47 x 10 ⁵	Yadav <i>et al.</i> , 2017
Cumarina 515	2,5 x 10 ⁵	Wen <i>et al.</i> , 2011
Cumarina 35	4,8 x 10 ⁵	Wen <i>et al.</i> , 2011
Cumarina 466	4,9 x 10 ⁵	Wen <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Elaborado pela autora.

A Tabela 3 apresenta os valores de Ka encontrados na literatura, permitindo verificar que a C343 está na mesma ordem de grandeza de outras cumarinas. Isso reforça a consistência do valor obtido no experimento, comparado com os dados disponíveis para outras cumarinas.

Considerando que o cálculo da constante de ligação auxilia na compreensão da quantidade de cumarinas interagindo com o receptor, foram realizados estudos termodinâmicos para aprofundar a análise sobre a formação deste complexo.

6.3 ESTUDOS TERMODINÂMICOS

O estudo dos valores termodinâmicos envolve o cálculo de parâmetros que indicam o comportamento do complexo formado. Para uma análise mais precisa, é necessário realizar os cálculos em diferentes temperaturas, a fim de verificar se ocorre degradação da proteína, o que poderia influenciar na formação do complexo.

Para a obtenção desses resultados, foram utilizadas expressões matemáticas que determinam os valores de entalpia (ΔH , Equação 3), energia livre de Gibbs (ΔG , Equação 4) e entropia (ΔS , Equação 5).

As análises foram realizadas em 293 K (20°C) e 313 K (40°C), conforme demonstrado na Tabela 4. Esse intervalo de temperatura foi adotado com base nos limites dentro dos quais a proteína pode sofrer modificações estruturais sem, no entanto, apresentar uma alteração conformacional permanente (AHMAD et al., 2015; REZAEI-TAVIRANI et al., 2006).

A interpretação dos valores obtidos possibilitará a análise de diferentes aspectos do sistema em estudo. Primeiramente, será possível verificar se ocorre absorção ou liberação de energia com base nos valores da entalpia (ΔH). Em seguida, os valores de entropia (ΔS) indicarão se há um aumento ou uma redução na desordem do sistema. Por fim, a análise dos valores da energia livre de Gibbs (ΔG) permitirá determinar se a formação do complexo se dá de forma espontânea ou não espontânea (FERRIER, 2018).

Além disso, nas mesmas temperaturas, foram determinados os valores das constantes de ligação, permitindo avaliar sua influência na formação do complexo C343-HSA.

Tabela 4 – Valores de entalpia, entropia e energia livre de Gibbs.

Temperatura	Ka	ΔH	ΔG	ΔS
(K)	(10^5 mol.L^{-1})	(kJ.mol^{-1})	(kJ.mol^{-1})	($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)
293	$2,10 \pm 0,04$	-16,90	-29,86	+44,23
313	$1,35 \pm 0,06$	-16,90	-30,74	+44,22

Fonte: Elaborado pela autora.

Os estudos termodinâmicos demonstram que a formação do complexo C343-HSA é um processo exotérmico, conforme evidenciado pelo valor negativo da entalpia ($\Delta H = -16,898 \text{ kJ.mol}^{-1}$), indicando a liberação de calor durante a interação.

A energia livre de Gibbs (ΔG) é um parâmetro determinante para avaliar a espontaneidade do processo de complexação. Os dados apresentados na Tabela 4

revelam um valor negativo de ΔG , indicando que a formação do complexo ocorre de maneira termodinamicamente favorável. Ademais, tais resultados sugerem que as interações hidrofóbicas desempenham um papel preponderante na estabilização do complexo HSA-C343 devido ao aumento da entropia do sistema, causado pela liberação de moléculas de água ordenadas ao redor dos grupos apolares durante a complexação.

A variação da entropia (ΔS) também constitui um fator essencial na caracterização da complexação proteína-ligante. O valor positivo de ΔS sugere um aumento na desordem do sistema, contribuindo para a redução do potencial químico e corroborando a espontaneidade do processo.

Adicionalmente, observa-se uma correlação entre a variação da entropia e a temperatura, possivelmente decorrente do rearranjo das moléculas de água no processo de solvatação da proteína HSA pela C343, o que pode justificar a leve variação nos valores de ΔS .

Com o intuito de avaliar a complexação em diferentes temperaturas, foi determinada a constante de associação (K_a) para as condições experimentais adotadas. Observa-se uma redução nos valores de K_a com o aumento da temperatura (Tabela 5), sugerindo que a estabilidade do complexo diminui em temperaturas mais elevadas, tornando sua formação termodinamicamente menos favorável.

Tabela 5 – Valores de Ka e desvio padrão nas temperaturas de 293K e 313K.

	T = 293K	T = 313K
1ª Análise	$2,13 \times 10^5$	$1,41 \times 10^5$
2ª Análise	$2,15 \times 10^5$	$1,35 \times 10^5$
3ª Análise	$2,03 \times 10^5$	$1,29 \times 10^5$
Ka (mol.L ⁻¹)	$(2,10 \pm 0,04) \times 10^5$	$(1,35 \pm 0,06) \times 10^5$
Desvio Padrão	$0,05 \times 10^5$	$0,06 \times 10^5$
R ²	0,9992	0,9986

Fonte: Elaborado pela autora.

Os estudos termodinâmicos possibilitaram a compreensão do comportamento da interação entre a cumarina e a albumina sérica humana (HSA). A partir dessas análises, buscou-se identificar o tipo de interação predominante entre a sonda e a proteína, por meio do cálculo da constante de Stern-Volmer. Todos os cálculos se basearam na relação estequiométrica entre proteína e ligante com n igual a 1, sendo assim a proporção 1:1. Valor este confirmado pelo job's plot.

6.4 SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA

Os estudos sobre a supressão de fluorescência têm sido fundamentais para a compreensão de fenômenos essenciais e para a obtenção de informações sobre diversos sistemas bioquímicos. Um exemplo disso é a análise das dinâmicas de proteínas em sistemas complexos de macromoléculas (LUIZ, 2009; CHMYROV, 2016; KOPPAL et al., 2022).

Existem dois tipos de supressão que exigem o contato direto entre o fluoróforo e o supressor (LAKOWICZ, 2006, LUIZ, 2009; GENOVESE et al., 2021):

- Quenching estático: ocorre pela formação de um complexo não fluorescente no estado fundamental entre o fluoróforo e o supressor.

- Quenching dinâmico (colisional): o supressor se difunde até o fluoróforo durante o tempo de vida do seu estado excitado, fazendo com que o fluoróforo retorne ao estado fundamental sem emitir um fóton.

Para o quenching dinâmico ou estático, avalia-se a intensidade de fluorescência, assim descrita pela equação de Stern-Volmer (KSV), que estabelece a seguinte relação:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_0 \cdot \tau_0 \cdot [Q] \quad (8)$$

$$K_{SV} = \tau_0 \cdot K_d \quad (9)$$

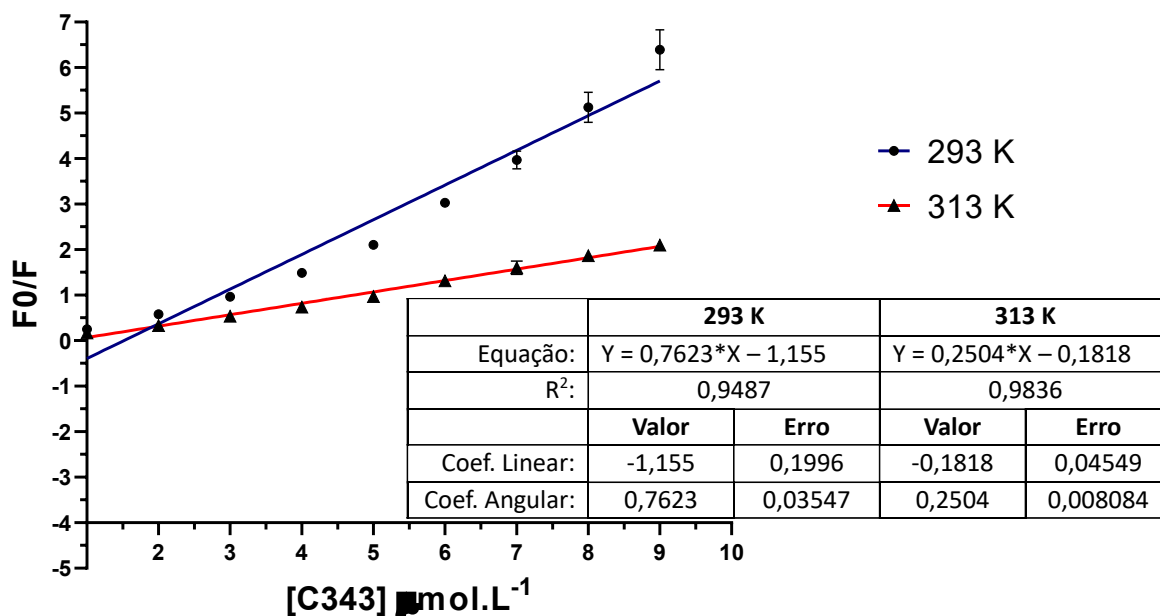
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \cdot [Q] = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad (10)$$

O *quenching* estático e dinâmico podem ser determinados pela relação entre os valores das constantes de ligação e da temperatura. No *quenching* estático os valores das constantes de ligação diminuem ao passo que a temperatura aumenta, isso se deve à redução na estabilidade do complexo com o aumento da temperatura. O inverso acontece no *quenching* dinâmico, em que as constantes de ligação aumentam conforme há o aumento da temperatura, devido ao aumento do número de colisões com o aumento da temperatura (BOLATTIN, *et al.*, 2016).

Com base nas informações mencionadas anteriormente, foram realizados estudos para determinar o valor da constante de Stern-Volmer, (K_{SV}), em duas temperaturas distintas (293 K e 313 K). Para isso, a partir dos valores de fluorescência obtidos experimentalmente, foi construído um gráfico de $\frac{F_0 - F}{F}$ em função da concentração do supressor ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), conforme ilustrado na Figura 9.

A partir desse gráfico, foram determinados os coeficientes linear e angular para cada temperatura analisada.

Figura 9 – Gráfico das constantes de Stern-Volmer (KSV) em diferentes temperaturas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Correlacionando os valores determinados dos coeficientes lineares e angulares com a Equação 10, é possível determinar o valor da constante de supressão bimolecular (K_q), pois a partir deste dado é possível averiguar a eficiência da supressão e a acessibilidade do fluoróforo ao supressor (LUIZ, 2009) e também os valores das constantes de Stern-Volmer (K_{SV}).

A Tabela 6 apresenta os resultados da constante de Stern-Volmer (K_{SV}), os valores da constante de supressão bimolecular (K_q), e o desvio médio quadrático. Observa-se que o aumento da temperatura resulta em uma diminuição de K_{SV} indicando um mecanismo de quenching estático, caracterizado pela formação de um complexo no estado fundamental. Além disso, o valor de K_q , permaneceu acima de $2 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, reforçando a natureza estática do processo. Por fim, o valor de R^2 próximo de 1 sugere a predominância de um único tipo de quenching.

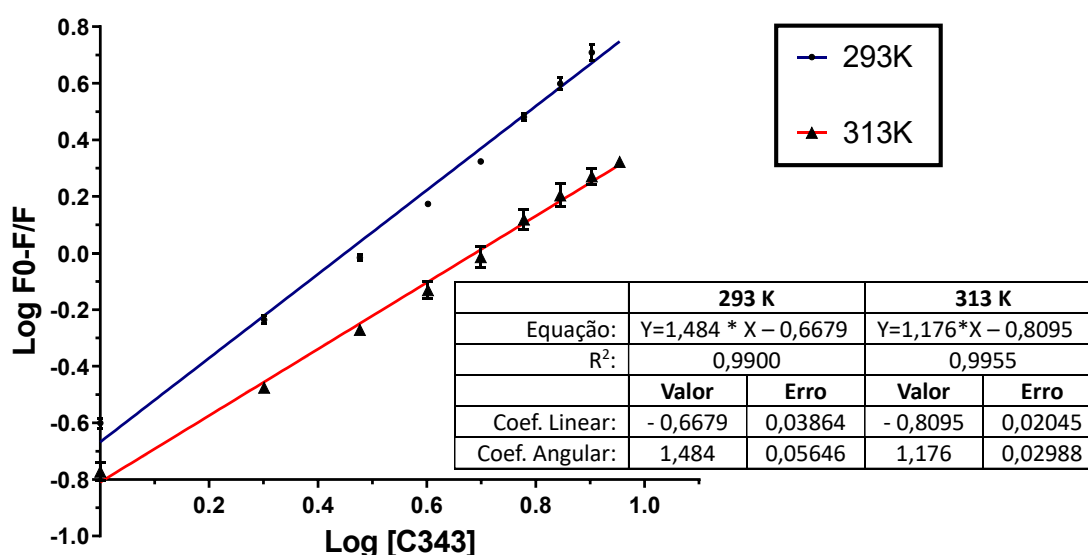
Tabela 6 – Valores das constantes de Stern-Volmer, constante de supressão bimolecular e o erro nas medições.

Temperatura (K)	K _{sv} (mol ⁻¹ .L)	K _q (mol ⁻¹ .L.s ⁻¹)	R ²
293	3,09 x 10 ⁵	3,09 x 10 ¹³	0,9903
	3,01 x 10 ⁵	3,01 x 10 ¹³	0,9925
	3,05 x 10 ⁵	3,05 x 10 ¹³	0,9926
313	1,57 x 10 ⁵	1,57 x 10 ¹³	0,9979
	1,52 x 10 ⁵	1,52 x 10 ¹³	0,9986
	1,37 x 10 ⁵	1,37 x 10 ¹³	0,9994

Fonte: Elaborado pela autora.

Com os valores dos eixos da abscissa e da ordenada na Figura 9, é possível estimar a constante de ligação e a estequiometria na formação do complexo proteína-ligante. Para isso, aplicou-se a função logarítmica aos eixos, resultando em $\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right)$ e $\log [C343]$ conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10 – Gráfico de $\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right)$ por $\log [C343]$ em diferentes temperaturas: 293 K (azul) e 313 K (vermelho).



Fonte: Elaborado pela autora.

As semirretas obtidas na Figura 10 foram utilizadas para determinar os coeficientes angular e linear, que, por sua vez, foram aplicados à equação de Stern-Volmer modificada (Equação 10). Nessa equação, o logaritmo de K_a corresponde ao coeficiente linear, enquanto o coeficiente angular representa o valor de n (EL GAMMAL et al., 2022).

Ao aplicar a Equação 8 para a temperatura de 293 K, o coeficiente linear de -0,6679 foi correlacionado com $\log(K_a)$, resultando em uma constante de associação de $0,2148 \text{ mol.L}^{-1}$. Esse valor está de acordo com o obtido por meio da Equação 1. Quanto ao coeficiente angular, n , obteve-se um valor de 1,484, indicando que a estequiometria na formação do complexo C343-HSA, nessa temperatura, é de aproximadamente 1,5:1.

Para a temperatura de 313 K, observou-se que o aumento da temperatura reduz a formação do complexo, sugerindo uma estequiometria de 1:1 entre a proteína e o ligante. Isso se deve ao fato de que, para essa temperatura, o coeficiente angular foi de 1,176. Além disso, a constante de ligação obtida foi $1,551 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$, um valor próximo ao reportado na Tabela 4 ($1,35 \pm 0,06 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$), indicando que temperaturas mais elevadas desfavorecem a formação do complexo.

Os estudos sobre a formação do complexo confirmaram que a C343 possui afinidade com a proteína HSA. Além disso, o processo ocorre de forma espontânea, libera calor, apresenta uma desordem mínima e é caracterizado por um mecanismo de *quenching estático*.

Com base nos resultados obtidos até o momento, foi possível prever que a estequiometria da formação do complexo C343-HSA, a 20°C, é de aproximadamente 1,5:1. Para validar essa informação, optou-se pela aplicação da metodologia de Job's Plot.

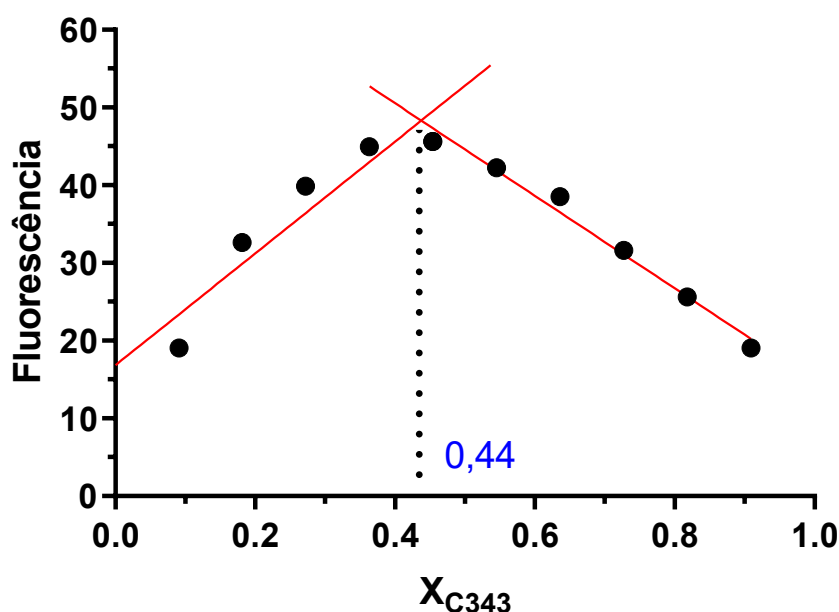
6.5 DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA PELO MÉTODO JOB'S PLOT

A metodologia de Job's Plot, utilizada neste estudo para determinar a estequiometria da interação entre a C343 e a proteína, segue o princípio da variação contínua. Nesse método, a concentração total de proteína e ligante é mantida constante, enquanto suas frações molares são ajustadas (HUANG, 1982; OSLON et al., 2011).

Assim, foram preparadas 10 amostras, variando a concentração de cumarina 343 de 10 a 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com adição de solução de HSA, cuja concentração variou de 1 a 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, resultando sempre em uma solução final com concentração de 11 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ conforme demonstrado na Tabela 1.

As soluções foram analisadas no espectrômetro de fluorescência e, em seguida, foi plotado um gráfico da emissão em função da fração molar de C343 (Figura 11). No gráfico, foram realizadas duas regressões lineares: uma para os valores crescentes e outra para os valores decrescentes.

Figura 11 – Gráfico de Job's plot.



Fonte: Elaborado pela autora.

A interseção das semirretas determinou um ponto correspondente à fração molar de cumarina 343 de 0,44. A estequiometria da formação do complexo proteína-ligante será calculada com base na proporção das frações molares nesse ponto (HUANG, 1982).

Para isso, utilizamos a Equação 11, que correlaciona a fração molar do ligante com a concentração do ligante complexado, dividida pela concentração inicial do ligante somada à concentração da proteína utilizada no experimento (11 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)

$$X_L = \frac{C_L}{C_L + C_P} \quad (11)$$

Sendo: X_L = fração molar do ligante (cumarina 343)

C_L = concentração molar do ligante (cumarina 343)

C_P = concentração molar da proteína (HSA)

Os cálculos indicam que a afinidade estequiométrica entre C343 e HSA apresenta uma correspondência quantitativa. Assim, são necessários $0,616 \text{ mol.L}^{-1}$ de proteína para se complexar com $0,484 \text{ mol.L}^{-1}$ de cumarina, o que sugere uma proporção de 1:1,27.

Com a estequiometria estabelecida, foi determinado o sítio de afinidade da cumarina, além de identificar o sítio preferencial, caso existam múltiplos locais de interação. Para este estudo, utilizou-se a metodologia de competição de sítios, empregando fármacos específicos para cada sítio de ligação.

6.6 DETERMINAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO NA HSA – MÉTODO DE COMPETIÇÃO DE SÍTIOS

A determinação do sítio preferencial na proteína é crucial para entender o local da interação, pois os sítios de ligação fornecem informações importantes sobre o transporte e metabolismo de moléculas no corpo humano. Esses dados podem influenciar a farmacocinética e/ou o modo de ação das substâncias, podendo estar relacionados ao surgimento de efeitos colaterais indesejados ou à redução de toxicidade (GUIZADO, 2008; SANCHES, 2016; YOGUIM, 2021).

Os estudos de competição de sítios utilizam fármacos específicos amplamente conhecidos na literatura. Para este procedimento, foi mantida a concentração constante de C343, enquanto as concentrações de proteína HSA e dos fármacos foram variáveis.

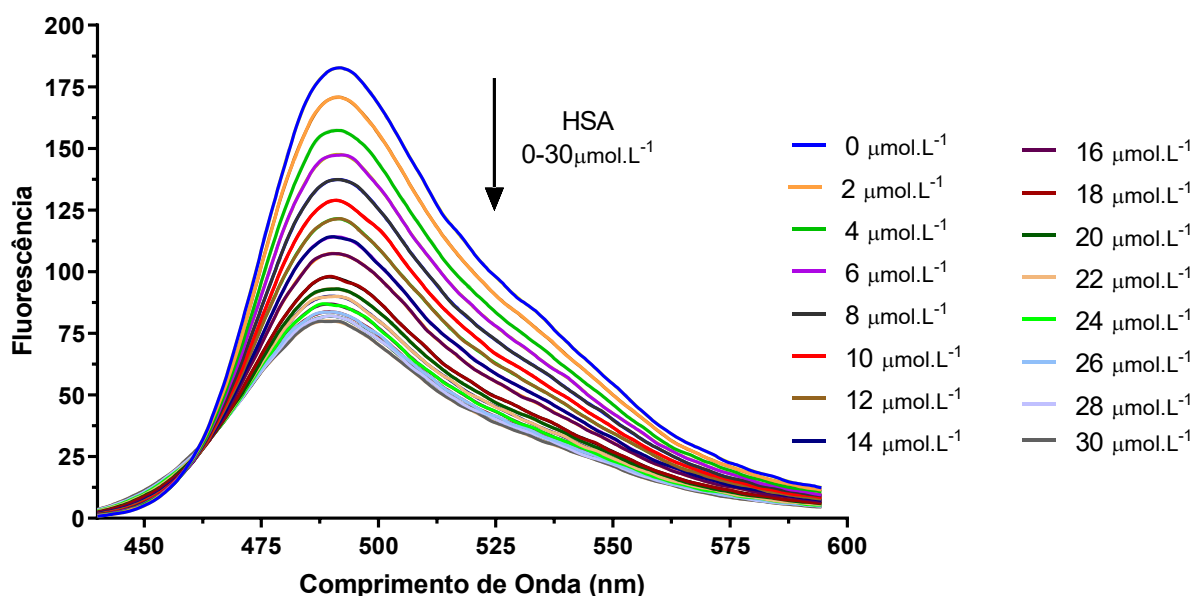
6.6.1 Estudos da formação do complexo proteína-ligante com [HSA] variando e [C343] constante.

Neste experimento, foi adotado um protocolo variante do descrito na Seção 4.1, com a modificação nas concentrações do ligante e da proteína. Para a realização do experimento, manteve-se uma concentração fixa de C343, enquanto a solução de HSA foi adicionada de forma titulada.

Na Figura 12, estão apresentados os espectros de fluorescência das análises das amostras, que foram excitadas a 340 nm, com emissão a 480 nm, em uma varredura de 400 a 600 nm. Essa abordagem se justifica pelo fato de a análise focar no ligante, e não na proteína, conforme realizado na Seção 4.1

Os espectros observados apresentam um comportamento semelhante ao experimento de formação do complexo, evidenciado pela supressão da fluorescência, o que indica a interação da sonda com a proteína.

Figura 12 – Espectro de fluorescência na C343 com a titulação de HSA.

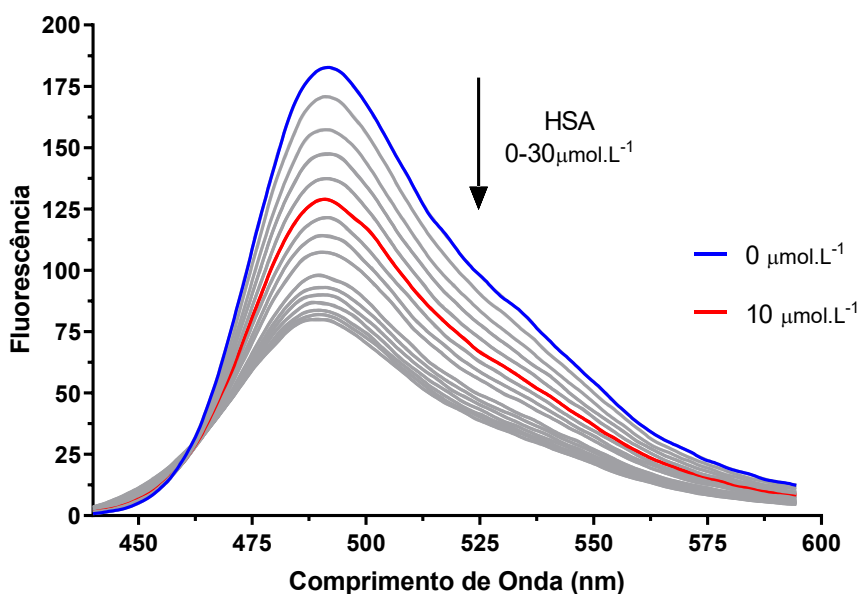


Fonte: Elaborado pela autora.

Ao analisar os espectros da Figura 12, nota-se que, na proporção estequiométrica 1:1 entre proteína e ligante, ocorre um decaimento significativo da fluorescência, como ilustrado na Figura 13. Essa característica é relevante e será útil

para compreender melhor o comportamento da C343 na proteína HSA, especialmente na presença de fármacos.

Figura 13 – Espectros de fluorescência de C343 (azul) e do complexo C343+HSA (vermelho) de mesma concentração ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$).



Fonte: Elaborado pela autora.

Antes de prosseguir com os experimentos de competição de sítios, foi necessário verificar se os fármacos escolhidos (varfarina, ibuprofeno e digitoxina) interfeririam nos resultados de fluorescência. Para isso, foram realizados protocolos para investigar essa possibilidade.

6.6.2 Estudo da interferência dos fármacos e C343

Nos estudos de competição de sítios, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro de fluorescência com excitação a 340 nm, emissão a 480 nm e varredura no intervalo de 400 a 600 nm. Para garantir a precisão dos resultados, foi necessário verificar se os fármacos varfarina, ibuprofeno e digitoxina, utilizados neste estudo, causariam interferências na faixa de comprimento de onda entre 400 e 600 nm.

De acordo com a literatura, os fármacos escolhidos não apresentam interferência nos estudos de competição de sítios, conforme indicado na Tabela 7. As

regiões de excitação e emissão dos fármacos complexados à proteína HSA estão localizadas entre 280 e 372 nm, uma faixa distinta da utilizada nas etapas subsequentes, relacionadas à formação do complexo C343-HSA.

Tabela 7 – Valores do comprimento de onda de excitação e emissão dos fármacos varfarina, ibuprofeno e digitoxina.

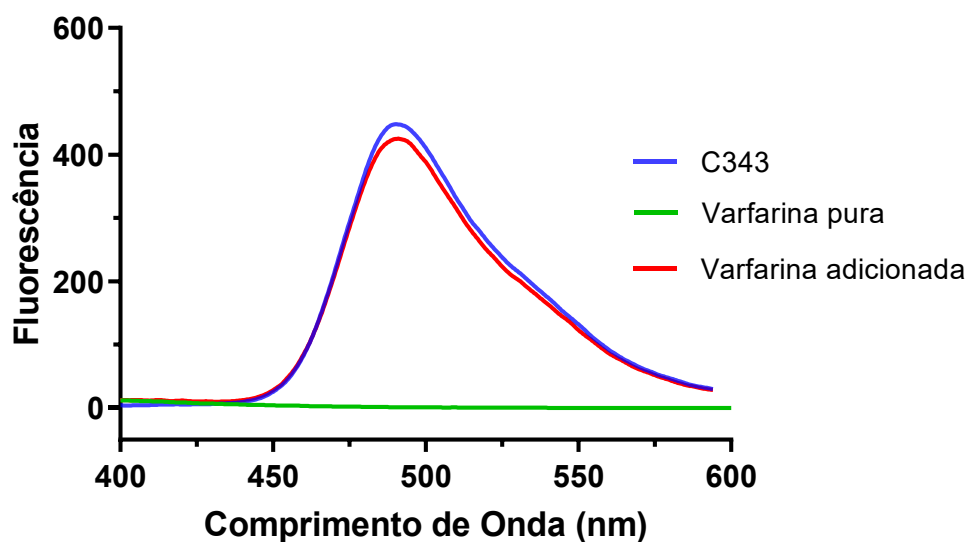
	λ Excitação (nm)	λ Emissão (nm)	Referência
Varfarina + HSA	320	372	RUSSELL <i>et al.</i> , 2016
Ibuprofeno + HSA	280	340	CVIJETC <i>et al.</i> , 2014
Digitoxina + HSA	280	340	CVIJETC <i>et al.</i> , 2014

Fonte: Elaborado pela autora.

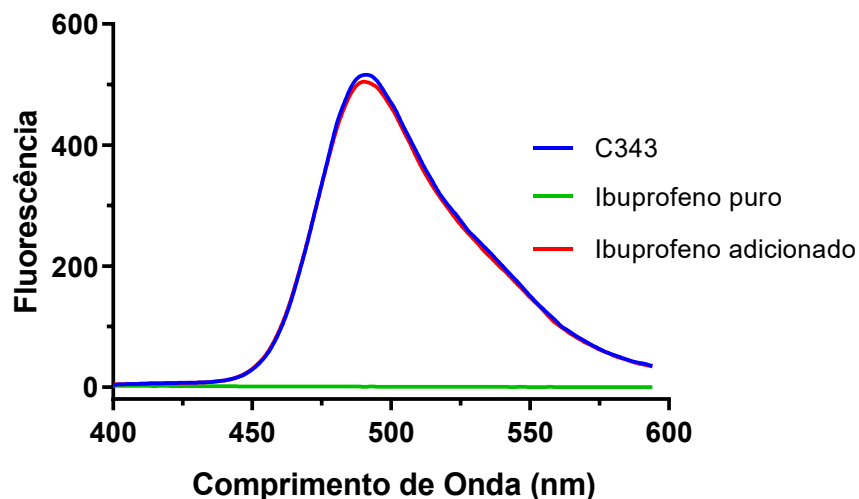
Para cada fármaco, foram realizadas três análises de fluorescência: uma para a solução de cumarina, outra para a solução contendo apenas o fármaco, e, por fim, para a solução de cumarina na presença do fármaco, conforme ilustrado na Figura 14.

Figura 14 – Espectros de fluorescência das análises da interferência dos fármacos:
a) varfarina, b) ibuprofeno, c) digitoxina.

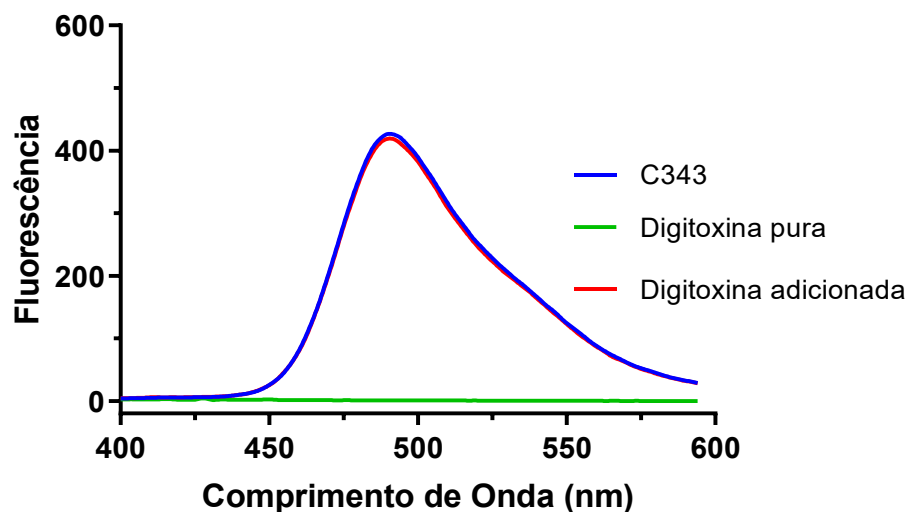
a)



b)



c)



Fonte: Elaborado pela autora.

As análises dos gráficos da Figura 14 confirmam as informações obtidas nos estudos da literatura, reforçando que, na faixa de 400 a 600 nm, os fármacos utilizados nos estudos de competição de sítios não causam interferência.

Os resultados deste estudo foram cruciais para dar continuidade aos experimentos. Sabendo que a presença dos fármacos não afetou os resultados de fluorescência relacionados à formação do complexo entre cumarina e HSA, foi possível analisar os dados com maior exatidão e precisão.

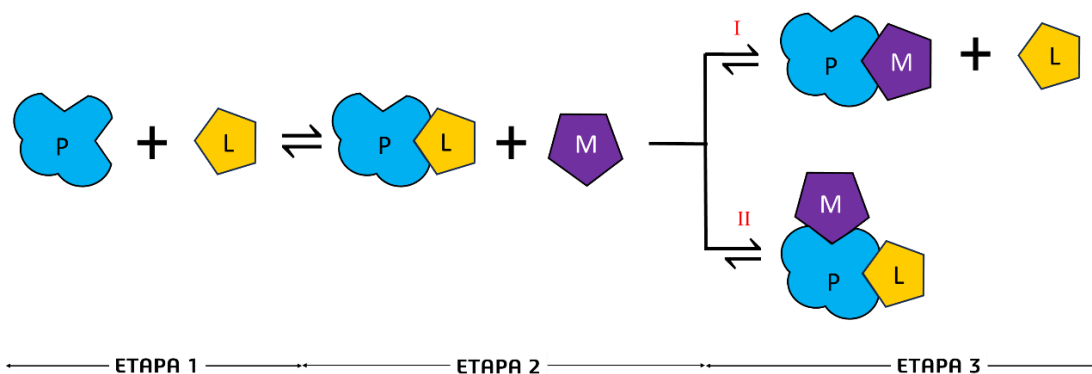
6.6.3 Competição de sítios

Para determinar o sítio preferencial da C343 na HSA, foi utilizado o método de competição de sítios. A metodologia deste experimento inicia-se com a análise de uma solução contendo o ligante e a proteína. Em seguida, essa solução recebe adições graduais dos fármacos específicos para os sítios I (varfarina), II (ibuprofeno) e III (digitoxina), que funcionam como marcadores dos sítios específicos da proteína HSA, com base em dados amplamente estabelecidos na literatura.

A esquematização deste procedimento está ilustrada na Figura 15. Inicialmente, a proteína HSA livre interage com a C343, também livre, resultando na formação do complexo C343-HSA. Esse processo ocorre em um estado de equilíbrio, onde existem tanto ligantes e proteínas livres quanto a C343 interagindo com a HSA.

A seguir, a adição do marcador específico para cada sítio pode ou não interferir no processo de complexação. No Caminho I da Etapa 3, observa-se uma competição entre o marcador e o ligante pelo sítio, o que resulta em uma alteração nos espectros de fluorescência. No Caminho II da Etapa 3, por outro lado, o marcador não interfere na interação entre a cumarina e a proteína, pois se liga a uma região diferente do ligante.

Figura 15 – Mecanismo de competição de sítio com os possíveis caminhos, sendo P = proteína, L = ligante e M = marcador.



Fonte: Elaborado pela autora.

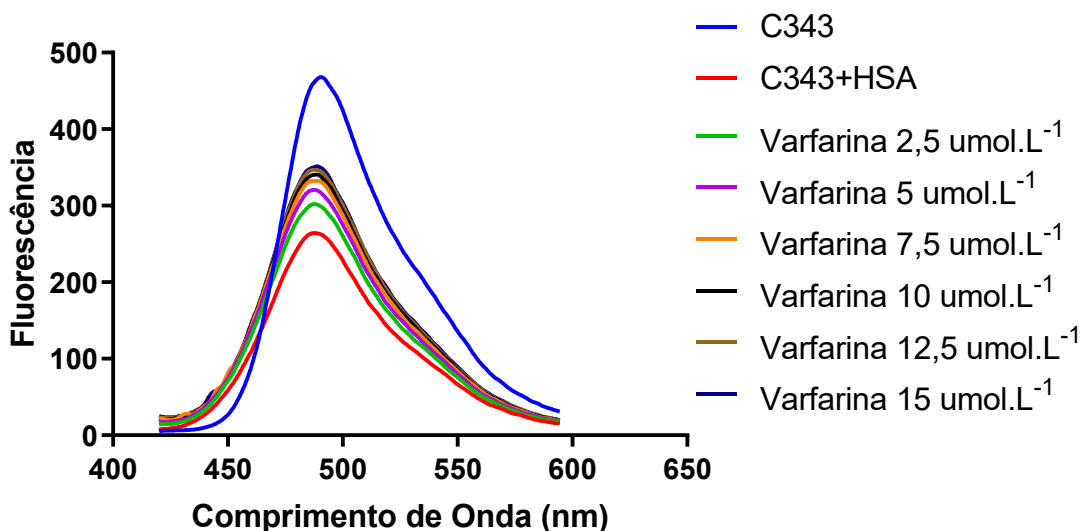
Assim, a influência do fármaco na formação do complexo será avaliada com base no comportamento dos espectros de fluorescência em cada etapa do processo, sendo comparados aos espectros previamente obtidos para a cumarina 343, tanto na forma livre quanto complexada.

6.6.4 Competição de sítio utilizando Varfarina

O sítio I da proteína HSA está localizado no subdomínio IIA. Esse sítio foi estudado e caracterizado por Sudlow, que o denominou como sítio da varfarina (CHAVES et al., 2018).

A Figura 16 apresenta os espectros de fluorescência do experimento de competição no sítio DS1, utilizando a varfarina. Podemos observar que, ao adicionar varfarina em uma concentração de $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (coloração esverdeada), o espectro de fluorescência exibiu um aumento hipercrômico em relação ao espectro do complexo C343+HSA.

Figura 16 – Espectros de fluorescência da C343 com adições de proteína e varfarina.



Fonte: Elaborado pela autora.

Esse resultado indica que a presença da varfarina reduz a concentração do complexo C343+HSA, aumentando a quantidade de C343 livre, devido ao equilíbrio do sistema. Assim, podemos afirmar que há uma competição entre a C343 e a

varfarina pela interação com o sítio DS1 da proteína HSA.

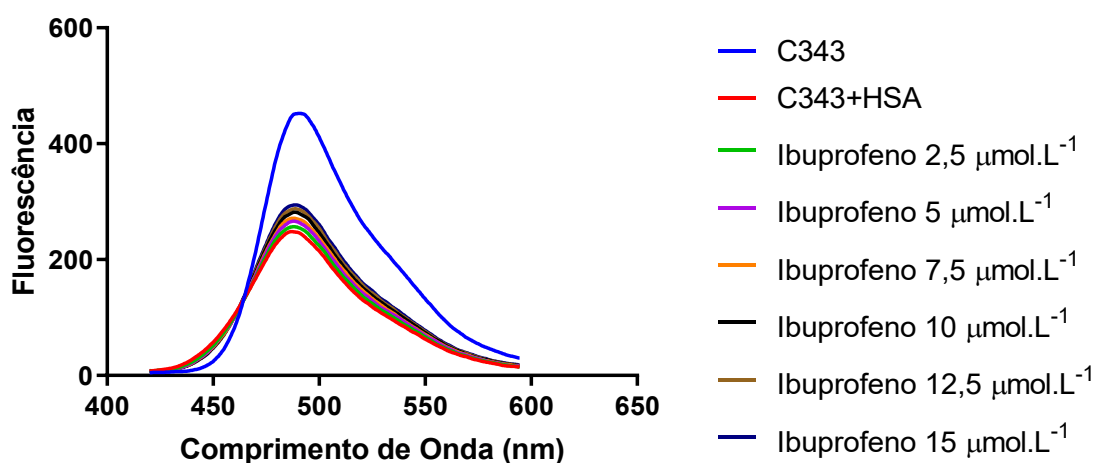
Além disso, observamos que o aumento da concentração de varfarina na solução leva a um estado de saturação, indicando que nem toda a C343 complexada será deslocada para a forma livre. Mesmo quando a concentração de varfarina supera a de C343, o deslocamento completo do ligante complexado para a forma livre não ocorre.

Diante desse comportamento, podemos sugerir que a C343 possui afinidade pelo sítio DS1 da proteína HSA. Isso é evidenciado pelo aumento do espectro de fluorescência, que reflete a elevação da fração de C343 livre e, consequentemente, a redução da concentração do complexo C343-HSA.

6.6.5 Competição de sítio utilizando Ibuprofeno

Após a caracterização dos sítios DS1 e DS2 por Sudlow, os estudo de Ploch-Jankowska (2021), indica que o ibuprofeno apresenta afinidade pelo sítio DS2, localizado no subdomínio IIIA da proteína HSA. A Figura 17 mostra que a adição de ibuprofeno ao complexo C343-HSA resulta em espectros de fluorescência semelhantes aos obtidos no experimento com varfarina, porém com um aumento de fluorescência menos intenso.

Figura 17 – Espectros de Fluorescência da C343 com adições de proteína e Ibuprofeno.



Fonte: Elaborado pela autora.

Quando o ibuprofeno foi adicionado à solução em uma concentração de $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, observou-se um deslocamento hipercrômico no espectro de fluorescência em comparação ao espectro do complexo, indicando que a presença do ibuprofeno reduz a concentração da C343 complexada à proteína HSA, aumentando, assim, a fração de C343 livre.

Além disso, verificou-se um estado de saturação semelhante ao observado no experimento com varfarina, sugerindo que, mesmo em altas concentrações, o ibuprofeno não é capaz de deslocar completamente a C343 complexada para a forma livre. Observamos também que os espectros apresentam menor desvio em relação ao espectro do complexo, indicando que o ibuprofeno promove um deslocamento menos intenso da C343 da proteína HSA. Assim, esses resultados confirmam que o a C343 também interage com o DS2, o mesmo do ibuprofeno, com menor intensidade.

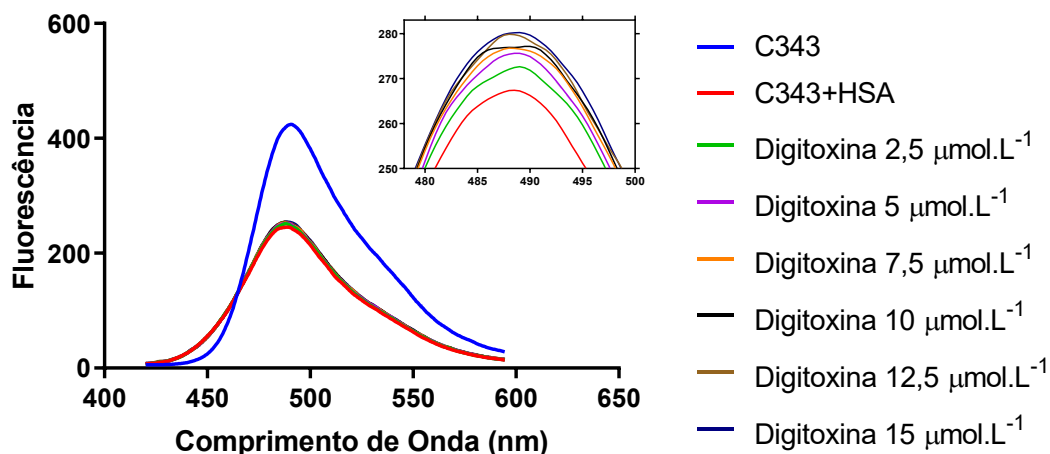
Portanto, a análise do gráfico permite concluir que a presença de ibuprofeno desloca o equilíbrio químico para a formação de C343 e proteína livres, reduzindo a formação do complexo e demonstrando que a cumarina 343 possui afinidade pelo sítio DS2.

6.6.6 Competição de sítio utilizando Digitoxina

A digitoxina apresenta afinidade pelo sítio DS3 da proteína HSA, localizado no subdomínio IB. Esse fármaco foi utilizado para investigar se a C343 (C343) interage com essa região.

Na Figura 18, observamos que os espectros de fluorescência não apresentaram um aumento significativo da emissão ao adicionarmos a digitoxina, sugerindo uma menor afinidade da C343 por esse sítio.

Figura 18 – Espectros de fluorescência da C343 nas adições de proteína e digitoxina com a imagem do zoom dado no pico do espectro.



Fonte: Elaborado pela autora.

No entanto, ao ampliarmos a região correspondente aos pontos máximos dos espectros, notamos um pequeno aumento na fluorescência. Ainda assim, esse aumento é consideravelmente menor quando comparado aos obtidos nas adições de varfarina e ibuprofeno. Esses resultados indicam que a C343 pode apresentar uma leve afinidade pelo sítio DS3, embora essa interação seja menos expressiva.

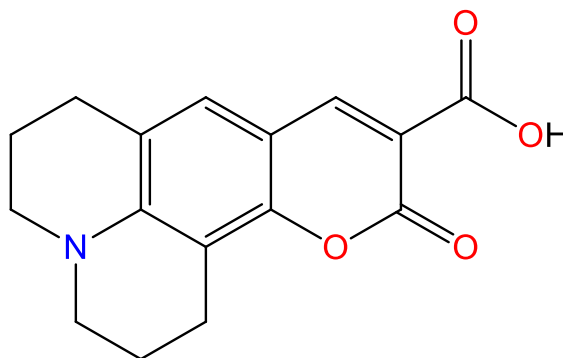
As análises dos espectros de fluorescência indicam que a C343 possui afinidade pelos sítios DS1 e DS2 da proteína HSA, enquanto sua afinidade pelo sítio DS3 é menor. No entanto, ao analisar os espectros obtidos com a adição de varfarina e ibuprofeno, podemos concluir que a C343 possui um sítio preferencial de interação, sendo este o DS1.

6.7 DICROÍSMO CIRCULAR

O dicróismo circular permite a identificação da configuração absoluta de moléculas quirais, isto é, a disposição espacial dos átomos numa molécula e seus enantiômeros (moléculas não sobreponíveis) com base no desvio da luz circularmente polarizada. Quando um ligante se complexa com uma proteína, ele pode adquirir uma quiralidade induzida pelo ambiente proteico, mesmo que, em sua forma livre, não possua átomos quirais (AUTSCHBACH et al., 2002; SOUZA et al., 2019).

Essa indução é facilmente observada em um espectro de dicroísmo circular (CD) e é denominada quiralidade induzida. Esse efeito pode ser atribuído, principalmente, à atividade óptica da molécula, induzida pela sua inclusão em uma cavidade quiral. Esse fenômeno é frequentemente observado em fármacos que interagem com proteínas (AUTSCHBACH et al., 2002; SOUZA et al., 2019; VASCONCELOS, 2019).

Figura 19 – Estrutura da Cumarina 343 bidimensional.



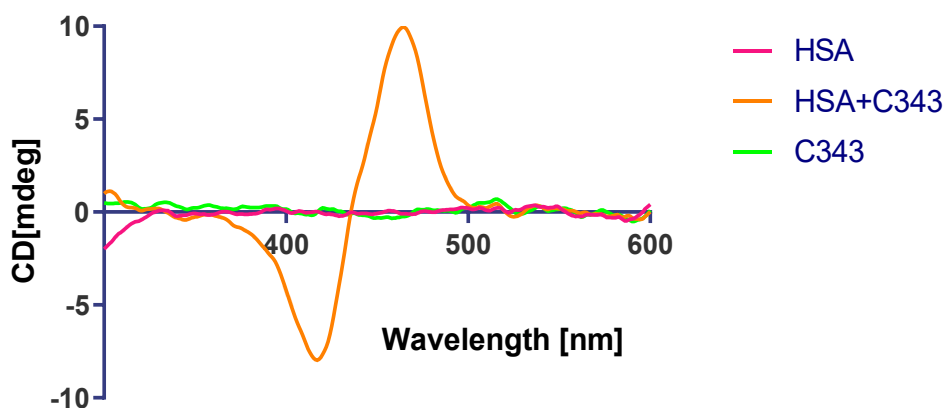
Fonte: Modificado de PubChem (2025). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/108770>. Acesso em: 8 abr 2025.

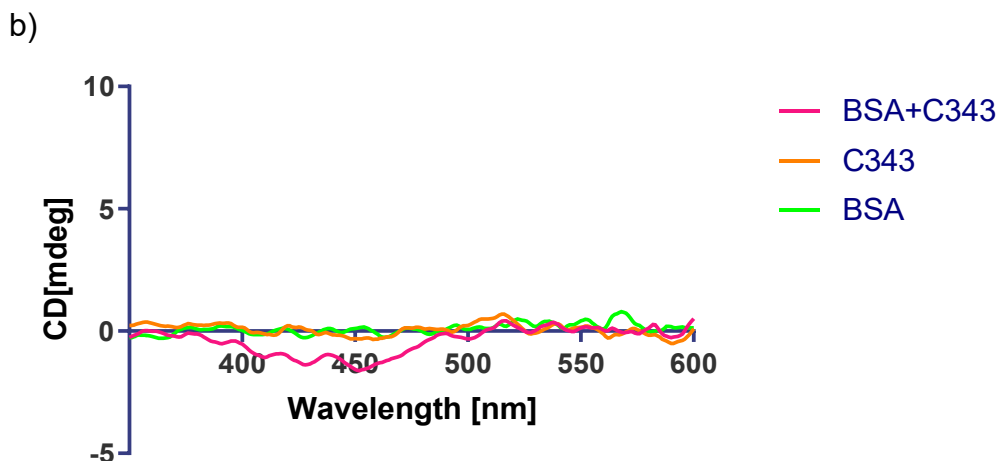
Conforme demonstrado na Figura 19, a C343 não é uma molécula opticamente ativa, uma vez que sua estrutura não contém carbonos quirais (SOUZA et al., 2019). Dessa forma, a análise dos espectros da Figura 20 mostra que a C343 não apresenta sinal de ECD, o que indica a ausência de quiralidade, conforme previsto.

Figura 20 – Espectros de ECD de C343 livre, proteína livre e C343 + proteína:

a) Proteína HSA., b) Proteína BSA.

a)





Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 20a, observamos que o ECD da proteína HSA apresenta duas bandas associadas ao efeito cotton negativa com intensidades aproximadamente iguais. A primeira está localizada em 222 nm, atribuída à transição $n \rightarrow \pi^*$ e a segunda, próxima de 208 nm, relacionada à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ dos grupos amidas (HAVEL, 1995; MOREIRA, 2016).

Ainda na mesma Figura 20a, ao analisar o espectro referente à presença de C343 e HSA, podemos observar a formação de duas bandas: uma negativa (efeito cotton) em 419 nm e uma positiva em 466 nm. Esses resultados indicam que o ligante apresenta afinidade pela proteína estudada.

Nos estudos de dicroísmo circular, confirmamos que a C343 apresenta afinidade pela estrutura da proteína HSA. Contudo, durante o desenvolvimento deste experimento, surgiu a questão sobre a possibilidade de esse mesmo comportamento ser observado em outra estrutura proteica, como a BSA. A escolha da BSA baseia-se no fato de que, na literatura, há evidências que sugerem uma grande semelhança estrutural entre a BSA e a HSA. Por essa razão, muitos estudos utilizam a BSA como modelo para a HSA (NETO, 2021).

Na Figura 20b, são apresentados os resultados experimentais para o complexo C343-BSA. Observamos que o comportamento da BSA difere do observado para a proteína humana (Figura 20a).

O espectro de ECD referente ao complexo C343 + BSA exibe uma banda de efeito cotton negativa de baixa intensidade, o que sugere que, neste experimento, não houve um sinal de ECD significativo.

A análise dos espectros evidencia um forte sinal de interação entre a

proteína HSA e a C343, indicando a formação de um complexo estável. Essa diferença de sinal entre os complexos HSA-C343 e BSA-C343 sugere que o comportamento de alguns ligantes na estrutura da HSA do soro humano pode não ser análogo ao comportamento da proteína BSA.

Portanto, os resultados dos ensaios laboratoriais realizados até o momento indicam que existe interação entre a C343 e a proteína HSA, com a formação do complexo apresentando afinidade pelos sítios DS1, DS2 e DS3. Também foi observado que, nos estudos de dicroísmo circular induzido (ECD), há uma grande diferença nos espectros da C343 na presença de HSA em comparação à BSA.

Dado o interesse e a complexidade desses resultados, foi necessário aprofundar a compreensão dos mesmos. Para isso, foram empregados recursos computacionais, como o *docking* molecular e a Teoria do Funcional da Densidade (DFT). Com base nesses métodos, foram criados inputs com as coordenadas XYZ e realizados cálculos que resultaram em um ECD da C343 com a HSA muito semelhante ao observado experimentalmente, o mesmo ocorreu com a BSA e C343, em que o sinal foi semelhante ao experimental.

6.8 ESTUDOS DE *DOCKING* MOLECULAR

Os estudos de *docking* molecular permitem prever a afinidade de ligação entre ligantes e proteínas receptoras. Essa técnica computacional é amplamente utilizada na identificação de potenciais candidatos a medicamentos, pois prevê a afinidade de pequenas moléculas por uma proteína ou receptor de interesse (AGU et al., 2023).

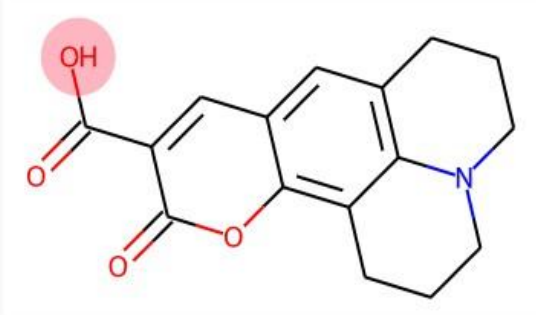
Assim a metodologia de *docking* pode ser aplicada para identificar e rastrear dados de pequenas moléculas com potencial afinidade por uma proteína específica (AGU et al., 2023). Com base nisso, foram realizados estudos de *docking* molecular entre a C343 e as proteínas HSA e BSA.

A estrutura da C343 foi construída no software GaussView 6.0. No entanto, antes dessa etapa, foi necessário determinar se a estrutura do ligante estava protonada ou desprotonada. Com o auxílio do site MolGpKa, verificou-se que o valor de pKa para a hidroxila da carbonila é 1,7, conforme mostrado na Figura 21.

Os parâmetros adotados nos estudos computacionais tem o intuito de

refletir as condições dos experimentos laboratoriais. Como as soluções de C343 utilizadas nos experimentos foram preparadas em um pH de 7,0, a estrutura escolhida para os estudos de *docking* molecular foi a desprotonada.

Figura 21 – Valor de pKa da estrutura cumarina 343 obtida no site MolGpKa.

Index	Mol	acid_or_base	pKa
000		Acid	1.7

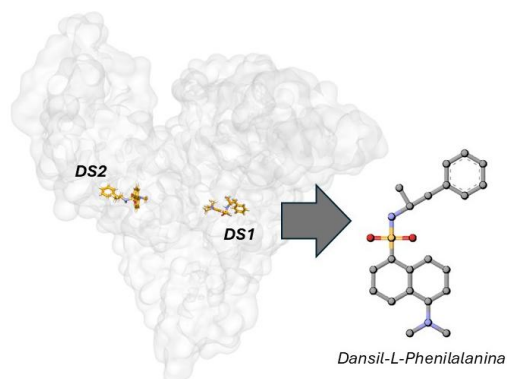
Fonte: Elaborado pela autora

O critério de assemelhar as condições laboratoriais adotadas para o ligante também foi aplicado na seleção das estruturas cristalográficas das proteínas HSA e BSA. Dessa forma, as estruturas escolhidas no Protein Data Bank deveriam conter apenas a proteína e o ligante, sem a presença de outros componentes, como íons, ácidos graxos, metais, entre outros. Assim, as estruturas selecionadas para este estudo foram 2XW0 e 2BX8 para a HSA, e 4OR0 para a BSA (Figura 22).

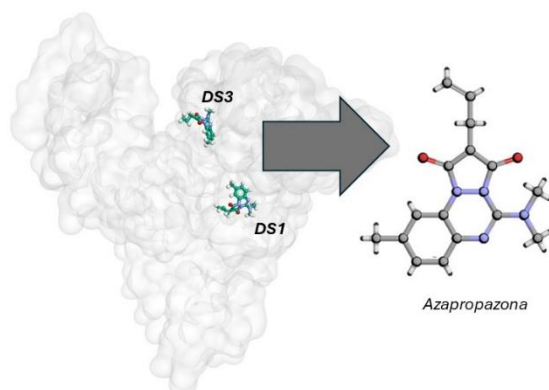
Figura 22 – Estruturas cristalográficas da proteína HSA com os seus respectivos ligantes obtidas no PDB:

- a) 2XW0 com o ligante dansil-L-fenilalanina, b) 2BX8 com o ligante azapropazona, c) 4OR0 com o ligante naproxeno.

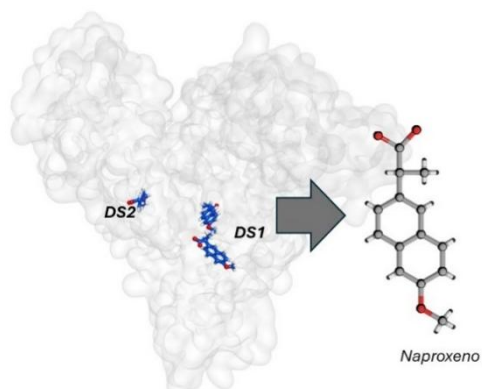
a)



b)



c)



Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 22, observa-se que o PDB 2XW0 contém o ligante dansil-L-fenilalanina nos sítios DS1 e DS2, localizados nos subdomínios IIA e IIIA da proteína HSA. Já o PDB 2BX8 apresenta o ligante azapropazona nos sítios DS3 e DS1, situados nos subdomínios IB e IIIA da mesma proteína. Na BSA, o ligante naproxeno está presente nos sítios DS1 e DS2, posicionados nos subdomínios IIA e IIIA.

Antes de realizar os estudos de *docking* molecular, foi necessário verificar a semelhança entre as estruturas, a fim de viabilizar análises comparativas entre elas.

6.8.1 Análise das estruturas cristalográficas da proteína albumina do soro humano, HSA.

A Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio (RMSD) é uma das metodologias mais utilizadas para avaliar a similaridade estrutural entre duas conformações de uma mesma molécula. O cálculo envolve duas etapas principais: alinhamento e superposição (COUTSIAS et al., 2004; COUTSIAS et al., 2019).

O alinhamento consiste em estabelecer uma correspondência um a um entre átomos equivalentes nas duas conformações. Já a superposição é determinada por meio de rotações e translações da estrutura, de forma a minimizar a soma ponderada dos quadrados das distâncias entre os átomos equivalentes (COUTSIAS et al., 2004; LIU et al., 2009; LIU et al., 2022; COUTSIAS et al., 2019).

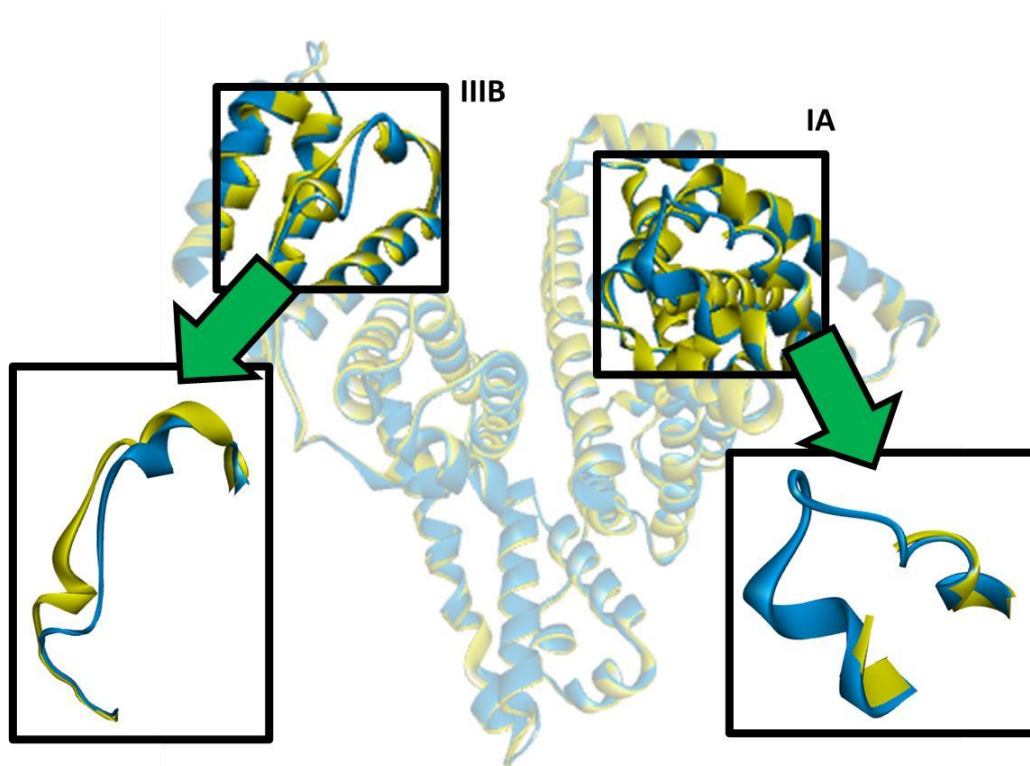
Como a metodologia de RMSD utiliza o mapeamento das estruturas cristalográficas das proteínas estudadas, o valor obtido representa o percentual de equivalência estrutural. Para que as estruturas sejam consideradas homólogas, esse valor deve ser menor ou igual a 3,0 Å (KUFAREVA et al., 2012; SI et al., 2020).

Dessa forma, comparamos as estruturas cristalográficas 2XW0 e 2BX8 para garantir que os resultados de *docking* fossem comparáveis. A sobreposição das alfas helices foi realizada no software DS, resultando em um RMSD igual a zero, o que indica total semelhança entre as estruturas.

Na Figura 23, observa-se que a estrutura 2BX8 (azul) está completamente sobreposta à estrutura 2XW0 (amarelo), confirmando o alto grau de semelhança entre os PDBs. No entanto, ao analisar com mais atenção, nota-se que, na região do subdomínio IA do 2XW0, há diferenças na estrutura do carbono-alfa. Além disso, no subdomínio IIIB, algumas folhas-beta desse PDB não estão sobrepostas à estrutura do 2BX8.

Essa análise não foi necessária para o *docking* na BSA, pois foi utilizado um único PDB.

Figura 23 – Sobreposição das estruturas cristalográficas PDB 2XW0 e 2BX8 da proteína HSA obtidas no software DS.



Fonte: Elaborado pela autora.

Como o valor de RMSD obtido no software DS foi igual a zero, tornou-se necessário verificar essa informação. Para isso, utilizamos o software Chimera 1.17.1, que permite uma análise mais detalhada da comparação estrutural, especialmente em relação à sequência de aminoácidos das estruturas cristalográficas.

Na Figura 24, é possível observar e comparar as cadeias de aminoácidos das duas proteínas, confirmando a semelhança entre as estruturas dos PDBs 2XW0 e 2BX8. No entanto, identificou-se uma falha estrutural no 2XW0. Para melhor visualização foi dado um zoom na sobreposição dos aminoácidos.

Na estrutura cristalográfica do 2XW0, há a ausência dos seguintes aminoácidos: treonina-79, leucina-80, arginina-81, ácido glutâmico-82, treonina-83, tirosina-84, glicina-85, ácido glutâmico-86 e metionina-87. Além disso, verificou-se uma diferença estrutural nos aminoácidos ácido glutâmico-505, treonina-506,

fenilalanina-507 e treonina-508.

Figura 24 – Fila de aminoácidos das estruturas PDB 2BXE e 2BX8 obtidas no software Chimera.

	1	11	21	31	41		
RMSD: ca							
2bx8.pdb, chain A	1	DAHK	SE	VAHRFKDLGE	ENFKALVLIA	FAQYLQQCPF	EDHVKLVNEV
2xw0.pdb, chain A	1	DAHK	SE	VAHRFKDLGE	ENFKALVLIA	FAQYLQQCPF	EDHVKLVNEV
	51	61	71	81	91		
RMSD: ca							
2bx8.pdb, chain A	47	TEFAKTCVAD	ESAENCDKSL	HTLFGDKLCT	VATLRETYGE	M	TLRETYGEM
2xw0.pdb, chain A	47	TEFAKTCVAD	ESAENCDKSL	HTLFGDKLCT	VA	TLRETYGEM	
	101	111	121	131	141		
RMSD: ca							
2bx8.pdb, chain A	88	ADCCAKQEPE	RNECFLQHKD	DNPNLPLRLVR	PEVDVMCTAF	HDNEETFLKK	
2xw0.pdb, chain A	88	ADCCAKQEPE	RNECFLQHKD	DNPNLPLRLVR	PEVDVMCTAF	HDNEETFLKK	
	151	161	171	181	191		
RMSD: ca							
2bx8.pdb, chain A	138	YLYEIAARRHP	YFYAPELLFF	AKRYKAAFT	CCQAADKAAC	LLPKLDELRLD	
2xw0.pdb, chain A	138	YLYEIAARRHP	YFYAPELLFF	AKRYKAAFT	CCQAADKAAC	LLPKLDELRLD	
	201	211	221	231	241		
RMSD: ca							
2bx8.pdb, chain A	188	EGKASSAKQR	LKCASLQKFG	ERAFKAWAVA	RLSQRFPKAE	FAEVSKLVTD	
2xw0.pdb, chain A	188	EGKASSAKQR	LKCASLQKFG	ERAFKAWAVA	RLSQRFPKAE	FAEVSKLVTD	
	251	261	271	281	291		
RMSD: ca							
2bx8.pdb, chain A	238	LTKVHTECCH	GDLLECADDR	ADLAKYICEN	QDSISSKLKE	CCEKPLLEKS	
2xw0.pdb, chain A	238	LTKVHTECCH	GDLLECADDR	ADLAKYICEN	QDSISSKLKE	CCEKPLLEKS	
	301	311	321	331	341		
RMSD: ca							
2bx8.pdb, chain A	288	HCIAEVENDE	MPADLPSLAA	DFVESKDVCK	NYAEAKDVFL	GMFLYEYARR	
2xw0.pdb, chain A	288	HCIAEVENDE	MPADLPSLAA	DFVESKDVCK	NYAEAKDVFL	GMFLYEYARR	
	351	361	371	381	391		
RMSD: ca							
2bx8.pdb, chain A	338	HPDYSVVL	RLAKTYETTL	EKCCAAADPH	ECYAKVFDEF	KPLVEEPQNL	
2xw0.pdb, chain A	338	HPDYSVVL	RLAKTYETTL	EKCCAAADPH	ECYAKVFDEF	KPLVEEPQNL	
	401	411	421	431	441		
RMSD: ca							
2bx8.pdb, chain A	388	IKQNCELFEQ	LGEYKFQNAL	LVRYTKKVPQ	VSTPTLVEVS	RNLGKVGSKC	
2xw0.pdb, chain A	388	IKQNCELFEQ	LGEYKFQNAL	LVRYTKKVPQ	VSTPTLVEVS	RNLGKVGSKC	
	451	461	471	481	491		
RMSD: ca							
2bx8.pdb, chain A	438	CKHPEAKRMP	CAEDYLSVVL	NQLCVLHEKT	PVSDRVTKCC	TESLVNRRPC	
2xw0.pdb, chain A	438	CKHPEAKRMP	CAEDYLSVVL	NQLCVLHEKT	PVSDRVTKCC	TESLVNRRPC	
	501	511	521	531	541		
RMSD: ca							
2bx8.pdb, chain A	488	FSALEVDETY	VPKEFNAE	TFHADICTL	SEKERQIKKQ	TALVELVKHK	
2xw0.pdb, chain A	488	FSALEVDETY	VPKEFNAE	TFHADICTL	SEKERQIKKQ	TALVELVKHK	
	551	561	571	581	591		
RMSD: ca							
2bx8.pdb, chain A	537	PKATKEQLKA	VMDDFAAFVE	KCKKADDKET	CFAEEGKKLV	AASQAA	LGL
2xw0.pdb, chain A	537	PKATKEQLKA	VMDDFAAFVE	KCKKADDKET	CFAEEGKKLV	AASQAA	LGL
	601						
RMSD: ca							
2bx8.pdb, chain A	585						
2xw0.pdb, chain A	584	GL					

Fonte: Elaborado pela autora.

Após a confirmação da semelhança entre os PDBs, estes foram selecionados para os estudos de *docking* molecular. O processo foi iniciado com o *redocking*, etapa fundamental para validar a escolha das estruturas cristalográficas e assegurar sua adequação aos cálculos subsequentes de *docking* molecular.

6.8.2 Estudos de *redocking* molecular

Os estudos de *redocking* têm como objetivo avaliar a precisão dos cálculos no processo de *docking*. Esse método de validação consiste em recriar a posição original do ligante no receptor, permitindo verificar a capacidade do algoritmo de encontrar uma pose ou conformação semelhante à experimental (MALEEV et al., 2022; BASTOS, 2023).

Os resultados dos estudos de *redocking* para os PDBs 2XW0, 2BX8 e 4OR0 demonstraram que o software GOLD foi eficaz na realocação do ligante dentro da estrutura proteica. Dessa forma, os métodos de validação aplicados confirmam a confiabilidade dos PDBs selecionados, permitindo a continuidade das próximas etapas do estudo de *docking* molecular.

6.8.3 Estudos de *docking* molecular aos sítios específicos na proteína HSA

Os estudos de *docking* molecular têm como objetivo avaliar e compreender a interação entre um ligante e uma proteína. Dessa forma, é possível verificar se o sistema segue o princípio da "chave e fechadura" (em que a estrutura conformacional do receptor/proteína HSA é rígida) ou o modelo "mão e luva" (em que a estrutura conformacional do receptor/proteína HSA é flexível) (KOSHLAND, 1958; KOSHLAND, 1995; ZARNECKA et al., 2021).

Nos estudos computacionais, obtêm-se informações relevantes, como a compreensão das interações entre a estrutura do(s) ligante(s) e os sítios de ligação das proteínas, o que é essencial para pesquisas voltadas à descoberta de novos fármacos (ZARNECKA et al., 2021).

Dessa forma, os estudos de *docking* molecular foram realizados nos sítios de interação da proteína HSA, conhecidos como DS1 (Sítio da varfarina), DS2 (sítio da benzodiazepina) e DS3 (sítio da digitoxina) e para a proteína BSA no DS1.

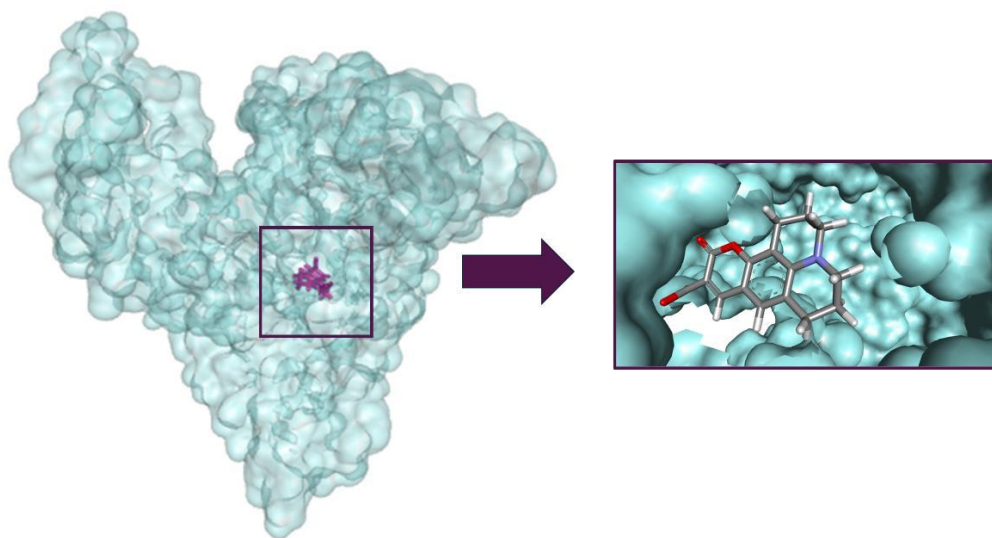
6.8.4 *Docking* molecular ao sítio DS1 da proteína HSA

O sítio DS1 está localizado no subdomínio IIA, abrangendo os aminoácidos desde a serina-192 até o ácido glutâmico-292 (PETERS, 1995). Em seu interior, apresenta uma característica hidrofóbica, subdividida em três subcâmaras (Ia, Ib e Ic).

As subcâmaras Ia e Ib são separadas pelo aminoácido isoleucina-264, enquanto a subcâmara Ic se projeta à frente do sítio.

Os estudos de *docking* molecular no sítio DS1 foram realizados com um raio de 7 Å, com o confômero 1 das estruturas fornecidas pelo *docking*, permitindo a flexibilização da cadeia lateral da arginina-218. Como resultado, obteve-se um valor energético de $-69,02 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Na Figura 25, observa-se que a cumarina 343 está localizada próxima a uma das entradas hidrofóbicas do sítio, especificamente na região Ic, que contém os aminoácidos fenilalanina-211, triptofano-214, alanina-215, leucina-238, lisina-199 e arginina-218.

Figura 25 – Confômero da cumarina 343 obtido no estudo de *docking* molecular para o sítio DS1 da HSA com ampliação da C343 no sítio.



Fonte: Elaborado pela autora.

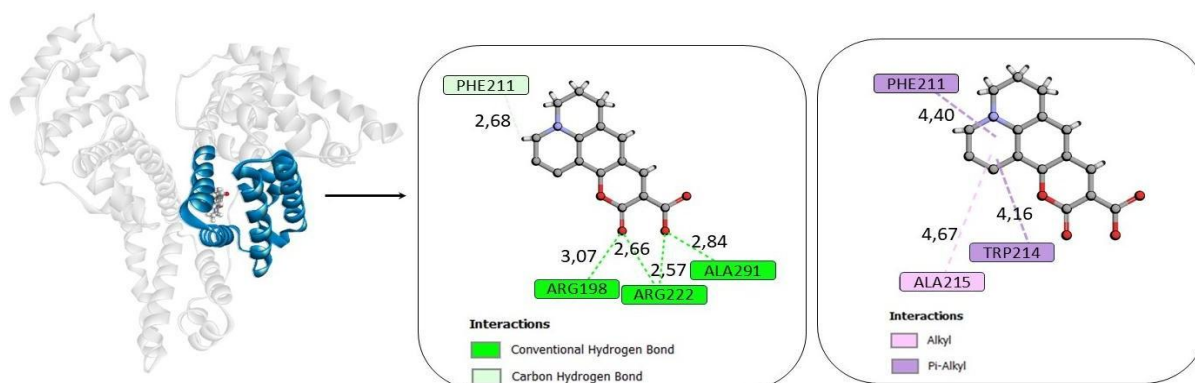
As possíveis interações da C343 com o sítio DS1 foram analisadas com o auxílio do software DS. Conforme apresentado na Tabela 8, a cumarina 343 estabelece cinco interações do tipo ligação de hidrogênio (L.H).

Tabela 8 – Interação da cumarina 343 aos aminoácidos do DS1 da proteína HSA com os valores da distância e suas classificações.

	Distância (Å)	Tipo
ARG222 - C343:O	2,66	Ligação de Hidrogênio
ARG222 - C343:O	2,57	Ligação de Hidrogênio
ARG198 - C343:O	3,07	Ligação de Hidrogênio
ALA291 - C343:O	2,84	Ligação de Hidrogênio
PHE211 - C343	2,68	Ligação de Hidrogênio Carbono
TRP214 - C343	4,16	Pi-Alkyl
PHE211 - C343	4,40	Pi-Alkyl
ALA215 - C343	4,67	Pi-Alkyl

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 26 – Possíveis interações da Cumarina 343 com a proteína HSA no sítio DS1.



Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com o valor de energia obtido, $-69,02 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, aferimos que a C343 possui alta afinidade pelo sítio DS1, validando os dados experimentais previamente reportados.

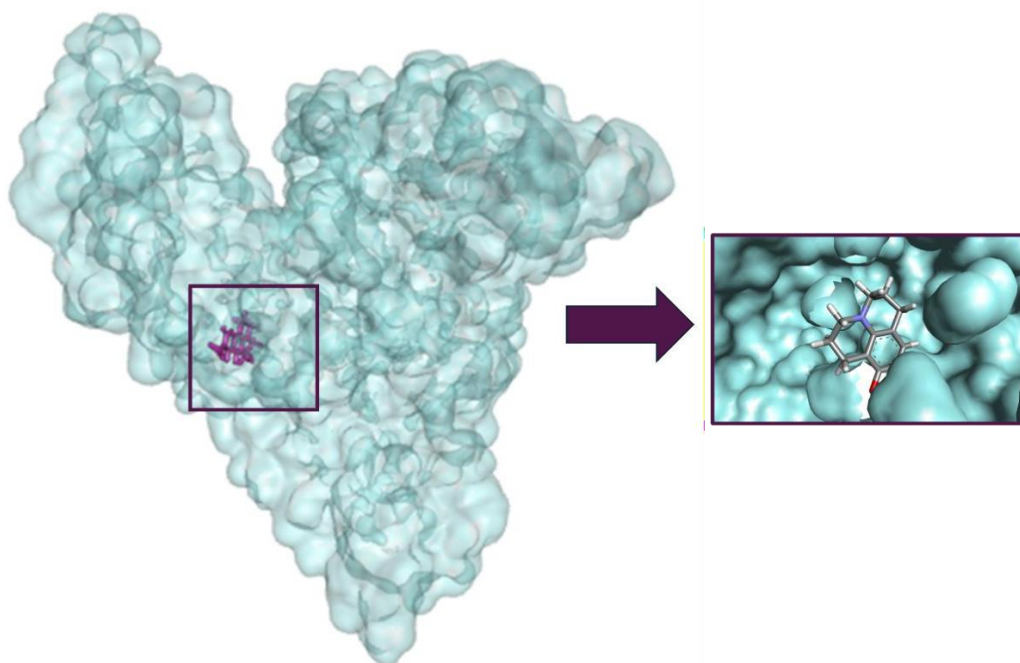
6.8.5 Docking molecular ao sítio DS2 da proteína HSA

O sítio DS2 apresenta similaridade estrutural com o sítio DS1, porém possui apenas uma região polar localizada em uma de suas entradas, abrangendo os aminoácidos arginina-410, lisina-414 e serina-489. Esse sítio está situado no subdomínio IIIA da proteína HSA (ABBOUD et al., 2017; AL-HARTHI et al., 2019; GHUMAN et al., 2005).

Os resultados do *docking* molecular indicam que a cumarina 343 também apresenta afinidade por essa região, com um valor energético de $-53,13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Para esse estudo, utilizou-se um raio de 6 Å, permitindo a flexibilização da cadeia lateral do aminoácido asparagina-391.

Na Figura 27, observa-se que a C343 se posiciona na única região polar do sítio DS2, com seu grupo carbonila orientado nessa direção.

Figura 27 – Confômero da cumarina 343 obtido no estudo de *docking* molecular ao sítio DS2 da proteína HSA com ampliação da C343 no sítio.



Fonte: Elaborado pela autora.

As possíveis interações entre a cumarina 343 e os aminoácidos do sítio DS2 da HSA foram determinadas por meio do software DS. Conforme apresentado na Tabela 9.

Os resultados obtidos para esse sítio reafirmam os obtidos experimentalmente. A primeira observação feita é sobre a afinidade da C343 no sítio, evidenciada pelos estudos de *docking* molecular, confirmando suas interações com essa região da HSA.

A segunda observação diz respeito ao grau de afinidade. Experimentalmente, por meio de análises de fluorescência, verifica-se que a C343 apresenta maior afinidade pelo sítio DS1 em comparação ao DS2. Essa tendência

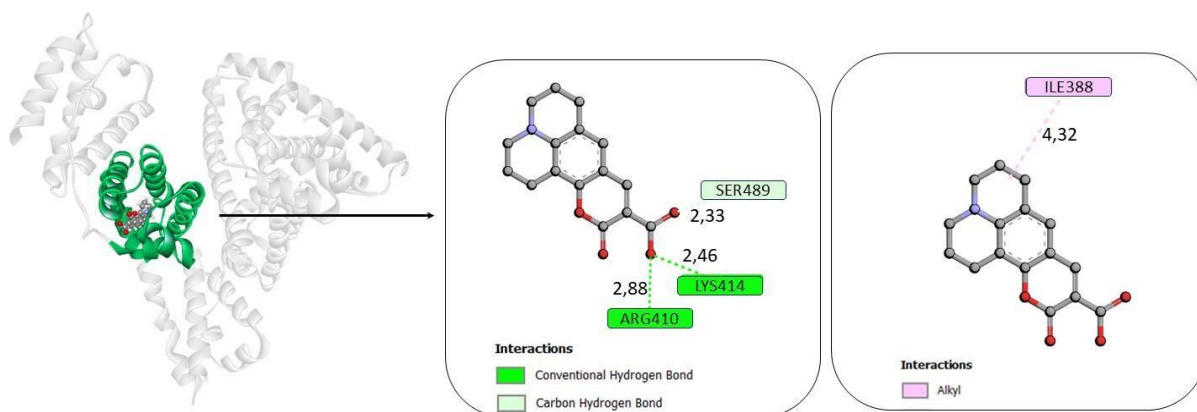
também é confirmada pelos valores de energia obtidos nos estudos de *docking* molecular, onde o sítio DS1 apresenta um valor energético menor ($-69,02 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) em relação ao sítio DS2 ($-53,13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), indicando uma interação mais estável no DS1.

Tabela 9 – Interações do conformero obtido no *docking* molecular ao sítio DS2 da proteína HSA.

	Distância (Å)	Tipo de Ligação
ARG410 – C343	2,88	Ligação de Hidrogênio
LYS414 - C343	2,46	Ligação de Hidrogênio
SER489 - C343	2,33	Ligação de Hidrogênio Carbono
ILE388 – C343	4,32	Alkyl

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 28 – Possíveis interações da Cumarina 343 com a proteína HSA no sítio DS2.



Fonte: elaborado pela autora.

6.8.6 *Docking* molecular ao sítio DS3 da proteína HSA

O sítio DS3 está localizado no subdomínio IB, que é considerado a terceira principal região de ligação a fármacos da HSA. No entanto, sua importância geral na interação com ligantes não havia sido previamente reconhecida (CARTER et al., 1994; ZSILA, 2013).

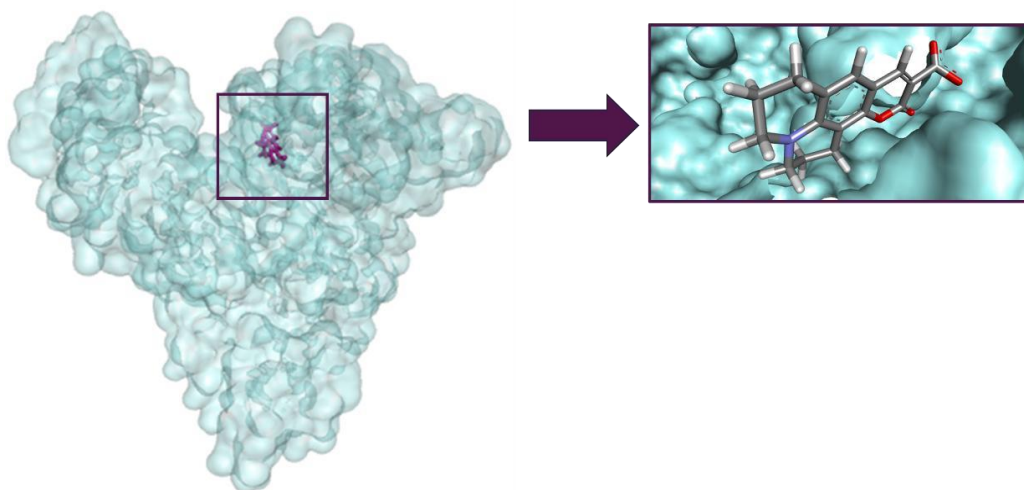
Essa região apresenta uma cavidade em forma de "D" situada no interior do subdomínio, cercada por um aglomerado de quatro hélices. Quando um ligante

interage com essa área, o sítio de ligação é fechado pelos aminoácidos tirosina-138 e tirosina-161 (AL-HARTHI et al., 2019).

Os estudos de *docking* molecular indicam que a cumarina 343 apresenta afinidade por essa região. As análises foram realizadas considerando um raio de 5 Å, sem alterações nos aminoácidos da cadeia lateral, resultando em um valor energético de $-48,68 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Conforme ilustrado na Figura 29 e detalhado na Tabela 10, a C343 se posiciona na entrada do sítio.

Figura 29 – Confôrmero da cumarina 343 obtida nos estudos de *docking* molecular ao sítio DS3 da proteína HSA.



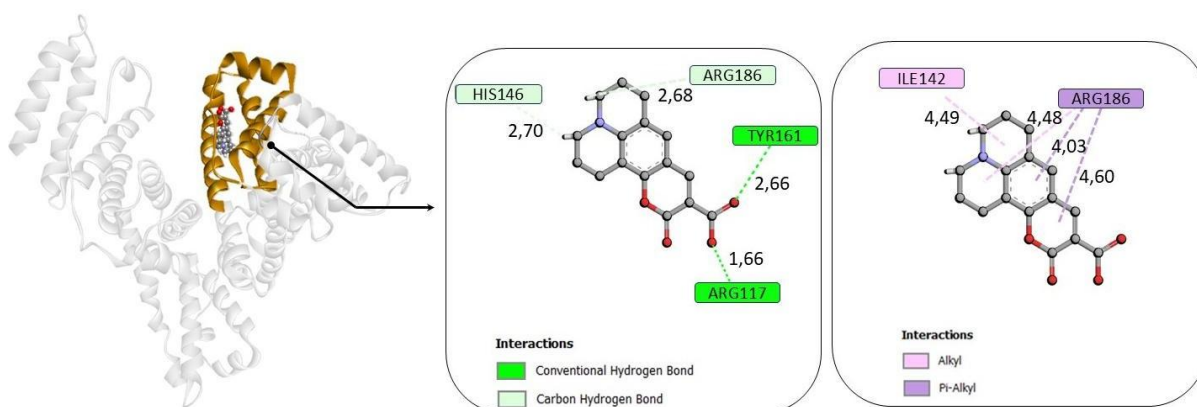
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 10 – Interações do confôrmero obtido no *docking* molecular ao sítio DS3 da proteína HSA.

	Distância (Å)	Tipo de Ligação
ARG117 – C343	1,66	Ligação de Hidrogênio
TYR161 - C343	2,66	Ligação de Hidrogênio
ARG186 - C343	2,28	Ligação de Hidrogênio Carbono
HIS146 - C343	2,70	Ligação de Hidrogênio Carbono
ARG186 – C343	4,03	Pi-Alkyl
ARG186 -C343	4,60	Pi-Alkyl
ARG186 -C343	4,48	Pi-Alkyl
ILE142 – C343	4,49	Alkyl

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 30 – Possíveis interações da cumarina 343 na proteína HSA do sítio DS3.



Fonte: Elaborado pela autora.

Ao comparar os valores energéticos dos três sítios, observa-se uma pequena diferença entre os valores energéticos, porém essa diferença não é tão significativa, indicando que a cumarina 343 apresenta afinidade por todas essas regiões. Esse resultado sugere que não há uma região preferencial para a formação do complexo.

No entanto, essa análise contrasta com os resultados experimentais. Uma possível explicação para essa divergência é que, nos estudos de *docking* molecular, as análises são realizadas em sítios específicos, sem considerar possíveis influências e/ou interferências na formação do complexo cumarina-proteína. Por outro lado, nos

estudos experimentais, os resultados refletem todas as interações possíveis da cumarina 343 nos diversos sítios da proteína HSA, proporcionando uma visão mais abrangente da afinidade do ligante.

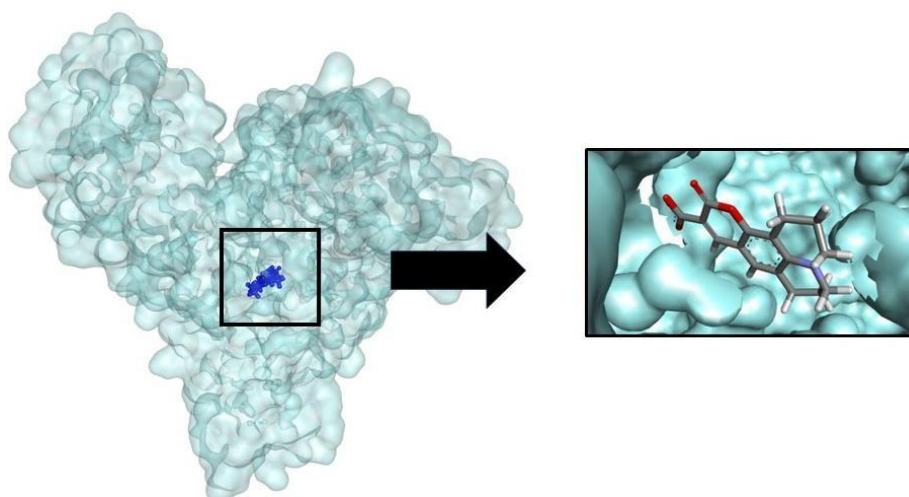
6.8.7 *Docking* molecular ao sítio DS1 da proteína BSA

Considerando que DS1 da BSA, sítio está localizado no subdomínio IIA, é o principal responsável pelo reconhecimento da albumina em diversos ligantes (ABBOUD *et al.*, 2017 e DATTA *et al.*, 2013), correspondendo ao sítio de ligação da warfarina na albumina sérica humana (HSA). Neste trabalho foi feito somente o *docking* deste sítio de interação para a proteína BSA.

Os estudos de *docking* molecular indicam que a C343 apresenta afinidade por essa região. As análises foram realizadas considerando um raio de 7 Å, com flexibilização do aminoácido Arginina-194 na cadeia lateral da proteína, resultando em um valor energético de $-67,22 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Comparando o valor energético do sítio 1 da BSA com o sítio 1 da HSA ($-69,02 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) notamos que os valores energéticos são próximos, indicando, além dos valores do K_a , interação da C343 tanto na HSA como na BSA.

Conforme ilustrado na Figura 30 e detalhado na Tabela 12, a C343 se posiciona na entrada do sítio e as possíveis interações da C343 com o sítio DS1 foram analisadas com o auxílio do software DS.

Figura 31 – Confôrmero da cumarina 343 obtida nos estudos de *docking* molecular ao sítio DS3 da proteína HSA com ampliação da C343 no sítio.



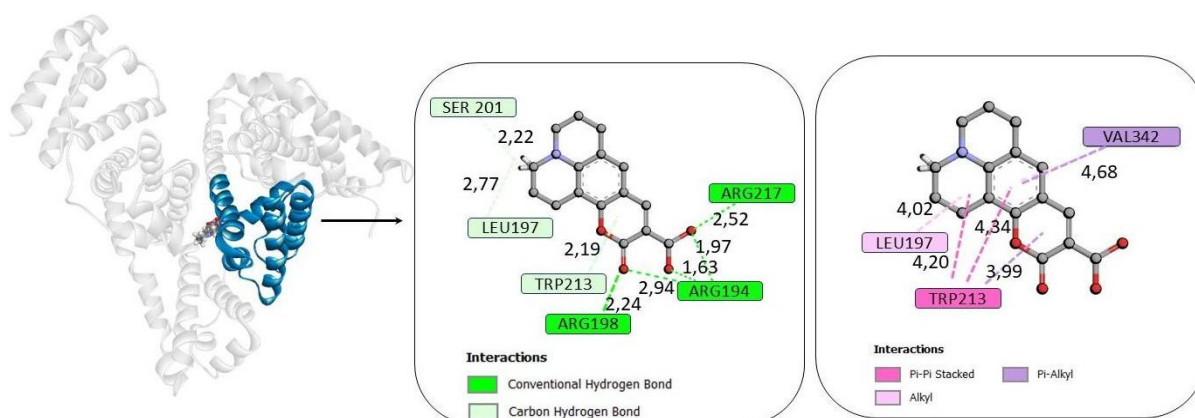
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 11 – Interações do confôrmero obtido no *docking* molecular ao sítio DS1 da proteína BSA.

	Distância (Å)	Tipo de Ligação
ARG194 – C343	1,97	Ligação de Hidrogênio
ARG194 – C343	1,63	Ligação de Hidrogênio
ARG198 – C343	2,24	Ligação de Hidrogênio
LEU197 – C343	2,77	Ligação de Hidrogênio Carbono
TRP213 – C343	2,19	Ligação de Hidrogênio Carbono
SER201 – C343	2,22	Ligação de Hidrogênio Carbono
TRP213 – C343	4,20	Pi-Pi Stacked
TRP213 – C343	4,34	Pi-Pi Stacked
TRP213 – C343	3,99	Pi-Alkyl
LEU197 – C343	4,02	Alkyl
TRP213 – C343	3,99	Pi-Alkyl
VAL342 – C343	4,68	Pi-Alkyl

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 32 – Possíveis interações da cumarina 343 na proteína BSA do sítio DS1.



Fonte: Elaborado pela autora.

6.9 ESTUDOS DE *DOCKING* E TD-DFT NO ECD DA C343 COM HSA E BSA.

A relação entre os resultados obtidos por *docking* molecular e Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (Time Dependent Density Functional Theory (TD-DFT) fundamentou todas as análises teóricas realizadas neste estudo. Essa correlação aprimorou a comparação entre os dados teóricos e experimentais,

conferindo maior robustez às interpretações. O estudo iniciou-se com a simulação de *docking* molecular, seguida dos cálculos baseados em TD-DFT.

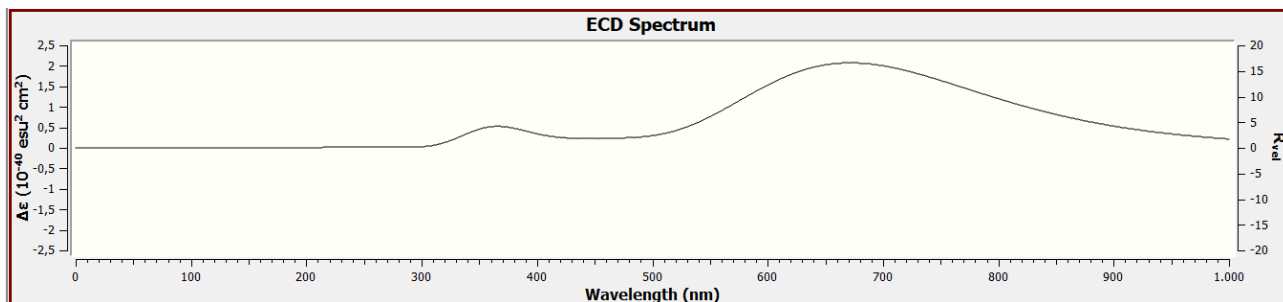
Na etapa de *docking* molecular, foram obtidos dez confôrmers possíveis, correspondentes às conformações mais estáveis da C343 dentro dos sítios de interação. A seleção do confômero mais representativo foi baseada na análise de sobreposição estrutural e na minimização da energia, priorizando aquele que apresentasse a menor energia e a maior superposição com os demais.

A partir do confômero selecionado, foi realizada uma análise detalhada das interações intermoleculares e suas respectivas distâncias, identificando as interações mais próximas e intensas entre a C343 e os resíduos de aminoácidos presentes na HSA e na BSA. Com base nesse confômero, foram extraídas as coordenadas cartesianas (xyz) necessárias para o cálculo do dicróismo circular eletrônico (ECD) teórico, utilizando cálculos baseados em TD-DFT.

A execução dos cálculos foi realizada em clusters do GridUnesp, gerando imagens correspondentes a cada um dos inputs submetidos. Para assegurar a maior compatibilidade possível entre os resultados teóricos e experimentais, foi considerada a influência do microambiente da HSA e da BSA. Em particular, a análise da hidrofobicidade dos sítios de interação proteicos permitiu verificar quais resíduos de aminoácidos estavam mais próximos à carbonila da C343 nos resultados de *docking*.

Desta maneira, iniciou-se os estudos de ECD utilizando a estrutura da cumarina previamente obtida por meio dos estudos de *docking* molecular realizados com a proteína HSA. A partir dessas análises, foi possível observar que o espectro calculado de ECD situava-se majoritariamente em regiões fora do espectro visível, mesmo após a implementação de diferentes metodologias de correção eletrônica. Sendo assim foram testadas distintas abordagens teóricas, incluindo variações nos métodos de funcional da densidade, como o B3LYP e PBE1PBE bem como a aplicação de diferentes conjuntos de funções de base, tais como 6-311++G(2d,p), 6-311++G(3df,2p), entre outros. Ainda assim, as alterações não resultaram em um deslocamento significativo das bandas para a região do visível. Um exemplo deste resultado encontra-se na figura 33.

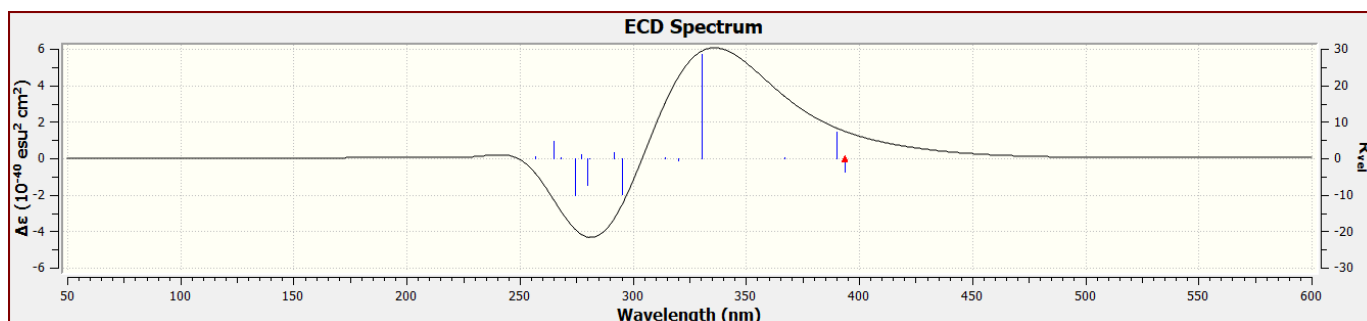
Figura 33 – ECD da interação entre C343 e HSA com funcional PBE1PBE.



Fonte: Elaborado pela autora.

Em virtude do deslocamento do espectro de ECD para regiões espectrais que não favorecem a análise experimental e que não seguem o padrão das bandas, foram conduzidos estudos adicionais considerando o efeito de solventes com diferentes polaridades, tais como água, etanol, acetonitrila, entre outros. O objetivo foi avaliar a influência do meio sobre o posicionamento das bandas espectrais. No entanto, mesmo na presença desses solventes, os espectros calculados mantiveram-se predominantemente fora da região do visível, indicando que a solvatação, nas condições avaliadas, não foi suficiente para promover um deslocamento espectral significativo. Porém é possível observar que há uma similaridade no espectro em comparação ao espectro experimental. Um exemplo deste resultado encontra-se na figura 34.

Figura 34 – ECD da interação entre C343 e HSA em meio com DMSO.



Fonte: Elaborado pela autora.

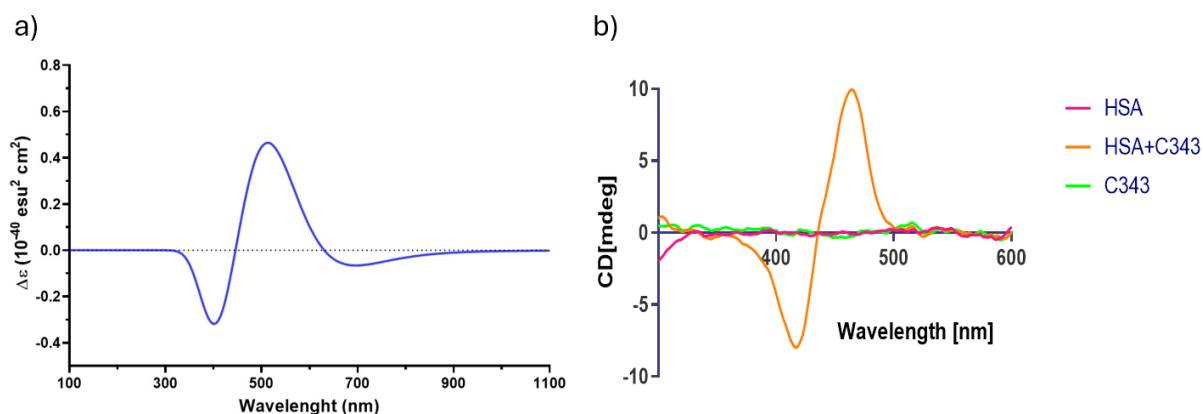
Considerando que as abordagens anteriores, tanto a modificação dos métodos computacionais quanto a introdução de diferentes solventes, não resultaram em um deslocamento significativo do espectro de ECD para a região do visível, foi proposta uma nova estratégia baseada na inclusão de resíduos presentes na estrutura da proteína HSA nos cálculos teóricos.

Assim, incorporou-se à modelagem a presença do resíduo de aminoácido mais próximo à estrutura da cumarina 343, conforme identificado nos estudos de interação molecular realizados previamente com a proteína HSA. Esses estudos indicaram que o resíduo mais próximo é a Arginina 222, localizada no subdomínio IIA da proteína.

Com base nisso, foram conduzidos novos cálculos computacionais considerando apenas a interação entre a cumarina 343 e o resíduo de Arginina 222. Os resultados revelaram um deslocamento considerável das bandas espectrais para a região do visível, além de apresentarem um espectro teórico com alta similaridade em relação ao espectro experimental obtido, sugerindo que a interação com este resíduo desempenha um papel crucial na modulação das propriedades ópticas da molécula (Figura 35).

Figura 35 – Espectro de ECD da Cumarina 343 sob a presença do aminoácido Arginina 222:

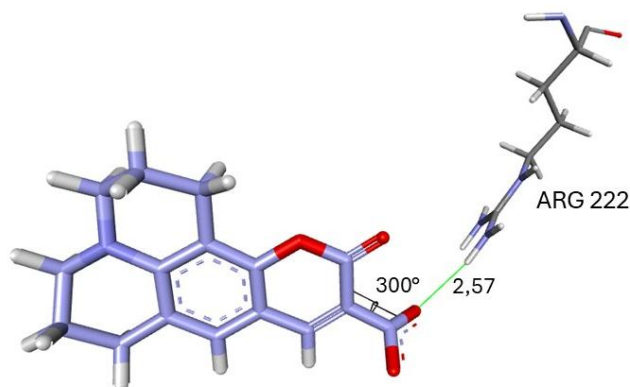
a) Espectro teórico e b) Espectro experimental.



Fonte: Elaborado pela autora.

Sendo que o resíduo de Arginina 222 se encontra a uma distância de 2,57 Å em relação à cumarina 343, na qual representa uma interação do tipo ligação de hidrogênio. Adicionalmente, observou-se que o ângulo diedro formado entre a cadeia lateral da arginina e o grupo carbonila da cumarina é de aproximadamente 300°, sugerindo um arranjo espacial favorável à complexação entre a cumarina e proteína (Figura 36).

Figura 36 – Estrutura da Cumarina 343 obtida nos estudos de *docking* molecular sob a presença da Arginina 222, com indicação dos valores do diedro e distância.

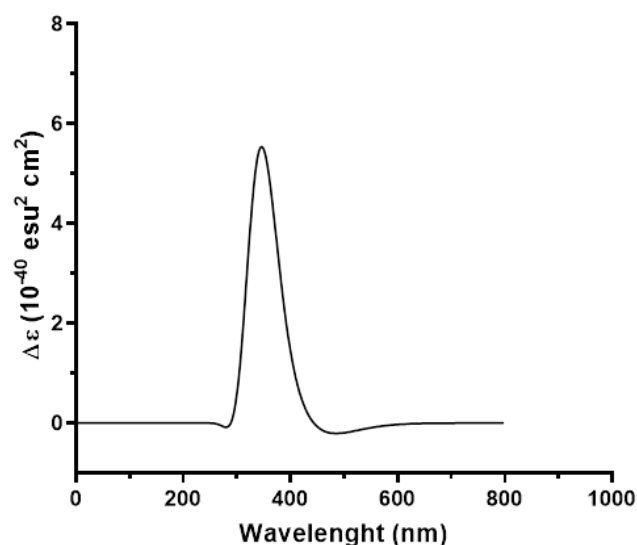


Fonte: Elaborado pela autora.

Nos estudos envolvendo a proteína BSA, foram adotados os mesmos procedimentos metodológicos e condições computacionais (funcional da densidade B3LYP e a função de base 6-311++G(2d,p)) previamente utilizados para a albumina sérica humana, a fim de permitir uma comparação direta entre os sistemas.

As análises iniciaram-se com a estrutura da cumarina obtida a partir dos estudos de *docking* molecular realizados com a BSA, considerando também o resíduo de aminoácido mais próximo ao sítio de interação, neste caso a Arginina 194. A escolha dessa abordagem baseou-se no fato de que a cumarina apresenta afinidade por regiões homólogas nas duas proteínas, o que justifica a comparação paralela. Embora os espectros de dicroísmo circular eletrônico (ECD) calculados para o sistema com a BSA tenham se situado na região do visível, verificou-se que o perfil espectral obtido diverge significativamente do espectro experimental (Figura 37).

Figura 37 – Espectro de ECD da estrutura da Cumarina 343 obtida nos estudos de *docking* molecular sob a presença do aminoácido Arginina 194 da proteína BSA.



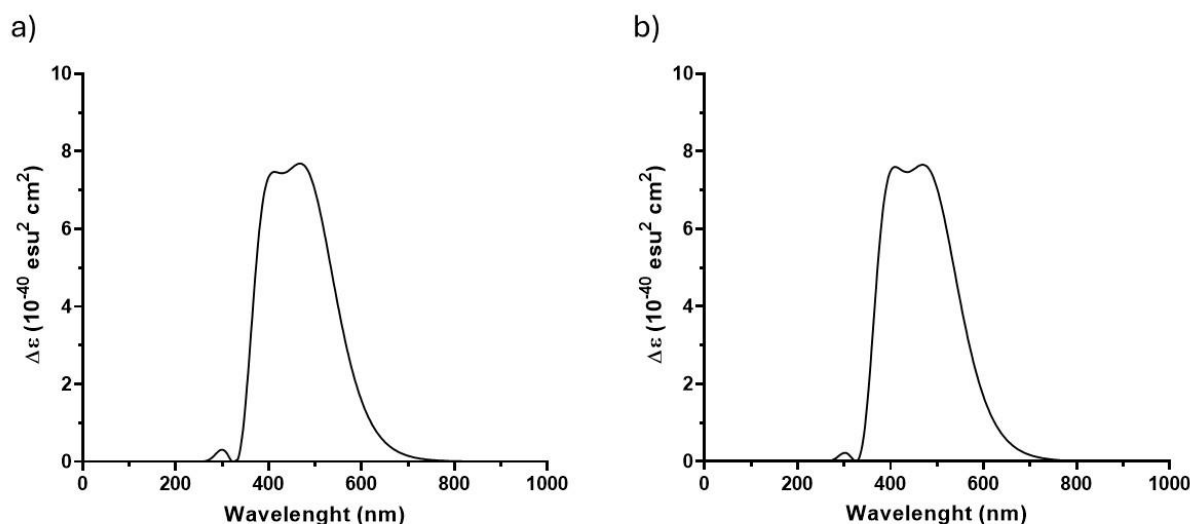
Fonte: Elaborado pela autora.

Observando que os resultados iniciais não apresentaram boa concordância com os dados experimentais, foi incorporada aos cálculos a presença de solventes com diferentes polaridades, como água e acetonitrila, com o objetivo de investigar possíveis efeitos de solvatação sobre o comportamento espectral da cumarina.

A introdução do meio solvatante resultou em um deslocamento batocrômico nas bandas do espectro de ECD, o que confirmou a influência do ambiente na complexação. No entanto, apesar de os espectros permanecerem na região do visível, observou-se que eles ainda apresentaram divergências consideráveis em relação ao espectro experimental, indicando que a solvatação, por si só, não é suficiente para reproduzir com fidelidade o comportamento espectral (Figura 38).

Figura 38 – Espectro de ECD da estrutura da Cumarina 343 obtida nos estudos de *docking* molecular na presença do aminoácido Arginina 194 da proteína BSA com a influência de solvente:

a) Água e b) Acetonitrila.



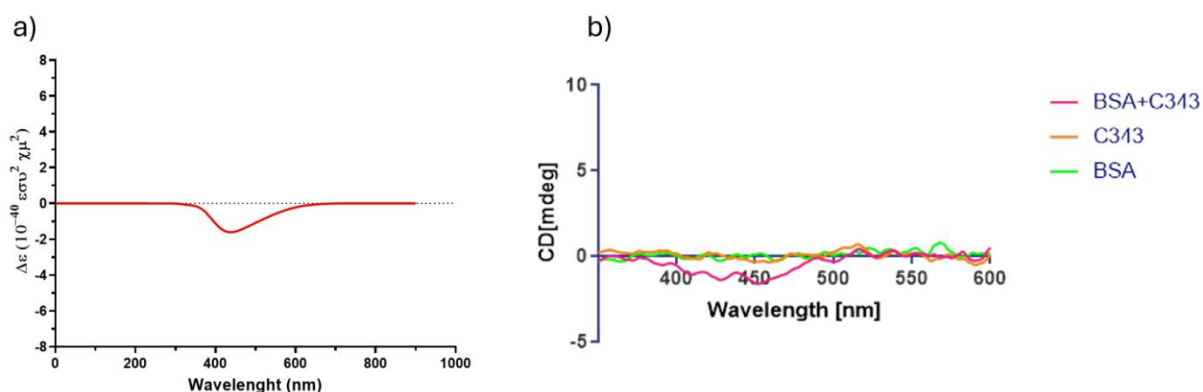
Fonte: Elaborado pela autora.

Considerando que as análises realizadas com a inclusão do aminoácido mais próximo à cumarina 343 no sítio de interação, bem como a presença de solventes, não foram suficientes para reproduzir adequadamente o espectro experimental. Desta forma optou-se por investigar o comportamento espectral da molécula em sua forma isolada. Para isso, foi utilizada a estrutura da cumarina 343 obtida a partir dos estudos de *docking* molecular realizados com a proteína BSA, desconsiderando qualquer influência do ambiente proteico ou solvatante.

Assim, sob essa nova abordagem simplificada, o espectro teórico calculado apresentou uma aproximação mais satisfatória ao perfil experimental, tanto em termos de posicionamento das bandas quanto em relação à forma geral do espectro.

Figura 39 – Espectro de ECD da Cumarina 343

a) Espectro teórico e b) Espectro experimental.



Fonte: Elaborado pela autora.

A estrutura da cumarina 343 apresenta uma leve variação conformacional no ângulo diedro envolvendo o grupo carbonila quando comparada entre os complexos com as proteínas HSA e BSA. Especificamente, no complexo com a BSA, esse diedro assume um valor de aproximadamente 270° , evidenciando uma diferença sutil na orientação do grupo funcional. A análise comparativa entre as duas conformações resultou em um valor de desvio quadrático médio (RMSD) de $0.216 \text{ \AA}$, indicando uma alta similaridade estrutural entre as conformações da cumarina nos dois ambientes proteicos, apesar das pequenas diferenças locais.

Esse resultado sugere que, no caso da BSA, as interações específicas com resíduos próximos ou efeitos de solvatação podem não contribuir positivamente para a modulação do espectro da cumarina, diferentemente do que foi observado para a HSA, onde a inclusão do resíduo de Arginina 222 foi essencial para reproduzir o comportamento espectral. Tais diferenças evidenciam que, apesar das similaridades estruturais entre HSA e BSA, o microambiente de interação, o arranjo espacial dos resíduos vizinhos e a natureza das interações moleculares estabelecidas com a cumarina variam entre as duas proteínas, impactando diretamente nas propriedades eletrônicas e ópticas do ligante. Isso ressalta a importância de considerar as particularidades do ambiente ao modelar sistemas complexos, interpretar os espectros obtidos teoricamente e comparar sistematicamente os resultados dos complexos formados entre ligantes e as diferentes proteínas.

7 CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados, pode-se afirmar que a cumarina 343 (C343) apresenta afinidade significativa pela proteína HSA, com uma constante de associação (K_a) de $2,10 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Da mesma forma, a C343 interage com a BSA, apresentando um valor de $6,5 \times 10^4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Nota-se que a constante de associação da C343 com a HSA é aproximadamente dez vezes maior do que a observada para a BSA.

A caracterização dos sítios de ligação da sonda C343 na albumina sérica humana (HSA) indica preferência pelo domínio de Sudlow I (DS1). O complexo HSA-C343 apresentou a menor energia livre de interação em DS1 ($-53,13 \text{ kcal mol}^{-1}$), em relação a DS2 ($-48,68 \text{ kcal mol}^{-1}$) e DS3. Dessa forma, tanto os ensaios experimentais quanto as simulações de *docking* convergem para DS1 como o sítio de maior afinidade, seguido por DS2.

Para DS3, porém, observa-se uma divergência, a fluorescência resolvida experimentalmente revela apenas uma supressão de baixa intensidade — sinal típico de interação fraca — enquanto os cálculos de *docking* atribuem afinidade perceptível nesse mesmo local. Essa discrepância decorre, em parte, da própria natureza das abordagens, sendo que o *docking* avalia cada sítio isoladamente e, por meio do software Discovery Studio, explora um leque completo de conformações plausíveis, ao passo que os experimentos de fluorescência refletem o panorama competitivo e dinâmico de ligações nos três sítios simultaneamente. Portanto, os resultados teóricos representam um potencial máximo de interação em condições ideais, ao passo que os dados experimentais capturam a afinidade efetiva em solução.

No DS1, os espectros de fluorescência revelaram um deslocamento hipocrômico da C343 na presença de varfarina, sugerindo que esta desloca a C343 do sítio. Essa afinidade da C343 por DS1 também foi corroborada pelos estudos de *docking* molecular, nos quais foi obtido um valor energético de $-69,02 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, reforçando a hipótese de que DS1 é o sítio preferencial de ligação.

Para os sítios DS2 e DS3, observou-se que a C343 também interage com a HSA, porém com afinidade significativamente menor em relação ao DS1. Experimentalmente, verificou-se que, na presença de ibuprofeno, os espectros de fluorescência da C343 apresentaram um deslocamento hipocrômico menos

pronunciado, indicando uma menor quantidade de moléculas livres e sugerindo que o ibuprofeno desloca a C343 de maneira menos eficiente. Já na adição de digitoxina há uma supressão de fluorescência mínima, indicando que há interação, porém com pequena afinidade da C343 a este sítio.

No caso da BSA, a interação da C343 foi analisada exclusivamente no DS1, pois a literatura indica que esse sítio é um local de interação preferencial para fármacos. A confirmação da interação foi obtida por meio do valor de K_a , que está dentro da faixa de constantes de associação de outros fármacos com proteínas. Nos resultados teóricos foi obtido um valor energético de $-67,22 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para o complexo BSA-C343.

Para o complexo HSA-C343, foram analisados os parâmetros termodinâmicos, indicando que o processo de complexação é espontâneo e exotérmico, conforme os valores de entalpia e entropia. Além disso, os valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e da constante de supressão bimolecular (K_q) apontam para um mecanismo de quenching estático.

A determinação da estequiometria do complexo HSA-C343 foi realizada utilizando o método de Job's Plot, indicando uma proporção de 1:1 entre HSA e C343, proporção também adotada para a BSA. Esses resultados reforçam a forte interação da C343 com ambas as proteínas, sugerindo seu potencial como sonda molecular para a investigação de interações biomoleculares no organismo.

Na determinação do dicróismo circular eletrônico (induzido) (ECD), tanto nos estudos teóricos quanto nos experimentais, observou-se uma similaridade intrínseca nos resultados para HSA e BSA. Para essa análise, foi fundamental a investigação da distribuição conformacional dos confôrmeros da C343, auxiliando na interpretação do sinal observado na complexação com a HSA e na sua diminuição na interação com a BSA. Para isto foi necessário um estudo computacional deste confôrmeros utilizando *docking* molecular e a teoria do funcional da densidade (TD-DFT) nos cálculos para gerar o ECD teórico.

Os resultados experimentais confirmam a interação da C343 com ambas as proteínas. Entretanto, a ausência de sinal de ECD na complexação com a BSA sugere que as conformações adotadas pela C343 nos sítios de interação de cada proteína diferem significativamente. A análise detalhada das interações intermoleculares indica que as ligações estabelecidas no DS1 da HSA são distintas daquelas observadas no DS1 da BSA, refletindo diferenças estruturais e dinâmicas

nos complexos formados.

Portanto, este estudo indica que a utilização da albumina sérica bovina (BSA) como modelo experimental para a albumina sérica humana (HSA) deve ser avaliada com maior critério. Embora a BSA e a HSA compartilhem elevada homologia estrutural e funcional, a análise das interações com o ligante C343 evidenciou diferenças substanciais na formação dos complexos moleculares com cada proteína. Essas discrepâncias sugerem que, apesar das semelhanças globais, elas podem influenciar significativamente o reconhecimento e a estabilidade dos complexos formados com diversos ligantes. Diante disso, reforça-se a importância de empregar abordagens integradas, combinando métodos experimentais e técnicas computacionais, a fim de obter uma compreensão mais precisa e representativa das interações fármaco-proteínas.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AGU, P. C. et al. Molecular *docking* as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 13398, 2023.
- 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.
- AL-HARTHI, S. et al. Towards the functional high-resolution coordination chemistry of blood plasma human serum albumin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 198, p. 110716, 2019.
- ALLENMARK, S. Induced circular dichroism by chiral molecular interaction. **Chirality**, v. 15, n. 5, p. 409–422, 2003.
- ASCENZI, P. et al. Ligand binding to the FA3-FA4 cleft inhibits the esterase-like activity of human serum albumin. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, e0120603, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0120603. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0120603>>. Acesso em: 5 abr. 2025.
- AUTSCHBACH, J. et al. Chiroptical properties from time-dependent density functional theory. I. Circular dichroism spectra of organic molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 116, n. 16, p. 6930–6940, 2002.
- BASTOS, L. **Re-docking molecular utilizando o PyMOL e AutoDock Vina**. Disponível em: <<https://bioinfo.com.br/re-docking-molecular-utilizando-o-pymol-e-autodock-vina/>>. Acesso em: 14 dez. 2023.
- BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**, v. 38, n. 6, p. 3098, 1988.
- BERTOZO, L. C. **Desenvolvimento de sondas fluorescentes para determinação de sítios de ligação em albumina: estudo da relação entre estrutura molecular, constante de associação e especificidade**. 129 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, 2021. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/213462>>. Acesso em: 8 abr. 2025.
- BHATTACHARYA, A. A.; CURRY, S.; FRANKS, N. P. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin: high resolution crystal structures. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 49, p. 38731–38738, 8 dez. 2000.

BIJARI, N. et al. Spectroscopic study of interaction between osthole and human serum albumin: identification of possible binding site of the compound. **Journal of Luminescence**, v. 143, p. 328–336, 2013.

BOLATTIN, M. B. et al. Interaction between carisoprodol and bovine serum albumin and effect of β -cyclodextrin on binding: Insights from molecular *docking* and spectroscopic techniques. **RSC Advances**, v. 6, n. 68, p. 63463–63471, 2016.

BOLEL, P.; DATTA, S.; MAHAPATRA, N.; HALDER, M. Spectroscopic investigation of the effect of salt on binding of tartrazine with two homologous serum albumins: quantification by use of the Debye–Hückel limiting law and observation of enthalpy–entropy compensation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, p. 10195–10204, 2012. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp304537m>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

BORGES, F.; ROLEIRA, F.; MILHAZES, N.; SANTANA, L.; URIARTE, E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, 2005. Disponível em: <<http://doi.org/10.2174/0929867053507315>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

BUJACZ, A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 68, n. 10, p. 1278–1289, 2012.

CARNEIRO, A. et al. Trending topics on coumarin and its derivatives in 2020. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 501, 2021.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 153–203, 1994.

CHAVES, O. A. et al. In vitro analysis of the interaction between human serum albumin and semi synthetic clerodanes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 9, p. 1786–1795, 2018.

CHEN, J.; OHNMACHT, C.; HAGE, D. S. Studies of phenytoin binding to human serum albumin by high-performance affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 809, n. 1, p. 137–145, 2004.

CHMYROV, V. **Fluorescence fluctuation studies of biomolecular interactions in solutions, biomembranes and live cells**. 2016. Tese (Doutorado em Física) – Department of Applied Physics, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, 2016.

COUTSIAS, E. A.; SEOK, C.; DILL, K. A. Using quaternions to calculate RMSD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 15, p. 1849–1857, 2004.

COUTSIAS, E. A.; WESTER, M. J. RMSD and symmetry **Journal of Computational Chemistry**, v. 40, n. 15, p. 1496–1508, 2019.

CVIJETIĆ, I. N. et al. Human serum albumin binding of 2-[(carboxymethyl) sulfanyl]-4-oxo-4-(4-tert-butylphenyl) butanoic acid and its mono-Me ester. **ADMET and DMPK**, v. 2, n. 2, p. 126–142, 2014.

DASGUPTA, A. Immunoassays and issues with interference in therapeutic drug monitoring. In: DASGUPTA, A. **Clinical challenges in therapeutic drug monitoring**. Amsterdam: Elsevier, 2016. p. 17–44.

DATTA, Shubhashis; HALDER, Mintu. Detailed scrutiny of the anion receptor pocket in subdomain IIA of serum proteins toward individual response to specific ligands: HSA-pocket resembles flexible biological slide-wrench unlike BSA. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 23, p. 6071–6085, 2014. DOI: 10.1021/jp501547r. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp501547r>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

DE SOUZA, A. R. 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. 140–142, fev. 2019. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/Ry4whqTvf3TSY4v6ZL9mvnQ/?lang=pt>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

DE VASCONCELOS, D. N. **Estudo e aplicação de sondas moleculares baseadas em dicroísmo circular induzido para determinação de sítios de ligação em albumina e caracterização de agregados amiloides**. 2019. Tese (Doutorado em Química dos Materiais) – Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, 2019.

EL GAMMAL, R. N. et al. Exploring the molecular interaction of mebendazole with bovine serum albumin using multi-spectroscopic approaches and molecular *docking*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 11582, 2022.

EVOLI, S. et al. Multiple binding modes of ibuprofen in human serum albumin identified by absolute binding free energy calculations. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 47, p. 32358–32368, 2016.

FRANCO, D. P. et al. A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. **Química Nova**, v. 44, p. 180–197, 2021.

FREITAS JUNIOR, I. F. **Aminoácidos e proteínas**. Disponível em: <<https://www2.fct.unesp.br/docentes/edfis/ismael/nutricao/Amino%E1cidos%20e%20prote%C3%A9dinas%20pgs%209%20a%2013%20e%2017.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2024.

GAWROŃSKI, J.; GRAJEWSKI, J. The significance of induced circular dichroism. **Organic Letters**, v. 5, n. 18, p. 3301–3303, 2003.

GENOVESE, D. et al. Static quenching upon adduct formation: a treatment without shortcuts and approximations. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 15, p. 8414–8427, 2021.

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. S. **Estudo do efeito de solventes nas propriedades espectroscópicas do antibiótico norfloxacin: absorção, fluorescência estacionária e resolvida no tempo**. 2010. Tese (Doutorado em Física) – Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

GRACIANI, Fernanda S.; XIMENES, Valdecir F. Investigation of human albumin-induced circular dichroism in dansylglycine. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76849, 16 out. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0076849. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0076849>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 81–98, 2010.

GUIZADO, T. R. C. **Estudos computacionais da interação de porfirinas e seus complexos de ferro com albumina sérica humana**. 2008. Dissertação (Mestrado em Física) – Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

GUTIERREZ, J. A.; FALCONE, R. D.; SILBER, J. J.; CORREA, N. M. Role of the medium on the C343 inter/intramolecular hydrogen bond interactions: an absorption, emission, and ¹H NMR investigation of C343 in benzene/n-heptane mixtures. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 114, p. 7326–7330, 2010.

HAVEL, H. A. **Spectroscopic methods for determining protein structure in solution**. Weinheim: VCH, 1995. 350 p.

HILDEBRAND, J. H.; BENESI, H. A. Interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. **Nature**, v. 164, n. 4179, p. 963, 1949.

HOULT, J. R. S.; PAYA, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713–722, 1996.

HUANG, C. Y. Determination of binding stoichiometry by the continuous variation method: the Job plot. In: COLLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1982. p. 509–525.

JAHANBAN-ESFAHLAN, Ali; DASTMALCHI, Siavoush; DAVARAN, Soodabeh. A simple improved desolvation method for the rapid preparation of albumin nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 703–709, out. 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.05.032. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813016304433>> Acesso em: 8 abr. 2025.

JOHNSON, E. R.; KEINAN, S.; MORI-SÁNCHEZ, P.; CONTRERAS-GARCÍA, J.; COHEN, A. J.; YANG, W. Revealing noncovalent interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 18, p. 6498–6506, 2010.

JUNIOR, W. E. F.; FRANCISCO, W. Proteínas: hidrólise, precipitação e um tema para o ensino de química, **Química Nova na Escola**, nº 24, novembro, 2006.

KANDAGAL, P. B. et al. Study of the interaction between doxepin hydrochloride and bovine serum albumin by spectroscopic techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 39, n. 4–5, p. 234–239, 2006. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2006.03.027. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.03.027>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

KOPPAL, V. V. et al. Investigation of the fluorescence turn-off mechanism, genome, molecular *docking* in silico and in vitro studies of 2-acetyl-3H-benzo[f]chromen-3-one. **ACS Omega**, v. 7, n. 27, p. 23759–23770, 2022.

KOSHLAND JR, D. E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 44, n. 2, p. 98–104, 1958.

KOSHLAND JR, D. E. The key–lock theory and the induced fit theory. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 33, n. 23–24, p. 2375–2378, 1995.

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.

KRAGH-HANSEN, U. Relations between high-affinity binding sites of markers for binding regions on human serum albumin. **Biochemical Journal**, v. 225, n. 3, p. 629–638, 1985.

KSENOFONTOV, A. A. et al. Water-soluble BODIPY-based fluorescent probe for BSA and HSA detection. **Journal of Molecular Liquids**, v. 345, p. 117031–117040, 2021.

KUFAREVA, I.; ABAGYAN, R. Methods of protein structure comparison. In: GORENSTEIN, D. G. (Ed.). **Homology modeling: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2012. p. 231–257.

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

LAURENT, A. D.; JACQUEMIN, D. TD-DFT benchmarks: A review. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 113, n. 17, p. 2019–2089, 2013.

LEHN, J.-M.; SANDERS, J. K. M. Supramolecular chemistry: concepts and perspectives. **Angewandte Chemie - International Edition in English**, v. 34, n. 22, p. 2563, 1995.

LEJON, S.; CRAMER, J. F.; NORDBERG, P. Structural basis for the binding of naproxen to human serum albumin in the presence of fatty acids and the GA module. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 64, n. 2, p. 64–69, 2008.

LINDUP, W. E.; ORME, M. C. Clinical pharmacology: plasma protein binding of drugs. **British Medical Journal (Clinical Research Edition)**, Londres, v. 282, n. 6259, p. 212–214, 17 jan. 1981. DOI: <<https://doi.org/10.1136/bmj.282.6259.212>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

LIU, Y.-S.; FANG, Y.; RAMANI, K. Using least median of squares for structural superposition of flexible proteins. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 1–23, 2009.

LIU, Z. et al. Prediction of the RNA tertiary structure based on a random sampling strategy and parallel mechanism. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 813604, 2022.

LUIZ, F. C. L. **Estudos de fluorescência estacionária e resolvida no tempo de anestésicos locais e de antibióticos da classe das fluoroquinolonas**. 2009. Tese (Doutorado em Física) – Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MAHAMIYA, V.; BHATTACHARYYA, P.; SHUKLA, A. Benchmarking Gaussian basis sets in quantum-chemical calculations of photoabsorption spectra of light atomic clusters. **ACS Omega**, v. 7, p. 48261–48271, 2022.

MARUYAMA, K.; NISHIGORI, H.; IWATSURU, M. Characterization of the benzodiazepine binding site (diazepam site) on human serum albumin. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 11, p. 5002–5012, 1985.

MATEEV, E. et al. Validation through re-*docking*, cross-*docking* and ligand enrichment in various well-resolved MAO-B receptors. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 13, p. 1000–1007, 2022.

McCONKEY, Brendan J.; SOBOLEV, Vladimir; EDELMAN, Marvin. The performance of current methods in ligand–protein *docking*. **Current Science**, v. 83, n. 7, p. 845, 10 out. 2002.

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**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011.

MOREIRA, M. B. **Complexos trinucleares de rutênio com ponte μ -oxo contendo ligantes n-heterocíclicos e monóxido de carbono: síntese, caracterização e estudo de interação com biomoléculas**. 2016. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

MORIYAMA, Yoshiko; OHTA, Daisuke; HACHIYA, Kazuaki; MITSUI, Yasuhiro; TAKEDA, Kunio. Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumins in ionic surfactant solutions: a comparative study of the two and one

tryptophan(s) of bovine and human albumins. **Journal of Protein Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 265–272, 1996. DOI: 10.1007/BF01887115. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01887115>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

NAKATA, A.; IMAMURA, Y.; OTSUKA, T.; NAKAI, H. Time-dependent density functional theory calculations for core-excited states: assessment of standard exchange-correlation functionals and development of a novel hybrid functional. **The Journal of Chemical Physics**, v. 124, p. 094105, 2006.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

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, p. 261–270, 2020.

NETO, Tavares Ernesto. **Avaliação das propriedades de interação envolvendo as proteínas Albumina de Soro Humano (HSA) e Albumina de Soro Bovino (BSA)**. 2021. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2021.

OLSON, E. J.; BÜHLMANN, P. Getting more out of a Job plot: determination of reactant to product stoichiometry in cases of displacement reactions and n:n complex formation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 20, p. 8406–8412, 2011.

OLSON, Richard E.; CHRIST, David D. Plasma protein binding of drugs. In: BRISTOL, James A. (ed.). **Annual Reports in Medicinal Chemistry**. San Diego: Academic Press, 1996. v. 31, cap. 33, p. 327–336. ISBN 9780120405312. DOI: 10.1016/S0065-7743(08)60472-8. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)60472-8](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)60472-8)>. Acesso em: 8 abr. 2025.

PACHECO, I. B. **Estudo molecular e espectroscópico da interação de derivados dihidropiridínicos com o DNA**. 2023. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2023.

PASTRELO, B. **Síntese e aplicações de aminoquinolinas como sondas fluorescentes para estudos de proteínas e micelas**. 2021. Tese (Doutorado em Química dos Materiais) – Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, 2021.

PENG, X.-M. et al. **Current developments of coumarin compounds in medicinal chemistry**. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 21, p. 3884–3930, 2013.

PEREIRA, T. M.; FRANCO, D. P.; VITÓRIO, F.; KUMMERLE, A. E. Coumarin compounds in medicinal chemistry: some important examples from the last years. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 124–148, 2018. DOI: 10.2174/1568026618666180329115523. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29595110/>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

PETERS JR, T. **All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications**. San Diego: Academic Press, 1995.

PISTOLOZZI, M.; BERTUCCI, C. Species-dependent stereoselective drug binding to albumin: a circular dichroism study. **Chirality**, v. 20, n. 3–4, p. 552–558, mar. 2008.

PITMAN, S. J.; EVANS, A. K.; IRELAND, R. T.; LEMPRIERE, F.; McKEMMISH, L. K. **Benchmarking basis sets for density functional theory thermochemistry calculations: why unpolarised basis sets and the polarised 6-311G family should be avoided**. Sydney: School of Chemistry, University of New South Wales, 20 nov. 2023.

PLOCH-JANKOWSKA, A.; PENTAK, D.; NYCZ, J. E. A comprehensive spectroscopic analysis of the ibuprofen binding with human serum albumin, part II. **Scientia Pharmaceutica**, v. 89, n. 3, p. 30, 2021.

RAWEL, H. M.; MEIDTNER, K.; KROLL, J. Binding of selected phenolic compounds to proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4228–4235, 2005.

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.

RIMAC, H. et al. Indomethacin increases quercetin affinity for human serum albumin: a combined experimental and computational study and its broader implications **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 5740, 2020.

RIMAC, H. et al. Warfarin and flavonoids do not share the same binding region in binding to the IIA subdomain of human serum albumin. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1153, 2017.

ROY, A. S., et al. Effects of Urea, Metal Ions and Aurfactants on the Binding of Baicalein with Bovine Serum Albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 4, p. 256–267, 2016.

ROY, S. Fluorescence quenching methods to study protein-nucleic acid interactions. **Methods in Enzymology**, v. 379, p. 175–187, 2004.

RUSSELL, B. A. et al. Probing the Sudlow binding site with warfarin: how does gold nanocluster growth alter human serum albumin? **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 33, p. 22874–22878, 2016.

RYAN, A. J. et al. Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin. **Journal of Structural Biology**, v. 174, n. 1, p. 84–91, 2011.

SANCHES, R. N. F. **Estudo da interação de metalofármacos de dirutênio-anti-inflamatórios com as proteínas séricas transferrina e albumina**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Químicas) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SELVARAJ, N.; ANANDAN, S. Binding of serum albumins with bioactive substances – nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 14, p. 53–71, 2013. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.001>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

SHAHABADI, N.; HADIDI, S. Molecular modeling and spectroscopic studies on the interaction of the chiral drug venlafaxine hydrochloride with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 122, p. 100–106, 2014.

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. 4282, 2020.

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. DOI: 10.21577/0100-4042.20170341. Disponível em: <<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170341>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

SRIVASTAVA, K.; SINGH, S.; KUMAR, P.; KUMAR, R. Review of post-translational modification of human serum albumin: A potential marker with altered structure and function. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 482–492, 2020. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/358698475_Review_of_post-translational_modification_of_human_serum_albumin>. Acesso em: 8 abr. 2025.

STAN, D.; MATEI, I.; MIHAILESCU, C.; SAVIN, M.; MATAACHE, M.; HILLEBRAND, M.; BACIU, I. Study of the interaction between some new flavone derivatives and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. **Molecules**, v. 14, n. 4, p. 1614–1626, 2009. DOI: 10.3390/molecules14041614. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/14/4/1614>>. Acesso em: 8 abr. 2025.

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.

SULKOWSKA, A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 616, p. 227–232, 2002.

TRYNDA-LEMIESZ, Lilianna; WIGLUSZ, Katarzyna. Interactions of human serum albumin with meloxicam: characterization of binding site. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 2, p. 300–304, 5 jun. 2010. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.12.025. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20089378/>>. Acesso em: 08 abr. 2025.

VITÓRIO, F.; PEREIRA, T. M.; CASTRO, R. N.; GUEDES, G. P.; GRAEBIN, C. S.; KUMMERLE, A. E. Synthesis and mechanism of novel fluorescent coumarin–dihydropyrimidinone dyads obtained by the Biginelli multicomponent reaction. **New Journal of Chemistry**, v. 39, p. 2323, 2015.

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.

WEN, Y. et al. Application of quantitative structure–activity relationship to the determination of binding constant based on fluorescence quenching. **Journal of Luminescence**, v. 131, n. 1, p. 126–133, 2011.

YADAV, R.; SENGUPTA, B.; SEN, P. Detail modes of binding assessed by bulk and single molecular level fluorescence, MD simulation, and its temperature dependence: coumarin 152 with human serum albumin revisited. **Selected Topics in Photonics**, p. 1–12, 2018.

YOGUIM, M. I. **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**. 2021. Tese (Doutorado em Química dos Materiais) – Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, 2021.

ZAIDI, N. et al. Biophysical insight into furosemide binding to human serum albumin: a study to unveil its impaired albumin binding in uremia. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 9, p. 2595–2604, 2013.

ZARNECKA, J. et al. Mapping ligand-shape space for protein–ligand systems: distinguishing key-in-lock and hand-in-glove proteins. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 4, p. 1859–1874, 2021.

ZHANG, Dawei et al. Acridine-based macrocyclic fluorescent sensors: self-assembly behavior characterized by crystal structures and a tunable bathochromic-shift in emission induced by via adjusting the ring size and rigidity. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 20, p. 3375–3381, 2013.

ZHIVKOVA, Z. Studies on drug–human serum albumin binding: the current state of the matter. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 14, p. 1817–1830, 26 mar. 2015.

ZSILA, F.; HAZAI, E.; SAWYER, L. Binding of the pepper alkaloid piperine to bovine β -lactoglobulin: circular dichroism spectroscopy and molecular modeling study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 10179–10185, 28 dez. 2005.

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.