

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Materiais

Giulia Saneti Grandini

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA ALBUMINA DO SORO HUMANO E
O FÁRMACO SULFASSALAZINA NUMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL E
TEÓRICA**

BAURU

2024

Giulia Saneti Grandini

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA ALBUMINA DO SORO HUMANO E
O FÁRMACO SULFASSALAZINA NUMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL E
TEÓRICA

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

BAURU

2024

G753e Grandini, Giulia Saneti
Estudo da Interação entre a Proteína Albumina do Soro Humano e o
Fármaco Sulfassalazina numa Abordagem Experimental e Teórica /
Giulia Saneti Grandini. -- Bauru, 2024
157 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências, Bauru
Orientadora: Aguinaldo Robinson de Souza
Coorientadora: Valdecir Farias Ximenes

1. HSA. 2. Sulfassalazina. 3. Constante de associação. 4. TD-DFT.
5. Docking molecular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências, Bauru. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GIULIA SANETI GRANDINI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 08 dias do mês de fevereiro do ano de 2024, às 14:30 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GIULIA SANETI GRANDINI, intitulada **Estudo da Interação entre a Proteína Albumina do Soro Humano e o Fármaco Sulfassalazina numa Abordagem Experimental e Teórica**. 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. Dr. AUGUSTO BATAGIN NETO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências e Tecnologia / Instituto de Ciências e Engenharia - Unesp/Câmpus de Itapeva. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Assoc. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA



AGRADECIMENTOS

É com muito carinho que deixo aqui meus agradecimentos a todas as pessoas que tornaram esse projeto de mestrado possível. Ao meu orientador, professor Aguinaldo, pela sua disponibilidade, apoio e dedicação que foram tão necessários ao longo desses anos. Iniciei minha carreira científica com o senhor procurando as respostas, mas aprendi que o move são as perguntas.

Agradeço o meu co-orientador, professor Valdecir, por ter me acolhido em seu laboratório e por ter lapidado a minha trajetória acadêmica até aqui.

Agradeço a Luiza por ter me ensinado muito durante o tempo que compartilhamos o laboratório e pela paciência ao fazê-lo.

Agradeço ao professor Nelson, pela imensa colaboração no desenvolvimento desse projeto.

Agradeço os meus amigos do grupo de pesquisa Carmen, Tainá e Maurício por todo o carinho e amizade. Vocês são de grande inspiração para mim.

Agradeço as minhas amigas e parceiras de crime Laura, Gabriela, Ilana, Julia, Mayara, Letícia e Nicole. É um privilégio poder compartilhar a vida com vocês.

Agradeço Gislaine, Maurilei, Mariana, Dalva, Ramires, Cida e a todos os meus demais familiares responsáveis por me tornarem uma pessoa melhor, diariamente. Também agradeço ao meu falecido avô João, que estava comigo durante todas as minhas idas à Universidade, mesmo que em pensamento.

Agradeço a Joice, responsável pela minha perseverança e resiliência.

Agradeço a UNESP, onde nasceu e cresceu minha formação.

E, por fim, agradeço meus pais João e Patrícia e meu irmão Caio, por todo amor do mundo e por me tornarem quem eu sou. A vocês dedico este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

GRANDINI, G. S. **Estudo da Interação entre a Proteína Albumina do Soro Humano e o Fármaco Sulfassalazina numa Abordagem Experimental e Teórica**. 2024. 157 f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2024.

RESUMO

O estudo das interações entre fármacos e proteínas é um tema de interesse científico-tecnológico e que tem aplicação direta na saúde pública. O estudo que envolve princípios ativos e proteínas de transporte sanguíneas, como a Albumina do Soro Humano (HSA), é indispensável no entendimento bioquímico da ação dos mesmos e na distribuição desses princípios pelo organismo. Através de técnicas espectroscópicas e teóricas estudou-se a interação do fármaco sulfassalazina (SSZ) com a HSA com o intuito de identificar o(s) sítio(s) preferencial(ais) e determinar a constante de associação (K_a). Os experimentos foram feitos também com a proteína Albumina do Soro Bovino (BSA), como parâmetro de comparação, já que dados na literatura apontam que o fármaco tem afinidade pelo sítio 1 de Sudlow (DS1) nas duas proteínas. Através do espectro de absorção obteve-se um K_a de $(0,81 \pm 0,02) \cdot 10^5$ L.mol⁻¹ para o sistema SSZ-HSA e um K_a de $(1,10 \pm 0,10) \cdot 10^5$ L.mol⁻¹ para o complexo SSZ-BSA. Os valores são próximos, mas diferenças no deslocamento batocrômico encontrados nos espectros de absorção denunciaram discrepância na polaridade do ambiente químico em que a SSZ está exposta nas duas proteínas. O *docking* molecular confirmou essa discrepância ao informar que no DS1 da HSA a sulfassalazina está exposta a uma vizinhança mais apolar do que a observada no DS1 da BSA. Além disso, ensaios de dicroísmo circular eletrônico (ECD) mostraram que a SSZ apresenta sinal de dicroísmo circular induzido (ICD) quando complexado em ambas as proteínas, mas que se diferem na forma e nos comprimentos de onda. Simulações TD-DFT sugerem que esse sinal é devido a uma isomeria axial que surge da interação entre o mesmo e o ambiente quiral do DS1. Tanto a técnica de absorção quanto o

ECD foram usados para realizar competição de sítio na proteína HSA. Os resultados envolvendo os competidores digitoxina, varfarina, ibuprofeno, tiroxina e mesalazina apontaram que não há afinidade pelo sítio 2 de Sudlow (DS2), mas há uma discreta afinidade pelo sítio 3 de Sudlow (DS3). O DS1 foi confirmado como sendo o sítio preferencial.

Palavras-chave: HSA, sulfassalazina, constante de associação, TD-DFT, *docking* molecular.

ABSTRACT

The study of interactions between drugs and proteins is a topic of scientific-technological interest and has direct application in public health. The study involving active ingredients and blood transport proteins, such as Human Serum Albumin (HSA), is essential in the biochemical understanding of their action and the distribution of these principles throughout the body. Using spectroscopic and theoretical techniques, the interaction of the drug sulfasalazine (SSZ) with the HSA was investigated with the aim of identifying the preferential site(s) and determining the association constant (K_a). The experiments were also carried out with the protein Bovine Serum Albumin (BSA), as a comparison parameter, since data in the literature indicate that the drug form a complex in Sudlow site 1 (DS1) for both proteins. Through the analysis spectrum, the K_a of SSZ-HSA was obtained with value $(0.81 \pm 0.02) \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ and the K_a of SSZ-BSA complex was measured as $(1.10 \pm 0.10) \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ in previous tests. The values are close, but differences in the bathochromic shift found in the absorption spectra revealed a discrepancy in the polarity of the chemical environment in which SSZ is exposed for both proteins. Molecular *docking* confirmed this discrepancy by reporting that in DS1 of HSA, SSZ is exposed to a more nonpolar environment than that observed in BSA. Furthermore, electronic circular dichroism (ECD) tests demonstrated that SSZ has an induced circular dichroism (ICD) signal when complexed with both proteins but there is a difference in signals' shape, intensity and wavelength for both albumins. TD-DFT simulations suggests that the signal itself is due to an axial isomerism that arises from the interaction between SSZ and the chiral environment of DS1. The absorption and ECD techniques were also used to perform site competition on the HSA protein. The results involving the competitors digitoxin, warfarin, ibuprofen, thyroxine and mesalazine showed that there is no affinity of SSZ for Sudlow site 2 (DS2), but there is a discrete affinity for Sudlow site 3 (DS3). The DS1 was confirmed to be the preferential site.

Keywords: HSA, sulfasalazine, association constant, TD-DFT, molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fórmula estrutural 2D da molécula de sulfassalazina. Em destaque na figura estão as moléculas de mesalazina e sulfapiridina conectadas por uma ligação azo (N=N).....	2
Figura 2- Estrutura cristalina da HSA. Em (A) encontra-se a HSA colorida por cadeia e em (B) encontra-se a mesma colorida por domínios. Fonte: Adaptada do Protein Data Bank (BHATTACHARYA et al. pdbid: 1e7a).....	5
Figura 3 - Apresentação dos sítios DS1, DS2 e FA5 encontrados no interior dos domínios IIA, IIIA e IIIB respectivamente. Destaca-se alguns fármacos encontrados nesses sítios. Fonte: Adaptado do Protein Data Bank (BHATTACHARYA et al. pdbid: 1e7a) e de GHUMAN et al, 2005.....	7
Figura 4- Representações 2D da SSZ em diferentes estados de protonação e posições aproximadas do solvente água (círculos azuis).....	55
Figura 5- Representações em 2D da SSZ em diferentes estados de protonação e posições aproximadas do solvente DMF (círculos vermelhos).....	56
Figura 6- Estrutura cristalográficas usadas no <i>docking</i> molecular. Para a proteína BSA usou-se o PDB 6qs9, com o cetoprofeno (rosa) no DS1. E para a proteína HSA, usou-se o PDB 6r7s com moléculas de SSZ (preto) nos sítios DS1 e FA5. Fonte: CASTAGNA et al, 2019 e WENSKOWSKY et al, 2021.....	61
Figura 7- Diedros seleccionados (diedro 1 e 2) para realizar a varredura (scan) considerando 36 passos que variaram 10°. Em amarelo encontra-se destacados os átomos que compõe os diedros e na legenda abaixo da SSZ encontram-se as numerações desses átomos.....	62
Figura 8- Espectro de absorbância no UV-Vis experimental da SSZ, nos solventes água e DMF. O eixo y é dado em termos de absorvidade molar e o eixo x em termos do comprimento de onda.....	64

Figura 9- Espectros teóricos e experimentais da SSZ nos solventes água e DMF. Na legenda de cada espectro teórico encontram-se entre parênteses a estrutura escolhida em função de seu estado de protonação.....	66
Figura 10- Orbitais envolvidos no espectro de absorção da SSZ em água e DMF.....	68
Figura 11- Espectro de Absorbância da SSZ (10 μ M) com adição de HSA (0-30 μ M), à esquerda, e aplicação da equação de Benesi- Hildebrand com o R^2 , à direita. Na faixa entre 250 – 300 nm encontra-se a absorbância característica da proteína.....	70
Figura 12- Espectro de Absorbância da SSZ (10 μ M) com adição de BSA (0-30 μ M), à esquerda, e aplicação da equação de Benesi- Hildebrand com o R^2 , à direita. Na faixa entre 250 – 300 nm encontra-se a absorbância característica da proteína.....	72
Figura 13- Comparação Estatística entre os valores de constante de associação apenas da sulfassalazina e da sulfassalazina na presença dos competidores de sítio (mesalazina, ibuprofeno, varfarina, digitoxina e tiroxina). O asterisco indica quais competidores alteram o K_a de forma significativa ($P < 0,05$).....	75
Figura 14- Representação 2D da SSZ com os átomos, que sofrem interações intermoleculares no <i>docking</i> , enumerados.....	78
Figura 15- <i>Redocking</i> da SSZ no DS1 da HSA, à esquerda, e superfícies de interação não covalente computadas pelo software NCIPLOT4, à direita.....	79
Figura 16- <i>docking</i> da SSZ no DS1 da BSA, à esquerda, e superfícies de interação não covalente computadas pelo software NCIPLOT4, à direita.....	81
Figura 17- Gráfico em barras e círculos concêntricos realizados com as distâncias da SSZ até os resíduos de aminoácidos do DS1 da HSA, junto da polaridade dos mesmos separadas por cor.....	85

Figura 18- Gráfico em barras e círculos concêntricos realizados com as distâncias da SSZ até os resíduos de aminoácidos do DS1 da HSA, junto da polaridade dos mesmos separadas por cor.....	86
Figura 19- Espectros <i>experimental</i> de ECD da SSZ nas proteínas HSA e BSA.....	88
Figura 20- Espectros de dicroísmo circular obtidos de cada conformação da varredura realizada nos diedros 1 e 2. Os confôrmeros estão enumerados de 1 a 36. Abaixo dos espectros encontram-se dois confômeros, de exemplo, explicitando a diferença conformacional entre as moléculas que se obtém na varredura.....	91
Figura 21- Dicroísmo circular das estruturas da SSZ provenientes do docking, na HSA e na BSA, obtidos em diferentes constante dielétricas, sendo: 78,3 (água), 37,2 (DMF), 15,1 (pentan-1-ol) e 2,4 (tolueno).....	92
Figura 22- Comparação entre os espectros experimentais e teóricos da SSZ na proteína HSA e BSA. Os eixos y estão diferentes, mas a comparação foi feita apenas com os valores de comprimento de onda encontrados no eixo x. Os valores máximos encontram-se destacados em negrito.....	94
Figura 23- Espectros de ECD da SSZ e da HSA na presença dos fármacos mesalazina (5-ASA), digitoxina (DIGIT) e tiroxina (TIROX) e ibuprofeno (IBUP).....	95
Figura 24- Espectro de ECD da SSZ e da HSA na presença de <i>varfarina</i> (<i>VARF</i>).....	96
Figura 25- Espectros teóricos da SSZ com variação dos funcionais (B3LYP, CAM-B3LYP e PBE0), variação de funções de base (6-311+G(d,p), 6-311++G(3df,2p)) e solventes água/DMF tratados de forma implícita.....	125
Figura 26- (A) Absorbância experimental e teórica da mesalazina em água e em DMF. (B) Representação 2D da distribuição dos solventes e estado de protonação usados na simulação computacional.....	126

Figura 27- Apresentação das duas formas protonadas em água, da SSZ, consideradas no cálculo de absorbância junto dos espectros obtidos.....	127
Figura 28- Apresentação das três formas protonadas em DMF, da SSZ, consideradas no cálculo de absorbância junto dos espectros obtidos.....	128
Figura 29- Gráficos da energia em função das conformações obtidas no scan.....	131
Figura 30- Em preto encontra-se a SSZ alocada na proteína HSA e, em rosa, a SSZ na proteína BSA.....	132
Figura 31- Comparação dos sinais de ECDs encontrados na varredura do diedro 1 (à esquerda) com o sinal de ECD da SSZ alocada na BSA e exposta ao solvente tolueno, tratado de forma implícita nesse caso.....	132
Figura 32- Espectro de absorção e ajuste linear do sistema SSZ + HSA com adição de mesalazina (Mesa).....	134
Figura 33- Espectro de absorção e ajuste linear do sistema SSZ + HSA com adição de ibuprofeno (Ibup).....	134
Figura 34- Espectro de absorção e ajuste linear do sistema SSZ + HSA com adição de varfarina (Varf).....	135
Figura 35- Espectro de absorção e ajuste linear do sistema SSZ + HSA com adição de digitoxina (Digit).....	135
Figura 36- Espectro de absorção e ajuste linear do sistema SSZ + HSA com adição de tiroxina (Tirox).....	136
Figura 37- Espectro de ECD das proteínas BSA e HSA medidas à concentração de 30 μ M, ambas.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constante dielétrica dos solventes Água e DMF usados no cálculo de solvente implícito da sulfassalazina.....	54
Tabela 2 - Centro, Dimensão e Spacing da caixa, em Å, construída no DS1 da HSA e da BSA para o <i>docking</i> da SSZ nas proteínas.....	60
Tabela 3 - Comparação entre os valores experimentais e teóricos dos comprimentos de onda no máximo de absorvidade da SSZ em água e DMF.....	67
Tabela 4 - Valores das constantes de associação, K_a , em $L.mol^{-1}$ do conjunto SSZ + HSA na ausência e na presença dos competidores de sítio digitoxina, ibuprofeno, mesalazina, tiroxina e varfarina.....	73
Tabela 5 - Valores calculados de energia livre de Gibbs, em kcal/mol, a partir dos valores de K_a do complexo SSZ-HSA com e sem adição de competidores.....	76
Tabela 6 - Interações não covalentes obtidas do <i>redocking</i> da SSZ no DS1 da HSA.....	80
Tabela 7 - Interações não covalentes obtidas do <i>docking</i> da SSZ no DS1 da BSA.....	82
Tabela 8 - Valores de distância, em Angstrom, do centro de massa da sulfassalazina até os resíduos de aminoácidos que compõe o DS1 das proteínas estudadas.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

5-ASA – mesalazina
μM– Micromolar
Å – Angstrom
Ala – Alanina
Arg – Argenina
ASC - Apparent Surface Charge
Asn – Asparagina
Asp – Aspartato
B3LYP – Becke, 3 parameters, Lee-Young-Parr
BSA – Bovine Serum Albumin
CAM – Coulomb- Attenuating Method
Cis ou Cys - Cisteína
DFT – Density Functional Theory
DII – Doença Inflamatória Intestinal
Digit - Digitoxina
DMF – Dimetilformamida
DMSO – Dimetilsulfóxido
DS1 – Drug Site 1
DS2 – Drug Site 2
DS3 – Drug Site 3
ECD – Eletronic Circular Dicroism
FA1 – Fatty Acid 1
FA2 - Fatty Acid 2
FA5 - Fatty Acid 5
FA6 - Fatty Acid 6
FA8 - Fatty Acid 8
Fen ou Phe - Fenilalanina
Gli ou Gly – Glicina
Glu – Glutamato
Gln - Glutamina
GTO – Gaussina-Type Orbital
HF – Hartree Fock

His – Histidina
HOMO – Highest Occupied Molecular Orbital
HSA – Human Serum Albumin
Ibup - Ibuprofeno
IFN- γ – Interferon Gamma
IL-1 – Interleucina 1
IL-2 – Interleucina 2
IL-6 – Interleucina 6
Ile - Isoleucina
Ka – constante de associação
L1 – Ligante 1
L2 – Ligante 2
LCAO - Linear Combination of Atomic Orbitals
Leu – Leucina
Lis ou Lys – Lisina
Met - Metionina
NCI – Non Covalent Interactions
PBE0 – Perdew-Burke-Ernzerhof
PCM - Polarisable Continuum Model
PDB – Protein Data Bank
PPAR- γ - Proliferadores de Peroxissoma Gamma
Pro – Prolina
SCF - Self-Consistent Field
Ser – Serina
SP – Sulfapiridina
SSZ – sulfassalazina
STO – Slater- Type Orbital
TD-DFT - Time Dependent Density Functional Theory
Tir ou Tyr – Tirosina
Tirox - Tiroxina
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa
Tre ou Thr - Treonina
Trp – Triptofano
UV-Vis – Ultravioleta e no Visível

Val – Valina

Varf - Varfarina

VMD – Visual Molecular Dynamics

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	8
2.1. A complexação entre ligante e proteína: o reconhecimento molecular.....	8
2.2. Determinação do sítio onde ocorre o reconhecimento molecular.....	10
2.3. Entendendo a interação fármaco-proteína numa abordagem teórica.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivos Gerais.....	14
3.2. Objetivos Específicos.....	14
4. METODOLOGIA.....	15
4.1. Metodologia Experimental.....	15
4.1.1. Espectrofotometria de Absorção (UV-Vis).....	16
4.1.2. Dicroísmo Circular Eletrônico (ECD).....	17
4.2. Metodologia Teórica.....	18
4.2.1. A Teoria do Funcional da Densidade.....	22
4.2.2. O <i>Docking</i> Molecular com uso do software Autodock Vina.....	44
4.2.3. Análise de Interações Não- Covalentes pelo software NCIPLLOT4.....	47
5. MATERIAIS, INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS.....	50
5.1. Materiais e Instrumentos.....	50
5.1.1. Reagentes.....	50
5.1.2. Preparo das Soluções.....	50
5.1.3. Instrumentos.....	51
5.2. Procedimentos.....	53
5.2.1. Obtenção do espectro de absorção, na faixa do UV-Vis, da SSZ em água e em dimetilformamida (DMF).....	53

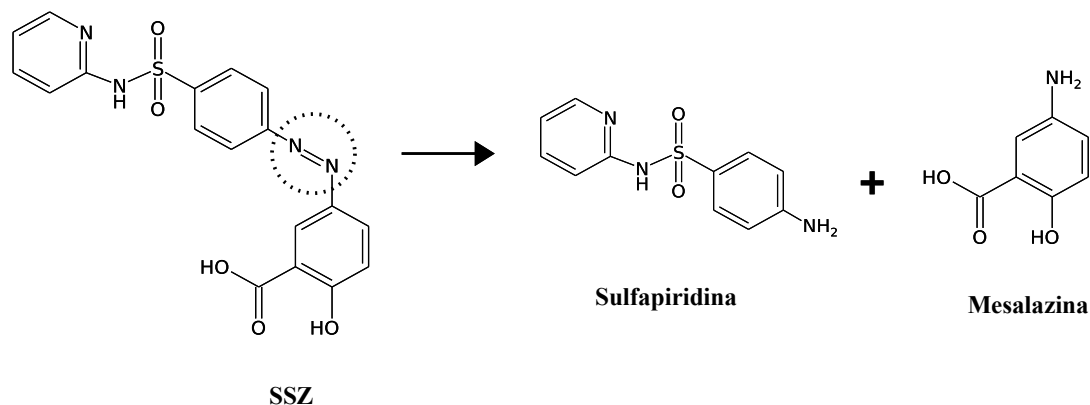
5.2.2. Determinação da constante de associação (K_a), por absorbância, da SSZ na HSA e na BSA.....	56
5.2.3. Ensaios de competição de sítio na HSA, por absorbância, entre a SSZ e os fármacos: ibuprofeno, varfarina, digitoxina, tiroxina e mesalazina.....	57
5.2.4. Teste estatístico para comparar os resultados da constante de associação da SSZ e HSA, na presença dos competidores.....	58
5.2.5. Determinação da energia livre de Gibbs do complexo SSZ + HSA, na presença e ausência de competidores, através do valor de K_a	59
5.2.6. <i>Docking</i> molecular e análise de interações não covalente.....	59
5.2.7. Obtenção do espectro de dicroísmo circular eletrônico do fármaco SSZ na ausência e na presença das proteínas HSA e BSA.....	62
5.2.8. Ensaios de competição de sítio na HSA, por dicroísmo circular eletrônico, entre a SSZ e os fármacos: ibuprofeno, varfarina, digitoxina, tiroxina e mesalazina.....	63
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
6.1. Obtenção do espectro de absorção, na faixa do UV-Vis, da SSZ em água e em dimetilformamida (DMF).....	64
6.2. Determinação da constante de associação (K_a), por absorbância, da SSZ na HSA e na BSA.....	69
6.3. Ensaios de competição de sítio na HSA, por absorbância, entre a SSZ e os fármacos: ibuprofeno, varfarina, digitoxina, tiroxina e mesalazina.....	73
6.4. Teste estatístico para comparar os resultados da constante de associação da SSZ e HSA, na presença dos competidores.....	75
6.5. Determinação da energia livre de Gibbs do complexo SSZ + HSA, na presença e ausência de competidores, através do valor de K_a	76
6.6. <i>Docking</i> molecular e análise de interações não covalente.....	77

6.7. Obtenção do espectro de dicroísmo circular eletrônico do fármaco SSZ na ausência e na presença das proteínas HSA e BSA.....	87
7. CONCLUSÃO.....	98
Referências Bibliográficas.....	100
ANEXO A.....	125
ANEXO B.....	134

1. INTRODUÇÃO

No ano de 1937 na Suécia, Nanna Svartz assumia a cadeira de professora de medicina do Instituto Karolinska (WOLLHEIM, 2017). Especialista em doenças reumáticas e do trato digestivo, a primeira mulher em seu cargo acreditava que as doenças ulcerativas do intestino eram causadas por infecções de bactérias do gênero estreptococos. Pensando nisso a médica formulou, junto ao químico Philip Willsted, a molécula de sulfassalazina (SSZ) que é a junção do antibiótico Sulfapiridina com o ácido 5-amino-2-hidroxibenzóico (5-ASA), através de uma ligação azo (CAPRILLI et al, 2009). Diferentes de muitas drogas, a SSZ (Figura 1) foi arquitetada para se obter em uma única molécula as propriedades terapêuticas das sulfonamidas e dos aminossalicilatos para o tratamento de inflamações. Os experimentos realizados por Svartz incluíram pacientes com artrite reumatóide e pacientes com colite ulcerativa. Até os dias de hoje, a sulfassalazina faz parte do arsenal farmacêutico para o tratamento dessas doenças (NEUMANN et al, 1984; CAPRILLI et al, 2009; WATKINSON, 1986).

Figura 1- Fórmula estrutural 2D da molécula de sulfassalazina. Em destaque na figura estão as moléculas de mesalazina e sulfapiridina conectadas por uma ligação azo (N=N).



Além disso, ao longo dos 80 anos subsequentes à sua síntese, a sulfassalazina mostrou-se eficiente em uma série de doenças autoimunes tais como a psoríase e a urticária crônica idiopática (GUPTA et al, 1990; MARTINS et al, 2005).

Ao ser administrada oralmente, a SSZ alcança as porções altas do intestino onde sofre clivagem da ligação azo, através de azo-redutases bacterianas, separando-se em sulfapiridina (SP) e mesalazina (5-ASA). A redução de ligações duplas entre átomos de nitrogênio, por ação da microflora intestinal, tem se mostrado o principal metabolismo de diversos compostos que possuem grupo azo em sua estrutura (DAS et al, 1976; RYAN, 2017). Menos de 30% da SSZ absorvida nas vísceras permanece intacta, sendo que sua biodisponibilidade na forma íntegra é cerca de 10% (SMEDEGARD et al, 1995).

Seu mecanismo de ação é complexo. Em termos de ação anti-inflamatória, a molécula inibe fortemente o funcionamento das prostaglandinas. Ela também é responsável por modular o sistema imunológico através da inibição da produção das citocinas Interleucina

2 (IL-2), Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6), Interferon gamma (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). Essas citocinas são polipeptídios pró-inflamatórios, portanto, sua inibição resulta na diminuição da inflamação (SMEDEGARD et al, 1995; SALH et al, 2002).

Apesar da extensa função da SSZ, cerca de 50% dos pacientes medicados apresentam efeitos colaterais como náuseas, cefaleias e cólicas atribuídas a porção SP da molécula (CUNLIFFE et al, 2002; DESREUMAUX et al, 2006). Por esse motivo, a 5-ASA isolada é muitas vezes preferida, ao invés da SSZ, principalmente no que diz respeito ao tratamento de DIIs. A 5-ASA também ajuda a prevenir o desenvolvimento de câncer colorretal em pacientes que sofrem de colite ulcerativa (HERFARTH, 2012; BEZZIO, et al, 2017).

O mecanismo de ação da sulfassalazina e mesalazina já é muito mais compreendido nos dias de hoje do que quando essas drogas foram sintetizadas e testadas.

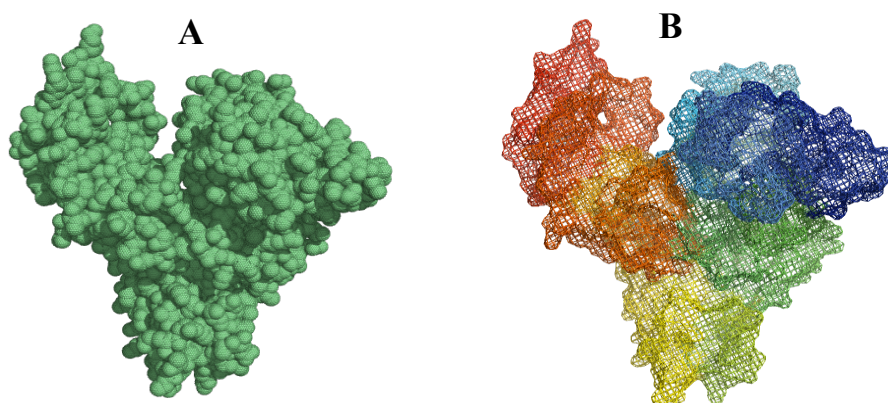
Porém, o entendimento do caminho que um fármaco percorre até alcançar seu alvo e as substâncias biológicas as quais os mesmos serão expostos, uma vez dentro do organismo, também devem ser levados em consideração. Ao serem absorvidos, os princípios ativos chegam ao sangue onde encontram uma série de biocompostos dissolvidos. As condições biológicas favorecem o reconhecimento molecular entre macromoléculas, como as proteínas, e pequenas moléculas, como os fármacos, que apresentam alta especificidade e afinidade entre si. A interação resulta na formação de complexos que interferem diretamente na fração de fármacos livres no organismo e, portanto, na farmacocinética dos mesmos (JANIN, 1995; DU et al, 2016; CHANDEL et al, 2018).

Uma das macromoléculas que possui afinidade com diversos fármacos e pequenas moléculas no organismo é a Albumina do Soro Humano (*Human Serum Albumin*, em inglês, HSA). Localizada no plasma sanguíneo e pertencente à família das albuminas, a HSA (Figura 2) é responsável pelo transporte e armazenamento de compostos endógenos e exógenos, bem como por manter a pressão oncótica do sangue. Suas funções são desempenhadas com bastante eficácia devido a sua alta solubilidade em água, ao seu baixo valor de ponto isoeletrico ($pI= 4,7$) e ao seu interior apolar que abriga uma série de moléculas hidrofóbicas (AL-HARTHI et al, 2019; WIIG et al, 2003; GHUMAN et al, 2005).

Na literatura existem inúmeros estudos que comprovam a interação entre a HSA e diversos fármacos como o anti-inflamatório ibuprofeno, o hormônio tiroxina, o anestésico propofol e até mesmo com a molécula de SSZ (GHUMAN et al, 2005; PEPTITPAS et al, 2003; BHATTACHARYA et al., 2000; WENSKOWSKY et al, 2020).

A HSA é constituída por 585 resíduos de aminoácidos, possui 35 resíduos de cisteína, que formam 17 ligações dissulfeto, responsáveis por sua estabilidade e por seu formato globular. Em 1934 Leslie Frank Hewitt obteve a cristalização da HSA e mais tarde, em 1975, sua estrutura primária foi deduzida juntamente com a caracterização de seus sítios de interação com fármacos, por Sudlow e colaboradores (CARTER et al., 1989; HEWITT, 1936; SUDLOW et al., 1975).

Figura 2- Estrutura cristalina da HSA. Em (A) encontra-se a HSA colorida por cadeia e em (B) encontra-se a mesma colorida por domínios. Fonte: Adaptada do Protein Data Bank (BHATTACHARYA et al. pdbid: 1e7a).



A HSA é dividida em três domínios (I, II e III) onde cada um compreende dois subdomínios: A e B (Figura 3). No subdomínio IIA localiza-se o sítio 1 de drogas de Sudlow (*Drug Site 1*, em inglês, DS1); no subdomínio IIIA localiza-se o sítio 2 de drogas de Sudlow (*Drug Site 2*, em inglês, DS2) e no subdomínio IB localiza-se o sítio 3 de drogas de Sudlow (*Drug Site 3*, em inglês, DS3) (SUDLOW et al, 1975; YOGUIM et al., 2022). Além da divisão por sítios que interagem com fármacos, a proteína também é dividida em sítios onde localizam-se os ácidos graxos. No total são nove sítios de ácidos graxos dos quais destaca-se o subdomínio IIIB, sítio 5 dos ácidos graxos (*fatty acid 5*, em inglês, FA5), região fora da classificação de Sudlow, porém onde se encontra uma série de fármacos como a tiroxina, mencionada anteriormente, e a SSZ (BHATTACHARYA et al, 2000; WENSKOWSKY et al, 2020).

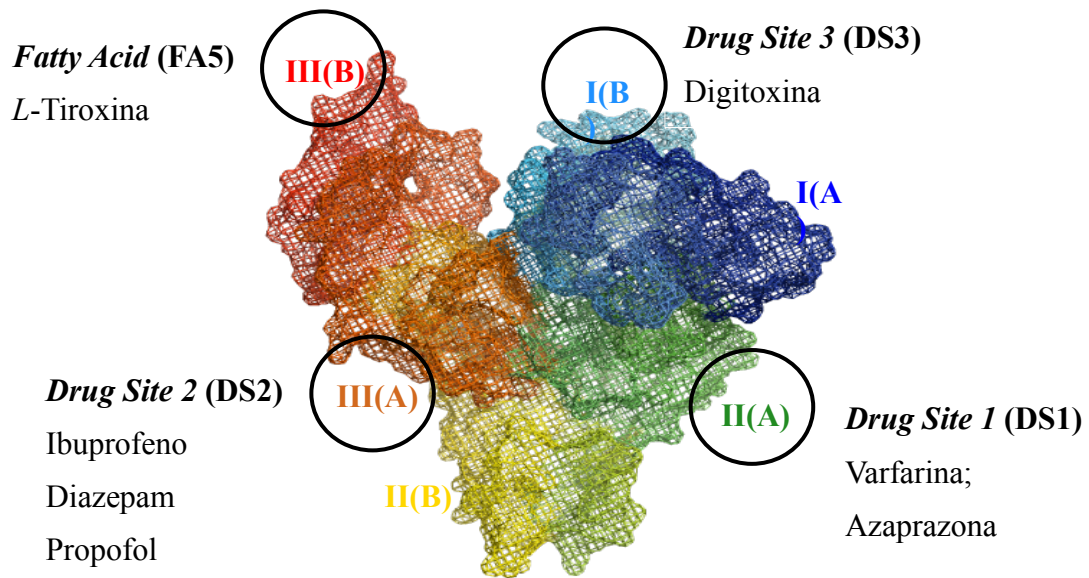
A SSZ, no entanto, encontra-se também em outros sítios na HSA. Na estrutura cristalográfica obtida por Wenskowsky e colaboradores temos a presença da sulfassalazina no sítio 1 de Sudlow (DS1), no sítio 5 dos ácidos graxos (FA5) e em uma região que compreende o intervalo entre o FA5 e o sítio 2 de Sudlow (DS2). Além deste dado cristalográfico, ensaios de fluorescência envolvendo o fármaco e a HSA sugerem que há uma preferência da SSZ pelo sítio 1 de Sudlow (WENSKOWSKY et al, 2020; RÓWNICKA-ZUBIK et al, 2008).

O DS1 de Sudlow (Figura 3) é uma grande cavidade composta predominantemente de resíduos apolares de aminoácidos e com dois agregados de aminoácidos polares encontrados na entrada e no fundo da cavidade. Na entrada da cavidade há o agregado polar composto por: Lys195, Lys199, Arg218 e Arg222. No fundo da cavidade encontra-se o agregado polar composto por Tyr150, His242 e Arg257. Além disso, o DS1 é o local onde tem-se nas proximidades o único resíduo de Triptofano da HSA, o Trp214 (FANALI et al, 2012; AL-HARTHI et al, 2019).

O sítio DS2 (Figura 3) possui menor tamanho, em relação ao DS1, e também é em sua maior parte apolar, apresentando apenas um agregado polar de aminoácidos na sua entrada que inclui Arg410, Tyr411, Lys414 e Ser489. Estudos de fluorescência sobre o sistema HSA e a molécula de 5-ASA sugerem que o mesmo possui preferência pelo DS2 (CUI et al, 2003).

O FA5 (Figura 3) é uma região comum para ácidos graxos. Os principais aminoácidos desse sítio são Thr508, Lys524 e Lys525 (ASCENZI et al, 2016).

Figura 3 - Apresentação dos sítios DS1, DS2 e FA5 encontrados no interior dos domínios IIA, IIIA e IIIB respectivamente. Destaca-se alguns fármacos encontrados nesses sítios. Fonte: Adaptado do Protein Data Bank (BHATTACHARYA et al. pdbid: 1e7a) e de GHUMAN et al, 2005.



2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. A complexação entre ligante e proteína: o reconhecimento molecular

O reconhecimento molecular é o nome que se dá para a interação específica entre duas ou mais espécies químicas. Nos sistemas biológicos o reconhecimento molecular desempenha papel essencial nas atividades metabólicas, pois envolve interações proteína-proteína, DNA-proteína, RNA-ribossomo, ligante-proteína, entre outras. Para que o reconhecimento aconteça é necessário que as moléculas envolvidas tenham complementariedade molecular, ou seja, que interajam de forma a favorecer a complexação entre elas. O favorecimento da complexação é justificado na presença de ligações intermoleculares como forças de van der Waals, interações π , interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio (GELLMAN, 1997; BARON et al, 2013).

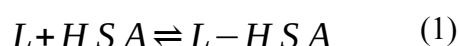
No caso de proteínas como a HSA, que apresenta sítios de ligação, o tamanho desses sítios é um fator determinante no reconhecimento molecular uma vez que um ligante muito grande e um sítio muito pequeno resultam em impedimento estérico. Já no caso do ligante sua conformação apresenta papel fundamental, uma vez que a disposição de seus átomos ou até mesmo a presença de cargas pode gerar repulsão entre os aminoácidos do sítio, mesmo que seu tamanho seja adequado (KNOX, 1990).

Também é interessante ressaltar que a HSA apresenta um interior predominantemente apolar, e um exterior polar presente no plasma sanguíneo (BERTOZO, 2021). Os ligantes que se alocam em seus sítios estão sujeitos a um ambiente mais hidrofóbico do que se não estivessem complexados. Como a polaridade de um meio altera

significativamente as propriedades eletrônicas das moléculas, ela pode ser usada para avaliar qualitativamente se ocorre ou não reconhecimento molecular entre o ligante e a proteína.

Geralmente, quando uma molécula está exposta a um meio/solvente apolar ela absorve radiação em um comprimento de onda maior do que quando está em um ambiente polar. Através de técnicas como a absorção na região do ultravioleta e do visível do espectro eletromagnético (UV-Vis) pode-se avaliar o comportamento do comprimento de onda de máxima absorção, de um ligante na ausência e presença da proteína (BERTOZO, 2021; DE SOUZA et al, 2019; DE SOUZA et al, 2016).

Também é possível quantificar essa interação, quando houver, através da constante de associação (K_a). A constante representa o equilíbrio entre o complexo ligante-proteína e quanto maior seu valor, maior afinidade existe entre as espécies envolvidas (COX et al, 2012). Podemos representar essa interação a partir da equação química abaixo:



De forma que definimos o K_a como sendo $K_a = \frac{[L-HSA]}{[L][HSA]}$. Os símbolos [L-HSA], [L] e [HSA] representam a concentração do complexo entre proteína e ligante, a concentração de ligante e a concentração de proteína HSA, respectivamente.

A afinidade entre um fármaco e uma proteína interfere significativamente em sua farmacocinética, uma vez que a função biológica de um princípio ativo depende de sua fração livre (GHUMAN et al, 2005).

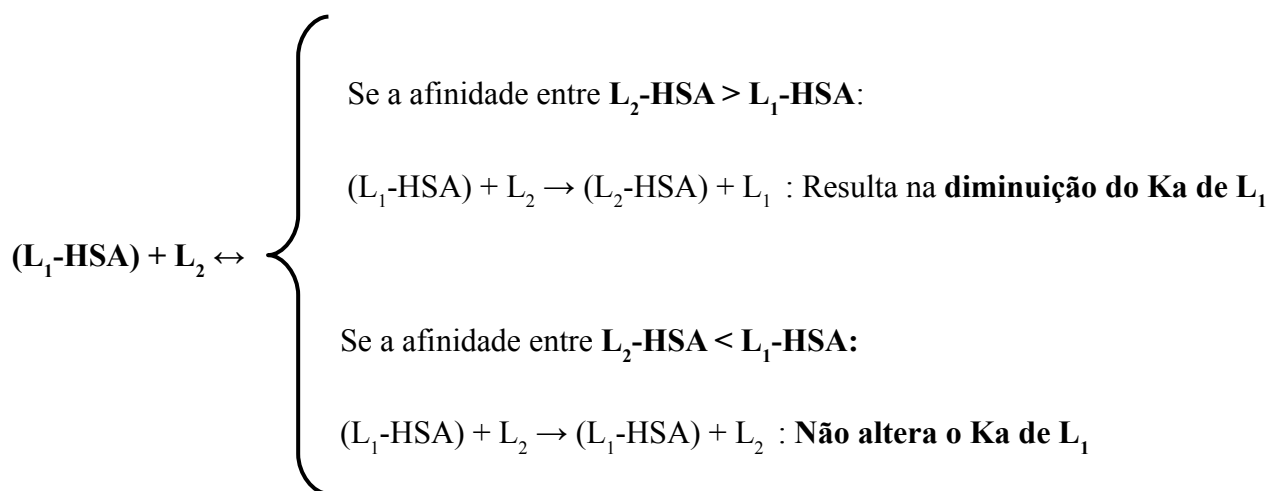
2.2. Determinação do sítio onde ocorre o reconhecimento molecular

Na seção anterior foi apresentado o mecanismo de reconhecimento molecular que justifica a presença de moléculas pequenas nos sítios de ligação de proteínas. Apesar das interações entre fármaco e proteína serem seletivas, isso não significa que ela ocorra em apenas um sítio proteico. Como mostrado anteriormente, uma estrutura cristalográfica obtida por Wenskowsky e colaboradores contendo a HSA e o fármaco SSZ mostrou que o mesmo pode ser encontrado em três sítios diferentes (WENSKOWSKY et al, 2020).

Na literatura encontram-se registrados cerca de 250 fármacos que possuem interação com a HSA e são transportados através do sistema circulatório (AL-HARTHI et al, 2019). Apesar de existir características estruturais dos ligantes que favoreçam a preferência por um determinado sítio, só é possível determinar adequadamente o(s) sítio(s) de ligação através da experimentação (BERTOZO, 2021; ZSILA et al, 2011).

A associação de um fármaco a um sítio pode ser afetada se houver no meio outro ligante presente. Se ambos os ligantes possuírem afinidade pelo mesmo sítio, ocorre competição entre eles, de forma que suas constantes de associação serão afetadas. Na competição, um fármaco alocado no sítio é deslocado para fora do mesmo de forma que outro, com maior afinidade do que o anterior, possa ali se alocar. Se as afinidades desses ligantes forem por sítios diferentes, então não ocorre competição. Porém, como a presença de um ligante em um sítio de ligação proteico pode provocar alterações estruturais na

macromolécula, de forma geral, um ligante pode aumentar a eficiência de complexação do outro, aumentando seu Ka. Esse fenômeno chama-se efeito alostérico (SZKUDLAREK et al, 2020; RANDAD et al, 1991; UCHIDA et al, 1998). Esquematicamente temos, considerando um mesmo sítio:



Onde L₁ é o ligante 1, L₂ é o ligante 2, HSA é a proteína e L₁-HSA, L₂-HSA e L₁-HSA-L₂ representam os complexos com L1 e L2, respectivamente.

Existem diversos fármacos que possuem afinidade comprovada por determinados sítios e que podem ser usados para avaliar, através da dinâmica mostrada no esquema acima, a qual sítio um ligante em estudo se aloca preferencialmente. Pode-se citar como competidores de sítio DS1 a azapropazona, oxifenilbutazona, fenilbutazona, varfarina, entre outros (GHUMAN et al, 2005; BARONI et al, 2001). Como competidores de sítio DS2 o diflunisal, o ibuprofeno, diazepam, propofol, entre outros (GHUMAN et al, 2005; YANG et al, 2013; BHATTACHARYA et al, 2000). Como competidor de sítio 3 a digitoxina (TILLEMENT et al,

1980; YAMASAKI et al, 1996; HAGE et al, 1998; HASHEMPOUR et al, 2020) e como competidor de sítio FA5 e DS1 a tiroxina (PETITPAS et al, 2002; MURPHY et al, 1964).

Inúmeras técnicas experimentais podem ser usadas para determinar o sítio de ligação em uma proteína, tais como os espectros de absorção UV-Vis, espectro de fluorescência, a diálise de equilíbrio, o dicroísmo circular eletrônico, entre outras. Równicka-Zubick e colaboradores realizaram estudos de fluorescência com a molécula de SSZ e a HSA a fim de determinar a constante de associação entre ambas na presença de fatores de desnaturação. O K_a encontrado para o sistema SSZ-HSA, obtido através do espectro de fluorescência, foi de $3,4 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}$ e estudos de *quenching* apontaram que a SSZ interage com o aminoácido Trp214 localizado nas proximidades do sítio 1 (RÓWNICKA-ZUBICK et al, 2008). Adicionalmente, a cristalização da HSA na presença da SSZ realizada por Wenskowsky e colaboradores mostra a presença do fármaco nos sítios DS1, FA5 e em uma região intermediária entre o sítio DS2 e sítio FA5 (WENSKOWSKY et al., 2020). Também foram realizados estudos de constante de associação com a 5-ASA e a HSA por Cui e colaboradores (CUI et al, 2003). A técnica usada para a determinação da constante também foi a de fluorescência. O resultado de K_a obtido foi, na temperatura de 26°C, igual a $3,6 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$. Shahabadi e Fili realizaram competição de sítio entre a 5-ASA e a Albumina do Soro Bovina (*Bovine Serum Albumin*, em inglês, BSA), apontando para preferência do fármaco ao sítio DS2 (SHAHABADI et al, 2014). A BSA possui inúmeras semelhanças com a HSA, de forma que a diferença mais significativa é que a HSA possui apenas um triptofano (Trp214) enquanto a BSA possui dois resíduos de triptofano (Trp134 e Trp 213). Sendo assim, a BSA é

muitas vezes usada ao invés de HSA para estudos farmacológicos devido ao seu menor custo (ROY et al, 2016; KSENOFONTOV et al, 2021).

2.3. Entendendo a interação fármaco-proteína numa abordagem teórica

Como foi mostrado anteriormente, é razoavelmente acessível realizar estudos experimentais que comprovem a existência da interação entre ligante e uma proteína, bem como determinar em qual(ais) sítio(s) o mesmo tem preferência. Mas, os sítios da HSA apresentam uma série de resíduos de aminoácidos e identificar quais deles interagem com o ligante, e de qual natureza é essa interação, não é trivial de se realizar em laboratório. É necessário realizar uma cristalização da proteína, na presença de ligante, seguida de difratometria de raio-x, por exemplo (BARCELOS et al, 2008; BLUNDELL, 2017). No banco de dados Protein Data Bank (PDB) uma série de coordenadas cristalográficas da HSA com ligantes foram obtidos através dessa técnica (DUTTA et al, 2005; BRITO, 2011). A disponibilidade dessas informações permite realizar estudos teóricos de *docking* molecular para se ter uma visão aproximada dos aminoácidos mais prováveis de interagirem com o ligante de interesse no sítio determinado (BRITO, 2011). Além disso, a realização de simulações computacionais em nível da Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT) podem auxiliar na interpretação dos resultados espectroscópicos e na elucidação dos fenômenos observados em laboratório.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Estudar as interações entre o fármaco SSZ e a proteína HSA através de técnicas experimentais e teóricas, numa abordagem complementar.

3.2. Objetivos Específicos

Determinar o sítio de ligação através do cálculo de K_a da SSZ e HSA e análise de espectros de UV-Vis e ECD.

Aplicar métodos teóricos como a TD –DFT a fim de interpretar os espectros experimentais obtidos do fármaco.

Realizar o *docking* molecular e a análise das interações não covalentes para compreensão dos mecanismos químicos por trás da complexação entre fármaco e proteína.

4. METODOLOGIA

4.1. Metodologia Experimental

A escolha das técnicas experimentais aplicadas no estudo de um determinado sistema depende diretamente das características deste. A espectrofotometria é muito útil no entendimento da estrutura eletrônica molecular e é facilmente aplicada a moléculas que possuem elétrons que ocupam níveis energéticos cujo comprimento de onda de excitação e/ou emissão possam ser facilmente produzidos e/ou detectados por equipamentos mais acessíveis. Insaturações e pares de elétrons não ligantes são exemplos que sofrem excitação em comprimentos de onda na faixa do Ultravioleta e do Visível (SKOOG et al, 2007). As moléculas de interesse neste estudo: SSZ e HSA, possuem esses cromóforos e, portanto, absorvem na faixa do UV-Vis.

Outra técnica espectroscópica para estudo eletrônico é o Dicroísmo Circular Eletrônico (ECD, do inglês *Electronic Circular Dichroism*), onde visualiza-se centros quirais e seus enantiômeros (moléculas não sobreponíveis) baseado no desvio da luz circularmente polarizada. Quando um ligante se complexa com uma proteína, ele pode apresentar um centro quiral induzido pelo ambiente proteico, mesmo que na sua forma livre ele não tenha átomos quirais. Isso chama-se quiralidade induzida e é muito observada em fármacos que interagem com proteínas (AUTSCHBACH et al, 2002; SOUZA et al, 2019).

4.1.1. Espectrofotometria de Absorção (UV-Vis)

Quando fótons interagem com a matéria uma série de eventos podem ocorrer. Algumas das interações levam a processos atômicos e/ou moleculares envolvendo níveis vibracionais, rotacionais e/ou eletrônicos (BALL, 2001).

A radiação na região do ultravioleta e do visível é a faixa do espectro eletromagnético que compreende os comprimentos de onda no intervalo de 185 a 400 nm e, 400 a 700 nm, respectivamente. A interação com a matéria pode provocar a excitação de elétrons, na espécie química, promovendo sua transição do orbital ocupado de mais alta energia (*Highest Occupied Molecular Orbital*, HOMO) para o orbital molecular desocupado de menor energia (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, LUMO): $E_{HOMO} \rightarrow E_{LUMO}$ (BALL, 2001).

As transições mais observadas são aquelas que envolvem elétrons: $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $\sigma \rightarrow \pi^*$, $\sigma \rightarrow \sigma^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$. O tipo da transição está diretamente relacionado com os níveis de energia, e portanto, com o comprimento de onda de absorção (SKOOG et al, 2009).

O quanto uma amostra pode absorver está relacionado com sua concentração (c), com sua absortividade molar (ϵ) e com o comprimento da cubeta na qual a solução se encontra (caminho óptico, d). Essa relação resulta na medida quantitativa da absorbância (A) denominada de Lei de Lambert-Beer (SKOOG et al, 2007):

$$A = cd\epsilon \quad (2)$$

Os espectros são curvas de absorbância em função do comprimento de onda (SKOOG et al, 2007).

Como descrito anteriormente, o meio em que a amostra se encontra influi diretamente no seu espectro. A polaridade pode provocar deslocamentos no comprimento de onda máximo ou na intensidade da absorbância. Quando um meio, podendo ser um solvente, desloca o espectro para comprimento de ondas maiores, chama-se efeito batocrômico ou deslocamento para o vermelho. Quando desloca para comprimento de onda menores, chama-se efeito hipsocrômico ou deslocamento para o azul. Se aumenta a intensidade de absorção chama-se efeito hiperocrômico e se diminui a absorbância, chama-se efeito hipocrômico (DAMASCENO, 2015). Esses efeitos ocorrem por conta de interações entre o soluto e o solvente, estando por vezes relacionados ao estabelecimento de forças intermoleculares entre eles.

4.1.2. Dicroísmo Circular Eletrônico (ECD)

Quando a luz circularmente polarizada interage com uma molécula quiral ela sofre um desvio para a direita ou para a esquerda. Se o comprimento de onda da luz encontra-se na faixa do Ultravioleta e no Visível, diz-se que a técnica se trata de ECD, uma vez que ele provoca transições eletrônicas (AUTSCHBACH et al, 2002).

A intensidade do sinal do ECD é determinada por uma grandeza denominada força rotatória (R) que depende do momento de dipolo elétrico e de dipolo magnético. O espectro é dado pela absortividade da molécula em função do comprimento de onda. A absortividade, por sua vez, é dada pela subtração da absortividade relacionada ao desvio para a esquerda pela absortividade relacionada com o desvio para a direita (WARNKE, et al 2011):

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{esquerda}} - \varepsilon_{\text{direita}} \quad (3)$$

4.2. Metodologia Teórica

No ano de 1900 o físico alemão Max Planck propôs uma forma de resolver o problema da radiação do corpo negro que se tornou o pilar do que mais adiante seria a Mecânica Quântica. O Corpo negro é um objeto hipotético proposto por Gustav Robert Kirchhoff, em 1862, que absorve toda a radiação que nele incide sem preferências por frequências específicas (RIBEIRO, 2015; PLANCK, 1901). Durante anos, os físicos tentaram encontrar uma equação matemática que descrevesse corretamente a forma que um corpo negro imite radiação conforme sua temperatura é aumentada. Wilhelm Wien foi o primeiro a propor uma função matemática, porém sua distribuição de energia era aceitável apenas em comprimentos de ondas maiores. Lord Rayleigh e James Jeans tentaram adequar a equação, mas só conseguiram uma distribuição de energia aceitável em comprimentos de onda curtos (HOUSE, 2003).

Planck, então, sugeriu que para se obter a correta distribuição de energia emitida por um corpo negro, a mesma deveria ser quantizada. Ou seja, a energia emitida não poderia assumir qualquer valor e teria magnitude proporcional a uma constante que ficou conhecida como *constante de Planck* (h). Uma vez que a energia provém de uma onda eletromagnética, a constante de Planck é a relação entre a energia e a frequência da onda emitida (PLANCK, 1901):

$$E=h\cdot\nu \quad (4)$$

Em 1905, Einstein aplicou a ideia de quantização de Planck para explicar o fenômeno do efeito fotoelétrico e introduziu o conceito de que a luz também tem uma quantidade de energia quantizada (EINSTEIN, 1905). O comportamento dualístico da luz, como onda e partícula, estudado por Einstein inspirou Louis de Broglie a propor que todas as partículas possuem comportamento dual. Em sua tese de doutorado o físico francês apresentou uma fórmula que unia a fórmula (4) com a fórmula de energia proposta por Einstein (BOHR, 1913; DE BROGLIE, 1925):

$$h\cdot\nu=m\cdot c^2 \quad (5)$$

Em que m é a massa e c é a velocidade da luz no vácuo.

Dois anos depois da tese de de Broglie, os cientistas Clinton Joseph Davisson e Lester Germer comprovaram experimentalmente que elétrons possuíam caráter ondulatório após um experimento onde os mesmos sofreram difração ao coincidirem com um alvo de níquel (DAVISSON et al, 1927). Foi baseado nisso que Erwin Schrödinger propôs uma abordagem ondulatória do elétron, expressa como uma função de onda responsável por

descrever toda e qualquer informação de um sistema. A operação de um Hamiltoniano sobre a função de onda ψ corresponde à energia total do sistema observado (SCHRÖDINGER, 1926; PAULING et al, 1935).

$$\Psi(s,t) \quad (6)$$

$$\frac{-h}{2\pi i} \frac{d\Psi}{dt} = \hat{H} \Psi \quad (7)$$

s é a componente espacial, t é a componente temporal, h é a constante de Planck, e i é a unidade imaginária $i = \sqrt{-1}$.

O Hamiltoniano que opera sobre a função de onda, considerando um sistema de pares nucleares e eletrônicos é (PANSINI, 2013; SANTRA, 2010):

$$\hat{H} = -\sum_{A=1}^M \frac{1}{2m_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} - \sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (8)$$

A e B são os núcleos; i e j são os elétrons.

O primeiro termo da equação é a energia cinética dos núcleos, o segundo termo é a energia cinética dos elétrons, o terceiro termo é a repulsão entre os núcleos, o quarto termo é a atração entre núcleo e elétron, e o quinto termo é a repulsão entre os elétrons.

A função de onda, junto das contribuições de Heisenberg e Eckart, é a base de toda a Mecânica Quântica e leva o elétron como protagonista de grande parte do modelo (HEISENBERG, 1925; ECKART, 1926). Na equação mostrada em (6) e (7) temos a função de onda sofrendo transformações através de operadores matemáticos, sendo que seu quadrado representa a probabilidade de se encontrar o elétron em uma determinada região do espaço tridimensional que recebe o nome de orbital (PAULING et al, 1935):

$$|\Psi(s, t)|^2 \quad (9)$$

A resolução da função de onda formal é complexa e torna-se progressivamente mais complicada conforme o número de elétrons e de átomos envolvidos no sistema aumentam. Porém, aproximações foram feitas ao longo dos anos para que fosse possível obter soluções satisfatórias. Uma aproximação muito usada é a de desconsiderar o termo temporal na função *psi*, assim tem-se a equação de Schrödinger independente do tempo (PAULING et al, 1935):

$$\hat{H} \Psi = E \Psi \quad (10)$$

Outra aproximação é a proposta por Max Born e Robert Oppenheimer, em 1927, onde assume-se que o movimento nuclear é praticamente inexistente em relação ao movimento eletrônico, uma vez que a massa dos núcleos é muito maior do que a dos elétrons. Logo, a contribuição nuclear na energia cinética do sistema é desconsiderada, bem como a energia de repulsão núcleo-núcleo (BORN et al, 1927). Isso simplifica o hamiltoniano de forma que temos (SANTRA, 2010):

$$H = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{R_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (11)$$

O primeiro termo após a igualdade é a energia cinética eletrônica, o segundo é a energia de atração entre elétron e núcleo e o terceiro termo é a energia de repulsão elétron - elétron. Também temos que m é a massa do elétron, Z é o número de prótons, R_{iA} é a distância elétron-núcleo, e é a carga do elétron e r_{ij} é a distância elétron- elétron.

4.2.1. A Teoria do Funcional da Densidade

- **Hartree-Fock**

Existem inúmeros métodos computacionais de resolução do hamiltoniano eletrônico na química. Alguns desses métodos usam diversas considerações clássicas e valores experimentais para simplificar o cálculo e acelerar a obtenção do resultado. Os métodos mais rigorosos de cálculo quântico, denominados *ab initio*, dispensam a incorporação de resultados experimentais usando apenas primeiros princípios. Um método *ab initio* muito importante é o método Hartree- Fock.

Um ano após o desenvolvimento da função de onda eletrônica de Schrödinger, Douglas Hartree introduziu uma forma de resolver a função de onda independente do tempo, e encontrar a energia de um sistema quântico, que ele mesmo chamou de método de campo autoconsistente (*Self-Consistent Field*, SCF) (HARTREE, 1928). No entanto, em 1930 Vladimir Fock e John Slater demonstraram, de forma independente, que o método de Hartree desrespeitava o princípio da antissimetria da função de onda (SLATER, 1928; SLATER, 1930; FOCK, 1930). A antissimetria da função de onda é a impossibilidade de se distinguir partículas idênticas (como por exemplo os pares eletrônicos de spin opostos) umas das outras (BACH, 1990; BACH, 1993). Como a mecânica quântica é probabilística, a antissimetria não deve ser negligenciada.

Dessa forma, em 1935, Hartree reformulou seu método o qual passou a ser chamado de método Hartree-Fock (HARTREE et al, 1935).

No método Hartree- Fock, o termo da repulsão eletrônica demonstrados na equação (11) é reescrito sem ser necessariamente resolvido, uma vez que ele é de difícil resolução analítica. A função de onda atômica ou molecular total é escrita em termos de um determinante, denominado determinante de Slater (12), resolvida numericamente através de um algoritmo que opera iterativamente. Ou seja, valores de energia são calculados conforme o algoritmo altera os valores das variáveis independentes da função. Quando a energia passa a assumir o mesmo valor, não importando o que se tem nas variáveis independentes, diz-se que o sistema convergiu e a energia obtida é maior, ou na melhor das hipóteses igual, ao valor real (SLATER, 1931; FROESER FISCHER, 1987). Isso chama-se Princípio Variacional (13) e seu objetivo na química quântica é a minimização da energia (GRAY et al, 2004).

$$\frac{1}{\sqrt{N!}} \sum \pm P A(1)B(2)\dots E(N) \quad (12)$$

N é o número de elétrons, as letras de $A, B \dots E$ são as funções de onda de cada elétron, os números $1, 2 \dots N$ denotam a sequência dos elétrons e, portanto, a quantidade P é um operador responsável pela permutação entre a sequência eletrônica. O termo $\frac{1}{\sqrt{N!}}$ normaliza as funções de onda.

$$E(c o n v e r g i d o) \geq E(r e a l) \quad (13)$$

No método Hartree-Fock as funções de onda em um sistema multieletrônico são tratadas como combinações lineares de orbitais atômicos (*Linear Combination of Atomic Orbitals*, em inglês, LCAO), afim de calcular-se os orbitais moleculares. O conjunto de orbitais atômicos usados para se obter os orbitais moleculares são chamados de conjunto de base. Um orbital molecular individual é definido como (FORESMAN et al, 1996):

$$\phi_i = \sum_{\mu=1}^N c_{\mu i} \cdot \chi_{\mu} \quad (14)$$

Tendo em vista que c é um coeficiente de expansão e χ é uma função de onda arbitrária que pode ser do tipo Slater (*Slater-type Orbitals*, em inglês, STOs) ou tipo Gaussiana (*Gaussian-type Orbitals*, em inglês, GTOs) (SLATER, 1951).

Os orbitais do tipo Gaussianos foram propostos por Samuel Boys em 1950 e acarretaram em uma diminuição do número de funções usadas para a descrição dos orbitais, afetando positivamente o tempo do cálculo (BOYS, 1950; FORESMAN et al, 1996).

$$g(\alpha, r) = c x^n y^m z^l e^{-\alpha r^2} \quad (15)$$

α é uma constante que determina o tamanho da função; r é a coordenada espacial; c é a constante de normalização; α é o expoente; E l , m e n são valores inteiros positivos cuja soma está relacionado à simetria e momento angular orbital (L).

Existe um número mínimo de funções Gaussianas necessárias para o cálculo dos orbitais moleculares. A formulação computacional da função de base é dada a partir das condições químicas e matemáticas que se tem interesse em usar para descrever um sistema.

Uma função de base tem, portanto, informações acerca de quais e como as bases Gaussianas serão usadas.

A função de base pode ser determinada especificando as Gaussianas dos orbitais internos (caroço), as Gaussianas dos orbitais externos (valência), a quantidade de Gaussianas e o tipo que serão usadas para tal (FORESMAN et al, 1996; CRAMER, 2004). Os conjuntos de base usados nessa dissertação são as funções de Pople, cuja notação será explicada abaixo (FORESMAN et al, 1996):

Base Mínima: quando se usa um número mínimo de orbitais de um sistema químico e o mínimo de funções Gaussianas para descrever cada um desses orbitais.

Double Zeta: quando se usa o dobro da base mínima para descrever cada orbital.

Triple Zeta: quando se usa o triplo de funções gaussianas, em relação à base mínima, para descrever cada orbital.

Função Polarizada: trata-se de funções que descrevem os orbitais de valência com maior momento angular.

Função Difusa: são funções com maior complexidade para descrever um sistema de forma mais precisa.

Além do conjunto de bases, é necessário especificar qual o tipo de cálculo que será empregado. No caso de cálculos Hartree-Fock, deve-se adicionar HF para que o computador passe a usar os algoritmos de Fock e o cálculo siga as descrições apresentadas acima. No caso de cálculos do tipo Teoria do Funcional da Densidade, temos uma série de funcionais responsáveis por um tipo específico de descrição e cujo formalismo matemático será apresentado a seguir.

- **O formalismo da Teoria do Funcional da Densidade (DFT)**

O método Hartree-Fock, apresentado anteriormente, busca resolver a função de onda eletrônica para encontrar a energia do átomo ou molécula no estado fundamental. Porém, em 1927 os pesquisadores Llewellyn Thomas e Enrico Fermi formularam, de forma independente, um modelo estatístico que aproximava a distribuição de elétrons em uma densidade eletrônica $n(r)$ (THOMAS, 1927; FERMI, 1927).

O conceito de densidade eletrônica foi explorado por Pierre Hohenberg e Walter Kohn, em 1964, demonstrando que a densidade eletrônica é capaz de determinar e resolver completamente um sistema quântico de forma precisa (HOHENBERG et al, 1964; KOHN et al, 1965). Nasce, então, o modelo que ficou conhecido como Teoria do Funcional da Densidade (*Density Functional Theory*, em inglês, DFT).

A primeira consideração a ser feita acerca da DFT é que, assim como o método Hartree-Fock, usa-se a Aproximação de Born-Oppenheimer. A segunda, é que a DFT se baseia em dois teoremas propostos por Kohn e Hohenberg acerca de elétrons expostos a um potencial externo $v(r)$ e à repulsão coulombiana entre si (HOHENBERG et al, 1964; KOHN et al, 1965). São eles:

I. A função de onda do estado fundamental, e todas as propriedades deste estado, são funcionais da densidade $n(r)$.

A densidade eletrônica do estado fundamental é dada por (SHOLL et al, 2009):

$$n(r) = 2 \int \Psi^*(r) \Psi(r) dr \quad (16)$$

Ressalta-se que r representa as coordenadas espaciais, de forma que também podemos escrever $r(x,y,z)$. O fator 2 que aparece na fórmula (16) é por conta da existência do spin e do Princípio de Exclusão de Pauli. O Princípio de Pauli aponta que cada função de onda eletrônica pode descrever um par de elétrons se ambos possuírem spins opostos (SHOLL et al, 2009).

II. A energia do estado fundamental é mínima para uma densidade eletrônica exata. Ela é escrita como (MORGON et al, 1995):

$$E(n(r)) = \int v(r)n(r)dr + F(n(r)) \quad (17)$$

Onde $F[n(r)]$ é um funcional universal independente de $v(r)$.

Qualquer densidade eletrônica $n'(r)$ diferente de $n(r)$ irá resultar em uma energia maior do que a energia do estado fundamental $E[n'(r)] > E[n(r)]$. Isso torna possível o uso do Princípio Variacional, que através do método iterativo irá variar a densidade eletrônica até que encontre a responsável pela minimização (MORGON et al, 2001).

Outro pilar da Teoria do Funcional da Densidade são as equações de Kohn e Sham (KOHN et al, 1965) que definem um sistema hipotético de partículas, sem interação entre si, tal que a densidade eletrônica do mesmo seja igual a densidade eletrônica do sistema real (com partículas interagentes).

Considerando um potencial externo $v_{ext}(r)$ no qual as partículas sem interação se movem, temos para o Hamiltoniano hipotético (SILVA, 2010):

$$\hat{H} = \frac{-1}{2} \nabla^2 + v_{ext}(r) \quad (18)$$

$$v_{ext}(r) = v(r) + \int \frac{n(r')}{|r - r'|} dr' + v_{xc}(r) \quad (19)$$

Onde $v_{xc}(r)$ é o potencial de troca e correlação. Potencial de “troca” porque ele considera a indistinguibilidade das partículas idênticas e “correlação” porque na mecânica quântica as funções de onda eletrônicas individuais são dependentes entre si. Sua forma é (MORGON et al, 1995; SILVA, 2010; SANTRA, 2010):

$$v_{xc}(r) = \frac{\partial E_{xc}(r)}{\partial n(r)} \quad (20)$$

O Hamiltoniano em (18) opera sobre uma autofunção $\varphi_i(r)$ da equação de Kohn-Sham, resultando em (SILVA, 2010):

$$\hat{H} \varphi_i(r) = \varepsilon_i \varphi_i(r) \quad (21)$$

Para se obter a energia total do sistema ($E[n(r)]$) considera-se, assim como feito anteriormente, a energia cinética eletrônica ($T[n(r)]$), a atração entre elétron-núcleo ($V_{en}[n(r)]$), a repulsão elétron-elétron ($V_{ee}[n(r)]$) e a de troca e correlação entre elétrons E_{xc} : $E[n(r)] = T[n(r)] + V_{en}[n(r)] + V_{ee}[n(r)] + E_{xc}[n(r)]$ (MARDIROSSIAN et al, 2017) e a expressão do autovalor ε_i (SILVA, 2010):

$$\sum \varepsilon_i = T(n(s)) + \int n(r) v_{ext}(r) dr \quad (22)$$

Obtemos então (SILVA, 2010; SANTRA, 2010):

$$E(n(r)) = \sum \varepsilon_i - \frac{1}{2} \int \int \frac{n(r)n(r')}{(r-r')} dr dr' + E_{xc}(n(r)) - \int n(r)v_{xc}(r) dr$$

(23)

O funcional de energia de troca e correlação $E_{xc}[n(r)]$ não tem uma forma exata conhecida. Portanto, para que seja possível a utilização das equações de Khon-Sham é preciso realizar aproximações. Dentro da DFT há várias formas de escrever matematicamente os funcionais, sendo que a maior diferença entre essas formas é justamente como o termo de troca-correlação é tratado.

Como neste trabalho foram usados os funcionais: B3LYP, CAM-B3LYP e PBE0, será feita uma pequena descrição sobre os mesmos.

Algo em comum entre eles é que todos são funcionais híbridos. Os funcionais híbridos são uma classe de aproximações propostas por Axel Becke, em 1993, onde uma parte do funcional de troca é descrito no método Hartree-Fock e o funcional de correlação é descrito em abordagens que variam entre ab initio a semi-empíricos (BECKE, 1993). Na forma geral temos que (FORESMAN et al, 1996):

$$E^{xc}_{\text{híbrido}} = c_{\text{HF}} E^{x}_{\text{HF}} + c_{\text{DFT}} E^{xc}_{\text{DFT}} \quad (24)$$

Em que c são constantes.

O Funcional B3LYP

O funcional de correlação denominado B3LYP veio das propostas de Axel Becke, Chengteh Lee, Weitao Yang e Robert Parr (BECKE, 1988; LEE et al, 1988; BECKE, 1993).

Ele foi desenvolvido usando dois tipos de aproximações DFT muito comuns para termo de troca e correlação: a Aproximação da Densidade Local (*Local Density Approximation*, em inglês, LDA), proposta por Khan e Sham, onde se considera um sistema de um gás de elétrons homogêneo (*Homogeneous Electron Gas*, em inglês, HEG) e escreve-se um funcional que dependa da densidade eletrônica em cada ponto do espaço (KOHN et al, 1965; FORESMAN et al, 1996; BAGAYOKO, 2014; SANTRA, 2010). E a Aproximação do Gradiente Generalizado (*Generalized Gradient Approximation*, em inglês, GGA) onde se considera a densidade eletrônica e seu gradiente (PERDEW et al, 1996; SANTRA, 2010).

Matematicamente temos :

$$E_{xc}^{LDA}(n(r)) = \int n(r) \varepsilon_{xc}(n(r)) dr \quad (25)$$

Em que $\varepsilon_{xc}[n(r)]$ é a energia de troca e correlação por partícula.

$$E_{xc}^{GGA}(n(r)) = \int f^{GGA}(n(r), \nabla n(r)) dr \quad (26)$$

A energia de troca e correlação é desmembrada em:

$$E_{xc}(n(r)) = E_x(n(r)) + E_c(n(r)) \quad (27)$$

De forma que temos os termos de troca nas aproximações LDA e GGA (FORESMAN et al, 1996; SANTRA, 2010):

$$E_x^{LDA}(n(r)) = \frac{-3}{2} \left(\frac{3}{4\pi} \right)^{\frac{1}{3}} \int n^{\frac{4}{3}}(r) dr \quad (28)$$

$$E_x^{GGA}(n(r)) = \int n(r) \varepsilon_x(n(r)) F_x(s) dr \quad (29)$$

Onde s é o gradiente reduzido (SANTRA, 2010):

$$s = \frac{(\nabla n(r))}{2(3\pi^2)^{\frac{1}{3}} n(r)^{\frac{4}{3}}} \quad (30)$$

Em 1988, Becke acrescentou uma correção do tipo GGA no termo de troca $E_x^{\text{LDA}}[n(r)]$ que é utilizado na energia de troca e correlação total do funcional B3LYP (BECKE, 1988):

$$E_x = E_x^{\text{LDA}} - \beta \int n^{\frac{4}{3}}(r) \frac{x^2}{(1 + 6\beta x \sinh^{-1} x)} dr \quad (31)$$

Em que x é a razão (BECKE, 1988):

$$x = \frac{\nabla n(r)}{n^{\frac{4}{3}}(r)} \quad (32)$$

E β é uma constante.

O termo de troca e correlação inteiro do funcional B3LYP pode ser expresso como (SANTRA, 2010; FORESMAN et al, 1996):

$$E_{xc}^{B3LYP} = E_{xc}^{LDA} + a \left(E_x^{HF} - E_x^{LDA} \right) + b \left(\Delta E_x^{GGA} \right) + c \Delta E_c^{GGA} \quad (33)$$

Sendo que a , b e c são parâmetros determinados por ajuste experimental.

O Funcional PBE0

Introduzido por Perdew, Burke e Ernzerhof, o funcional PBE0 segue aproximações do tipo GGA onde todos os seus parâmetros são constantes fundamentais (PERDEW et al, 1996; ERNZERHOF et al, 1999).

Ele é obtido através do rearranjo da fórmula de energia troca-correlação mostrada em (33). De acordo com Becke, apenas um coeficiente é necessário para escrever a relação de troca HF-DFT dos funcionais híbridos (BECKE, 1996; ADAMO et al, 1999):

$$E_{xc} = E_{xc}^{GGA} + a \left(E_x^{HF} - E_x^{GGA} \right) \quad (34)$$

Aplicando a Teoria da Perturbação de quarta ordem, Perdew e colaboradores identificaram que o valor ótimo para o coeficiente a é de $1/4$ (ADAMO et al, 1999). Temos então que a troca e correlação no funcional PBE0 fica:

$$E_{xc} = E_{xc}^{GGA} + \frac{1}{4} (E_x^{HF} - E_x^{GGA}) \quad (35)$$

O Funcional CAM-B3LYP

Os funcionais apresentados até agora possuem o detalhe de, por vezes, negligenciar interações entre elétrons que se encontram muito distantes. Isso se mostra um problema quando, por exemplo, se quer avaliar a excitação de um elétron para um orbital de alta energia (TAWADA et al, 2004).

Uma forma de corrigir esse problema é adicionando correções de longo alcance nos funcionais. As correções são feitas primeiramente incorporando a interação orbital-orbital, no funcional de troca, através de um operador de repulsão eletrônica escrito como (IIKURA et al, 2001; TAWADA et al, 2004):

$$\frac{1}{r_{12}} = \frac{1 - \text{erf}(\mu r_{12})}{r_{12}} + \frac{\text{erf}(\mu r_{12})}{r_{12}} \quad (36)$$

$\mathbf{r}_{12} = \mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2$ para elétrons com coordenadas vetoriais r_1 e r_2 , μ é o parâmetro que determina a razão entre r_1 e r_2 e $erf(\mu r_{12})$ é a função erro de Gauss. A função erro de Gauss é uma função sigmoide muito utilizada para descrições probabilísticas.

Yanai e colaboradores sugeriram normalizar o operador repulsão usando dois parâmetros extras α e β , resultando em (YANAI et al, 2004; TAWADA et al, 2004; CORNATON et al, 2014):

$$\frac{1}{r_{12}} = \frac{1 - (\alpha + \beta \cdot erf(\mu r_{12}))}{r_{12}} + \frac{(\alpha + \beta \cdot erf(\mu r_{12}))}{r_{12}} \quad (37)$$

Sendo que α e β satisfazem a condição:

$$0 \leq \alpha \leq 1; 0 \leq \beta \leq 1; 0 \leq \alpha + \beta \leq 1 \quad (38)$$

Essa normalização foi chamada de Método de Atenuação de Coulomb (*Coulomb-Attenuating Method*, em inglês, CAM) e foi bem aplicado junto do funcional B3LYP nos trabalhos de Yanai e colaboradores de forma que os melhores valores demonstrados para os

parâmetros foram os mesmos demonstrados por Tawada, sendo: $\alpha = 0.19$, $\beta = 0.46$ e $\mu = 0.33$ (YANAI et al, 2004; TAWADA et al, 2004).

Os funcionais B3LYP, PBE0 e CAM-B3LYP foram todos fundamentados sob cálculos quânticos que consideram a equação de Schrödinger independente do tempo. Para otimizações e cálculos de energia no estado fundamental, a componente temporal pode ser negligenciada.

Porém, para simulações espectroscópicas como na região do Ultravioleta, Dicroísmo Circular Eletrônico, Fluorescência, 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). O método TD-DFT aloca nos funcionais mencionados o termo temporal. A base das equações passa a ser ao hamiltoniano com o termo temporal mostrado na equação (7) e o v_{ext} da equação (19) passa a assumir a forma: (RUNGE et al, 1984; CASIDA, 1995):

$$v_{ext}(r, t) = v(r, t) + \frac{\int n(r', t) dr'}{(r - r')} + v_{xc}(r, t) \quad (39)$$

A troca e correlação (20) assume a estrutura:

$$v_{xc}(r,t) = \frac{\partial E_{xc}(n(r,t))}{\partial n(r,t)} \quad (40)$$

Dessa maneira os funcionais passam a ter uma dependência do espaço e do tempo. O método TD-DFT permite o cálculo de propriedades eletrônicas e ópticas (ADAMO et al, 2013).

Como a energia da onda eletromagnética absorvida pelo elétron é uma grandeza quantizada, com um formalismo teórico já apresentado, os comprimentos de onda que aparecem em um espectro de absorção é capaz de nos dizer características estruturais (BALL, 2001; PRETSCH et al, 2009). O cálculo da energia de absorção depende da energia do estado fundamental eletrônico e da energia do estado excitado em função da geometria do estado fundamental. As simulações computacionais de espectros na região do Ultravioleta e do Visível precisam de uma descrição quântica dependente do tempo que os funcionais TD-DFT ofertam sem grandes custos computacionais (ADAMO et al, 2013; JACQUEMIN et al, 2011):

$$E_{abs} = E_{EE}(R_{EF}) - E_{EF}(R_{EF}) \quad (41)$$

O subscrito *EE* significa Estado Excitado, o subscrito *EF* significa Estado Fundamental e *R* é a geometria molecular.

As propriedades do estado excitado são dependentes do ambiente. Dessa forma, é necessário mimetizar o ambiente experimental nas simulações. Isso pode ser feito através da presença do solvente na simulação (ADAMO et al, 2013; JACQUEMIN et al, 2011; LAURENT et al, 2014).

Na metodologia computacional, o estado excitado é tratado como em não-equilíbrio com o solvente, enquanto que o estado fundamental é tratado como em equilíbrio com o solvente (ADAMO et al, 2013):

$$E_{abs} = E_{EE}(R_{EF}, neq) - E_{EF}(R_{EF}, eq) \quad (42)$$

Sendo que *neq* significa não-equilíbrio e *eq* significa equilíbrio.

Uma grandeza de interesse no cálculo do espectro de absorção é a força do oscilador (*f*). A força do oscilador expressa o quão provável (ou permitida) é uma dada transição eletrônica. A força do oscilador relaciona-se com a força do dipolo de transição (*D*), que por sua vez se relaciona com o comprimento de onda e a absortividade molar.

Matematicamente temos (GAUSSIAN, 2017):

$$f_i = \frac{8\pi^2 \tilde{\nu}_i m_e c}{3 h e^2} D_i \quad (43)$$

Sendo que i é o estado excitado de interesse, $\tilde{\nu}$ é energia de excitação em número de onda, m_e é a massa do elétron, e é carga do elétron, c é a constante da luz no vácuo, h é a constante de Planck e D é a força do oscilador cuja expressão pode ser vista abaixo (GAUSSIAN, 2017):

$$D_i = 4 \left[\frac{3 \cdot 1000 \cdot \ln(10) \cdot h \cdot c}{32 \cdot \pi^3 \cdot N} \right] \epsilon_i^{máx} \sqrt{\pi} \frac{\sigma}{\tilde{\nu}_1} \quad (44)$$

Em que i é o estado de interesse, c é a constante da luz no vácuo, h é a constante de Planck, $\epsilon^{máx}$ é a absortividade molar no máximo de absorção, $\tilde{\nu}$ é energia de excitação em número de onda e σ é o desvio padrão em número de onda referente à largura da banda.

Junto dos cálculos de absorção na região do UV-Vis a metodologia TD-DFT também gera o espectro de Dicroísmo Circular Eletrônico. É calculado o momento de dipolo elétrico $\mu_{elét}$ e o momento de dipolo magnético μ_{mag} (AUTSCHBACH et al, 2002):

$$\mu_{elét} = \sum_v \alpha_{uv} E_v + \sum_v \frac{\beta_{uv}}{c} \frac{\partial B_v}{\partial t} + \dots \quad (45)$$

$$\mu_{mag} = \sum_v k_{uv} B_v + \sum_v \frac{\beta_{uv}}{c} \frac{\partial E_v}{\partial t} + \dots \quad (46)$$

Considerando que α_{uv} é o componente do tensor polarizabilidade elétrica, k_{uv} é o componente tensor suscetibilidade magnética, β_{uv} é o componente do tensor rotação óptica.

A simulação do espectro (sinal) do dicroísmo circular é baseada na relação (AUTSCHBACH et al, 2002):

$$R_{0 \rightarrow n} = 22.97 \int \frac{\Delta \varepsilon(E)}{E} dE \quad (47)$$

Onde a força rotatória R está nas unidades 10^{-40} esu.cm.erg/G, $\Delta \varepsilon$ é a diferença dos coeficientes de absorção da luz circularmente polarizada desviada para a esquerda e para a direita em $(\text{mol. cm})^{-1}$ ou 10^{-40} . cm². esu² e E é a energia em eV (AUTSCHBACH et al, 2002).

Para cada excitação $0 \rightarrow n$, uma curva gaussiana normalizada com seu centro na energia de excitação é estendida de forma a reproduzir o $R_{0 \rightarrow n}$ de (47). A linha do sinal de ECD teórico traçado é então obtido com a superposição de todas as curvas gaussianas (FASMAN, 1996; AUTSCHBACH et al, 2002).

- **O Modelo de Solvatação dos Espectros**

Há várias formas de mimetizar o solvente, podendo ser explícita ou implicitamente. Solvente explícito é o método onde se adiciona as moléculas de solvente junto da molécula de interesse, respeitando as cargas, se houverem, e se otimiza o sistema a fim de se obter a configuração mais estável. Isso deve ser feito com cuidado, uma vez que cada molécula de solvente adicionado aumenta significativamente o custo do cálculo. Já no método implícito o ambiente pode ser tratado como um “continuum” sem estrutura, mas que tem as mesmas propriedades macroscópicas do solvente. O método implícito mais comum é o Modelo Contínuo Polarizável (Polarisable Continuum Model, PCM) desenvolvido por Jacopo Tomasi e colaboradores. O PCM é uma família de descrições de Carga Superficial Aparente (Apparent Surface Charge, ASC) que interage com o soluto através da constante dielétrica, onde define-se um potencial V em todo o espaço (TOMASI et al, 2005; ADAMO et al, 2013):

$$V_{\sigma}(r) = \int_r \frac{\sigma(s)}{|r-s|} d^2s \quad (48)$$

O gradiente do potencial relaciona-se com a constante dielétrica ϵ no cálculo do vetor polarização $P(r)$ (TOMASI et al, 2005):

$$P_z(r) = \frac{-\varepsilon_k - 1}{4\pi} \nabla V_\sigma(r) \quad (49)$$

O ε_k é a constante dielétrica na região k .

O limite (tamanho) da superfície em relação a uma região k e uma região z é dada por (TOMASI et al, 2005):

$$\sigma_{kz} = -(P_z - P_k) n_{kz} \quad (50)$$

O n_{kz} é o vetor unitário no limite da superfície entre a região k e z .

O método implícito costuma ter um custo computacional bem menor, porém ele negligencia interações entre soluto-solvente (como ligação de hidrogênio, forças de van der Waals etc). O que se pode fazer é unir ambos os métodos implícito e explícito a fim de se considerar um sistema mais próximo do experimental onde as interações soluto-solvente e potencial dielétrico não são desconsiderados. A esse método chama-se de híbrido.

4.2.2. O *Docking* Molecular com uso do software Autodock Vina

O *docking* molecular é uma técnica computacional de grande utilidade na compreensão e estudo de processos biológicos, onde um ligante de interesse é alocado em um

sítio pré-determinado de forma que a energia do processo de complexação é computada, bem como as interações entre o ligante e as moléculas mais próximas a ele no sítio.

Para este tipo de estudo é necessário a escolha de uma estrutura cristalográfica da proteína que tenha resolução entre 1 a 3 Å e que possua no sítio de interesse uma molécula de tamanho aproximada à do ligante que se deseja alocar. Isso é preciso porque o *docking* baseia-se no modelo chave-fechadura, onde a complexação entre duas moléculas depende que o receptor (proteína) tenha tamanho e formato complementar ao ligante (fármaco). Os cálculos residem no formalismo da mecânica clássica, onde os átomos são tratados como esferas, a descrição da interação é baseada no modelo Chave-Fechadura e as interações como coulômbicas (LENGAUER et al, 1996; ALBERTS et al, 2017; DI NOLA et al, 1996).

Neste trabalho o software utilizado para realizar o *docking* foi o Autodock Vina com uso das facilidades do Autodock Tools (TROTT et al, 2009; MORRIS et al, 2009). No trabalho de Oleg Trott e Arthur Olson está descrito o formalismo matemático do Autodock Vina, junto dos resultados em comparação com o Autodock4 que demonstraram que o Vina possui uma precisão de resultado em 78% (TROTT et al, 2009). O programa realiza uma otimização do sistema oferecido para o cálculo através de um método Quase-Newton BFGS (Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno) (NOCEDAL et al, 1999). A parte da função pontuação do Vina que é dependente da conformação do ligante é descrita por (TROTT et al, 2009):

$$c = \sum_{i < j} f_{ij}(r_{ij}) \quad (51)$$

A soma é sobre os pares de átomos que se movem um em relação ao outro. O índice i é referente a cada átomo, t é referente ao tipo atômico, f_{tij} é um conjunto de função de interação e r_{ij} é a distância inter- atômica (TROTTE et al, 2009). A função pontuação pode ser desmembrada na parte que diz respeito a interações intermoleculares (TROTTE et al, 2009):

$$C_{inter} + C_{intra} = \sum_{i < j} f_{tij}(r_{ij}) \quad (52)$$

Para cada contribuição intermolecular (C_{inter}), um valor de energia, em kcal/mol, é calculado através do algoritmo BFGS. O resultado do *docking* é uma série de poses com suas energias específicas.

Quando já existe uma estrutura cristalográfica da proteína de estudo com o ligante de interesse pode-se realizar o *redocking*, que trata-se de realocar o ligante no sítio onde ele já se encontra encaixado afim de obter a energia da complexação, um parâmetro de comparação ou até mesmo a validação do protocolo de *docking* que se pretende utilizar.

Apesar das descrições do *docking* basearem-se no modelo Chave-Fechadura, onde a proteína é tratada de forma rígida, é possível realizar *dockings* onde os aminoácidos de interesse em uma determinada região podem ser flexibilizados. Esse processo chama-se *docking* flexível e se pode flexibilizar alguns aminoácidos ou um sítio/ região inteiros.

4.2.3. Análise de Interações Não- Covalentes pelo software NCIPLLOT4

São interações de natureza eletrostática e que não envolvem compartilhamento de elétrons. Elas podem ocorrer no interior de uma mesma molécula (interação intramolecular) ou entre moléculas (interação intermolecular). As interações não covalentes são responsáveis pela dissolução do soluto no solvente, pela interação entre soluto-soluto, interação entre solvente-solvente e pelo reconhecimento molecular (ANSLYN et al, 2004).

Na simulação computacional, pode-se usar diferentes recursos para analisar interações não covalentes. Julia Contreras-Garcia e colaboradores desenvolveram um software denominado NCIPLLOT4 que plota interações não covalentes e pode ser usado para avaliar as mesmas que ocorrem entre proteínas e ligantes (JOHNSON et al, 2010; CONTRERAS-GARCIA et al, 2011).

Através da utilização de quatro algoritmos, o NCI (*Non Covalent Interactions*, em inglês) calcula interações não covalentes baseado na densidade eletrônica $n(r)$ e seu gradiente reduzido (s) (KOZUCH et al., 2013). O cálculo tem sua origem na contribuição do gradiente generalizado da troca e correlação do tipo GGA (CONTRERAS-GARCIA et al, 2011):

$$E_x^{GGA} - E_x^{LDA} = - \int F(s) \frac{(n(r))^4}{3} dr \quad (53)$$

Onde $F(s)$ é uma função do gradiente reduzido apresentado em (30).

O gradiente reduzido assume valores altos nas regiões de densidade eletrônica e decai consideravelmente longe dos núcleos (CONTRERAS-GARCIA et al, 2011). A presença de interação entre fragmentos de moléculas provoca uma mudança no gradiente reduzido, localizado entre os átomos do fragmento, produzindo pontos críticos. A análise da densidade eletrônica nesses pontos críticos é o que determina o tipo e a natureza da interação (BOTO et al, 2015).

Isso é feito através do cálculo da segunda derivada da densidade $\nabla^2 n(r)$, baseado no Teorema de Divergência, ao longo do eixo de interação. O sinal do $\nabla^2 n(r)$ indica se o fluxo do gradiente reduzido da densidade está saindo $\nabla^2 n(r) > 0$ ou entrando $\nabla^2 n(r) < 0$ de um determinado volume em um ponto de referência. Em resumo temos que se $\nabla^2 n(r) > 0$ indica repulsão e se $\nabla^2 n(r) < 0$ indica atração (BOTO et al, 2015).

Para determinar o tipo de ligação, o mesmo Laplaciano é utilizado e expresso em termos do segundo autovalor λ da Matriz Hessiana da densidade eletrônica. Os autovalores λ_1 , λ_2 , λ_3 são os componentes da diagonal principal da matriz Hessiana (CONTRERAS-GARCIA et al, 2011; KOZUCH et al, 2013):

$$\nabla^2 n(r) = \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 \quad (54)$$

Onde $\lambda_1 < \lambda_2 < \lambda_3$. O segundo autovalor λ_2 é responsável por determinar qual o tipo de ligação (ligação de hidrogênio, van der waals, etc). Quando $\lambda_2 > 0$ trata-se de repulsão

(vermelho), quando $\lambda_2 \sim 0$ trata-se de uma atração fraca (verde) e quando $\lambda_2 < 0$, trata-se de uma atração forte (azul).

Para determinar a densidade eletrônica, o NCIPLOT pode usar dados de funções de onda mecânico-quânticas ou densidades pro-moleculares. A densidade pro-molecular é uma facilidade oferecida pelo NCIPLOT onde considera-se as posições atômicas da proteína e do ligante, informadas no input, em um raio determinado a partir do ligante para plotagem das interações. Embora a densidade pro-molecular não leve em conta o relaxamento introduzido em cálculos SCF, Hartree-Fock e DFT, elas são muito úteis para sistemas biológicos enormes como proteína-ligante (CONTRERAS-GARCIA et al, 2011).

O NCIPLOT pode ser usado como auxiliar dos resultados observados no *docking* molecular.

5. MATERIAIS, INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS

5.1. Materiais e Instrumentos

5.1.1. Reagentes

A HSA livre de ácidos graxos (A3782), BSA (A7030), SSZ, 5-ASA, ibuprofeno, varfarina, digitoxina, tiroxina e os sais da preparação do tampão fosfato foram obtidos da Sigma Aldrich.

5.1.2. Preparo das Soluções

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

- Tampão fosfato (pH=7,0) 0,05 molar

Foram preparadas soluções de fosfato dibásico de sódio 0,05 mol/L e de fosfato monobásico de sódio 0,05 mol/L. Em um béquer adicionou-se 250 mL da solução de fosfato monobásico de sódio 0,05 molar. O pH foi ajustado com adição de cerca de 300 mL da solução de fosfato dibásico de sódio 0,05 mol/L.

- Solução de HSA A3782, 0,001 molar

Pesou-se 0,033g de HSA - A3782 e diluiu-se em 500 µL de tampão fosfato pH=7,0.

- Solução de SSZ, 0,01 molar

Pesou-se 0,0039g de SSZ e diluiu-se em 1 mL de solvente Dimetilsulfóxido (DMSO).

- Solução de 5-ASA, 0,01 molar

Pesou-se 0,0016g de 5-ASA e diluiu-se em 1mL de solvente DMSO.

- Solução de ibuprofeno, 0,01 molar

Pesou-se 0,0021g de ibuprofeno, diluindo-o em 1 mL de solvente etanol.

- Solução de varfarina, 0,01 molar

Pesou-se 0,0031 g de varfarina, diluindo-a em 1 mL de solvente etanol.

- Solução de digitoxina, 0,01 molar

Pesou-se 0,0076 g de digitoxina, diluindo-a em 1 mL de solvente etanol.

- Solução de L-tiroxina, 0,01 molar

Pesou-se 0,0078g de L-tiroxina, diluindo-a em 1 mL de solvente DMSO.

- Solução de BSA A3782, 0,001 molar

Pesou-se 0,033g de BSA e diluiu-se em 500 μ L de tampão fosfato pH=7,0.

Todas as soluções foram estocadas na geladeira e diluídas conforme necessário.

5.1.3. Instrumentos

- **Equipamentos**

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: medidor de pH (Analyser modelo 300 Digital - São Paulo, Brasil); balança analítica AG245 (Mettler Toledo, Ohio, EUA); espectrofotômetro UV-Vis Lambda 35 (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA); espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Shelton, CT, USA); espectropolarímetro Jasco J-815 CD Spectrometer.

- ***Softwares, Programas e Computadores***

Para os cálculos quânticos DFT (otimização, UV-Vis e ECD) usou-se o software Gaussian09, ofertado pelo GridUnesp e o Gaussian16 ofertado pela Universidade Estadual de Campinas em parceria com o Instituto de Química da UNICAMP.

Os cálculos de *docking* molecular e Análise de Interações Não Covalentes foram realizados em um notebook Samsung com processador Intel® Core™ i5-7200U CPU – 2,50GHz × 2, memória de 7,7 GiB, placa de vídeo Intel Corporation HD Graphics 620 e sistema operacional Linux Mint 20 Cinnamon versão 4.6.7.

Os *softwares* de *docking* molecular usados foram o AutoDockTools e o AutoDockVina e os *softwares* usados para Análise de Interações Não Covalentes foi o NCIPLLOT4. Para visualização dos resultados e obtenção de imagens usou-se o GaussView6, o PyMOL e o Discovery Studio 2021. O PyMOL também foi utilizado para verificar a similaridade entre estruturas químicas através do cálculo do desvio quadrático médio (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*). O RMSD calcula a medida da distância média entre os átomos das moléculas que foram sobrepostas, de forma que quanto mais próximas essas estruturas são, mais próximo de zero é o valor do RMSD (COUTSIAS et al, 2004).

Para verificação do pKa e estado de protonação usou-se o *software* MarvinView.

5.2. Procedimentos

5.2.1. Obtenção do espectro de absorção, na faixa do UV-Vis, da SSZ em água e em dimetilformamida (DMF)

A fim de se observar o comportamento dos comprimentos de onda dos máximos de absorção em meios com diferentes constantes dielétricas, escolheu-se os solventes água (solvente altamente polar) e dimetilformamida (solvente menos polar).

- **Experimental**

Para obter o espectro da SSZ nos solventes água e DMF fez-se uso de um espectrofotômetro que opera na faixa do UV-Vis. Usou-se o intervalo de comprimento de onda de 250 a 550 nm e concentração de 25 μ M de sulfassalazina em ambos os meios. Os experimentos foram feitos à temperatura de 298 K.

- **Teórico**

A obtenção dos espectros de absorção teóricos da SSZ foi feita, inicialmente, considerando o solvente de forma implícita. Primeiro a molécula foi otimizada usando o funcional B3LYP e o conjunto de base 6-31G(d,p). Em seguida, a mesma foi submetida a cálculos de UV-Vis onde variou-se o funcional e o conjunto de base a fim de se determinar qual o melhor nível teórico, em comparação com o experimental. Os funcionais selecionados foram B3LYP, CAM-B3LYP e PBE0 e os conjuntos de base foram 6-311+G(d,p) e 6-311++G(3df,2p). O modelo implícito usado foi o modelo PCM de Tomasi onde se considera as constantes dielétricas dos solventes para realizar a simulação do espectro de UV-Vis em água e em DMF (TOMASI et al, 2005). Na Tabela 1, estão apresentados os valores de constante dielétrica de ambos (GAUSSIAN, 2021).

Tabela 1 - Constante dielétrica dos solventes Água e DMF usados no cálculo de solvente implícito da sulfassalazina.

Solvente	Constante Dielétrica (ϵ_r)
Água	78.3
DMF	37.2

Os testes foram realizados com a molécula de SSZ neutra.

O método com solvente implícito para esse sistema não foi satisfatório, de forma que não foi possível observar diferenças nos comprimentos de onda dos máximos de absorção, em água e em DMF, mesmo variando o nível teórico. O resultado encontra-se no Anexo A.

Como havia sido feito, em um estudo anterior, o espectro de absorção teórico e experimental da molécula de mesalazina e o melhor método teórico encontrado foi o híbrido com ajuste de estado de protonação (Anexo A), optou-se por fazer essa abordagem com a SSZ.

Diferentes formas protonadas da SSZ foram otimizadas no funcional B3LYP e na função de base 6-31G(d,p), junto da distribuição de moléculas do solvente ao redor da mesma (micro solvatação). O cálculo TD-DFT foi realizado com uso do nível teórico CAM-B3LYP/6-311+G(d,p), de forma que o CAM-B3LYP foi o escolhido devido a dados na literatura que apontam para um bom desempenho do funcional ao apresentar comprimentos de onda máximos teóricos que se aproximam dos dados experimentais (ZARA et al, 2017; LUBRIN et al, 2017; PETROV et al, 2021).

Ressalta-se que o estado de protonação ou desprotonação de uma molécula em solvente que não é a água é difícil de prever. Então, fez-se cálculos considerando todas as possíveis formas da SSZ nos dois solventes utilizados. Nas Figuras 4 e 5 abaixo encontram-se as formas de protonação da SSZ consideradas para água e DMF, respectivamente. Os resultados de UV-Vis variando a protonação encontram-se no Anexo A.

Figura 4- Representações 2D da SSZ em diferentes estados de protonação e posições aproximadas do solvente água (círculos azuis).

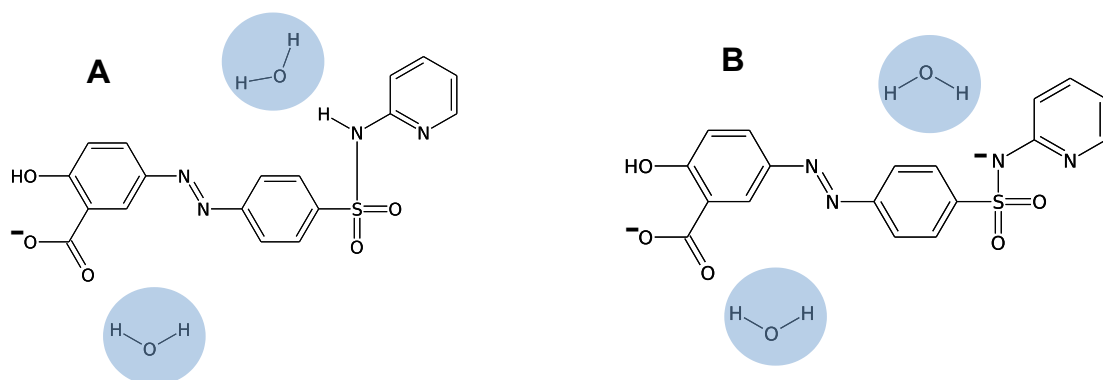
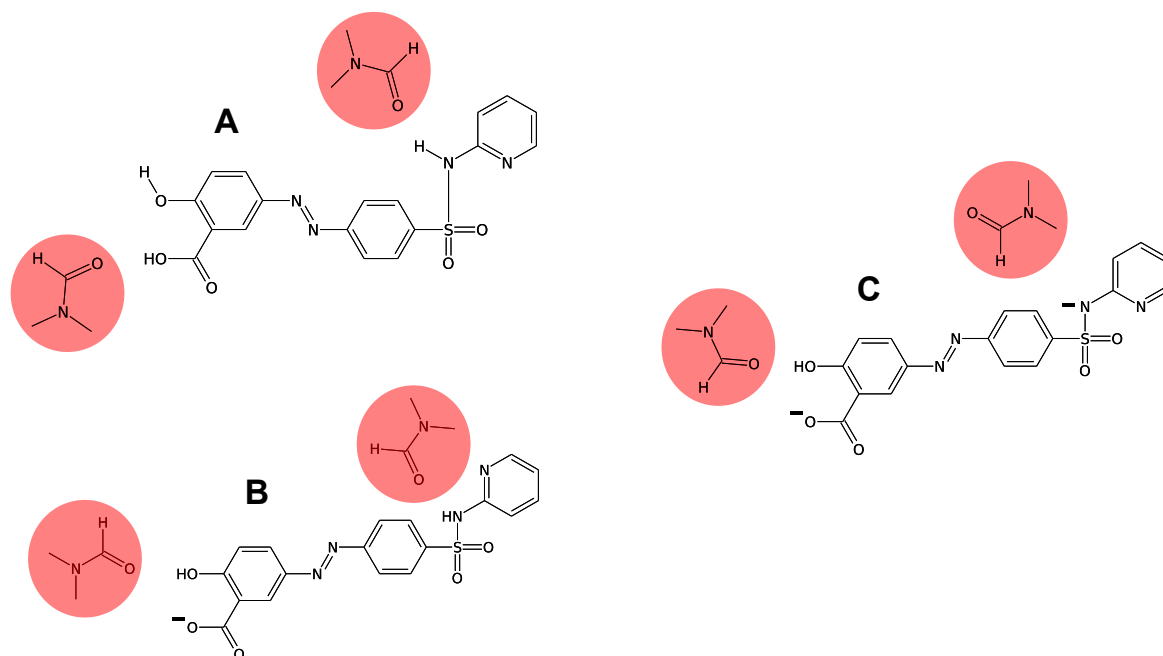


Figura 5- Representações em 2D da SSZ em diferentes estados de protonação e posições aproximadas do solvente DMF (círculos vermelhos).



O uso de mais de duas moléculas de água e DMF ao redor da SSZ aumentava muito o tempo dos cálculos, realizados no Gaussian09 com 16 GB de memória e 12 processadores. Sendo assim, usou-se e apenas duas moléculas de solvente para cada SSZ.

5.2.2. Determinação da constante de associação (K_a), por absorbância, da SSZ na HSA e na BSA

Para que fosse possível obter a constante de associação entre SSZ e HSA, fixou-se a concentração do fármaco em 10 μM e variou-se a concentração de proteína de 0 a 30 μM , com adições de 2 μM cada, em meio tampão fosfato pH 7,0. Os dados de absorção foram

coletados à temperatura de 298 K e inseridos na equação de Benesi- Hildebrand (55) para realizar o ajuste linear (BENESI et al, 1949):

$$\frac{A_{\infty} - A_0}{A - A_0} = 1 + \frac{1}{K_a} \frac{1}{([HSA])} \quad (55)$$

O experimento foi realizado em triplicata a fim de se obter desvios dos valores das medidas e a faixa de comprimento de onda do UV-Vis foi ajustada de 250 a 550 nm.

Esse mesmo procedimento foi realizado para a proteína BSA, como um parâmetro de comparação com a HSA. Todas as condições experimentais usadas foram as mesmas descritas acima, inclusive a aplicação da equação de Benesi- Hildebrand para determinação de K_a .

5.2.3. Ensaios de competição de sítio na HSA, por absorbância, entre a SSZ e os fármacos: ibuprofeno, varfarina, digitoxina, tiroxina e mesalazina

A competição de sítio foi realizada para verificar o comportamento da constante de associação da SSZ na presença de outros fármacos e validar se a técnica de UV-Vis aponta a afinidade da SSZ pelo DS1 como já apresentado na literatura (SULKOWSKA et al, 2005; RAHMAN et al, 2023; WENSKOWSKY et al, 2017). No estudo do espectro de absorção do fármaco 5-ASA apresentado no Anexo A, é possível verificar que em água o mesmo tem seu máximo de absorbância no comprimento de onda de 298 nm. Como esse valor é distante da

absorção da SSZ, a 5-ASA pode ser usada como competidora de sítio. Para os outros fármacos (ibuprofeno, digitoxina, varfarina e tiroxina) não foi preciso realizar testes, pois seus comprimentos de onda máximo de absorção são encontrados na literatura (KHALAF et al, 2020; SHARMA et al, 2009, KARLSSON et al, 2007; WALT, 1982).

Como já citado anteriormente, a varfarina é um ligante de DS1, a digitoxina é um ligante de DS3, a tiroxina (T4) é de FA5, o ibuprofeno e a mesalazina são ligantes de DS2.

Para a obtenção de cada espectro fixou-se a concentração da SSZ e dos competidores em 10 μ M e variou-se a concentração da HSA em 0 até 30 μ M. A faixa de comprimento de onda do ultravioleta e no visível obtido foi entre 250 e 550 nm e a constante de associação (K_a) foi determinada pela equação de Benesi- Hildebrand.

Todos os espectros obtidos foram realizados em triplicata, sob temperatura de 298 K e em meio tampão fosfato pH 7,0.

5.2.4. Teste estatístico para comparar os resultados da constante de associação da SSZ e HSA, na presença dos competidores

Após a obtenção da constante de associação usou-se o software GraphPad Prism 5 para realizar uma comparação estatística entre os resultados a fim de verificar a diferença, se é que há alguma, entre eles. O teste escolhido foi o ANOVA onde foi feito a comparação do K_a na presença dos competidores com o K_a da sulfassalazina sem competidor (controle). Foi usado um coeficiente de confiança de 95% (DUNNETT, 1955; STAHL et al, 1989).

5.2.5. Determinação da energia livre de Gibbs do complexo SSZ + HSA, na presença e ausência de competidores, através do valor de Ka

Os valores da constante de associação obtidos nos experimentos de absorção podem ser utilizados para determinar a energia livre de Gibbs, uma vez que o Ka é uma constante relacionada a um equilíbrio. Para tal usa-se a fórmula (DIVSALAR et al, 2015; POPOVIC, 2022):

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (56)$$

Em que R é a constante universal dos gases ideais, cujo valor é 1,987 cal. K⁻¹. mol⁻¹ (ATKINS, 1999). E T é a temperatura, que no caso dos experimentos foi de 298 K.

Também foi possível determinar a energia livre de Gibbs entre a SSZ e a BSA através do Ka proveniente dos ensaios de absorbância.

5.2.6. Docking molecular e análise de interações não covalente

Foi realizado o *redocking* da SSZ no DS1 da estrutura cristalográfica da HSA, de PDB ID 6r7s, que já possui o ligante SSZ nesse mesmo sítio para se obter uma estimativa da energia livre de Gibbs do complexo e compara-la com a energia calculada através do Ka (WENSKOWSKY et al, 2021).

O mesmo foi realizado com a proteína BSA, de PDB ID 6qs9. As interações intermoleculares entre fármaco e proteínas também auxilia na compreensão da estabilidade do complexo. Os parâmetros da caixa (Tabela 2) construída no DS1 das duas proteínas foram:

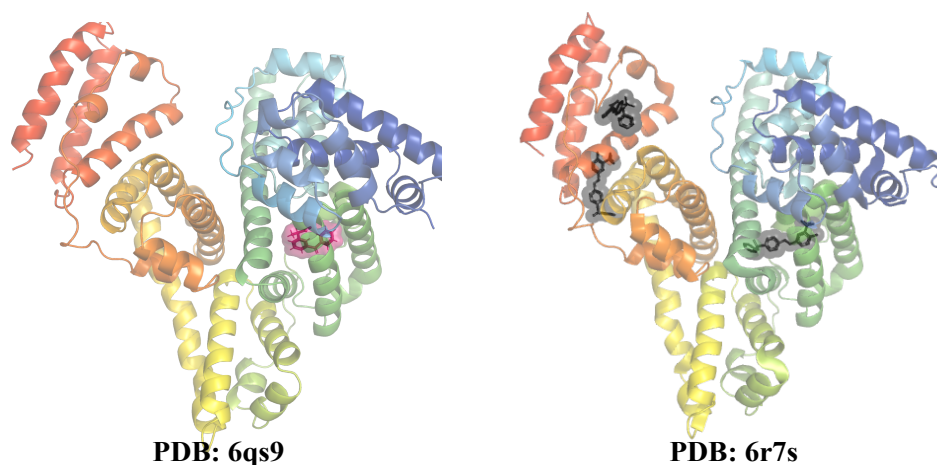
Tabela 2 - Centro, Dimensão e Spacing da caixa, em Å, construída no DS1 da HSA e da BSA para o *docking* da SSZ nas proteínas.

Coordenadas	Centro da Caixa		Dimensões da Caixa		Spacing
	HSA	BSA	HSA	BSA	
X	-7,34	-6,20	50	50	0,375
Y	-1,66	-4,90	50	50	
Z	11,80	11,90	50	60	

As diferenças no centro da caixa e nas dimensões das duas proteína é devido ao fato delas serem ligeiramente diferentes. O RMSD entre as proteínas, usando o comando *super* do PyMOL, é de 1,7 Å. Ambas as estruturas são livres de ácidos graxos, assim como as usadas nos experimentos.

A protonação da SSZ foi ajustada considerando o ambiente proteico em pH=7,0, ou seja, a mesma forma de quando o fármaco está em água. E a protonação de ambas as proteínas foram determinadas através do *software* PyMOL, com adição apenas de hidrogênios polares. Na Figura 6 abaixo seguem as estruturas cristalográficas de ambas as proteínas com os ligantes em seus sítios.

Figura 6- Estrutura cristalográficas usadas no *docking* molecular. Para a proteína BSA usou-se o PDB 6qs9, com o cetoprofeno (rosa) no DS1. E para a proteína HSA, usou-se o PDB 6r7s com moléculas de SSZ (preto) nos sítios DS1 e FA5. Fonte: CASTAGNA et al, 2019 e WENSKOWSKY et al, 2021.



O PDB da BSA selecionado é uma estrutura, obtida por Rossella Castagna e colaboradores, que contém uma molécula de cetoprofeno alocada no sítio 1 de Sudlow. Seus dados cristalográficos foram obtidos através da Difração de Raio-X, com resolução de 2,8 Å (CASTAGNA et al, 2019). Para realização dos cálculos de interações não covalentes no NCIPLLOT4, usou-se as estruturas obtidas no *docking/ redocking* molecular da SSZ na HSA e BSA e considerou-se um raio de 3,5Å a partir do fármaco para a plotagem das interações. Os resultados de interações não covalentes de até 3,5Å do NCIPLLOT4 foram avaliadas em conjunto com as interações não covalentes maiores que 3,5Å encontradas no software Discovery Studios 2021.

5.2.7. Obtenção do espectro de dicroísmo circular eletrônico do fármaco SSZ na ausência e na presença das proteínas HSA e BSA

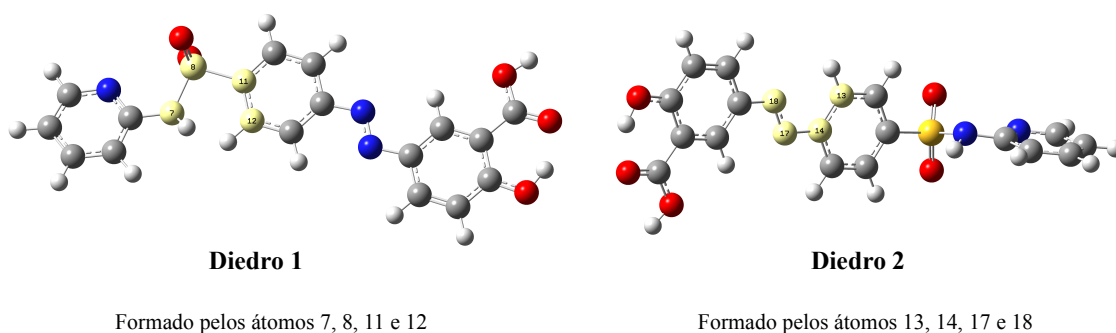
- **Experimental**

Foi realizado o espectro de ECD da SSZ, com concentração de 30 μM , em solução tampão fosfato pH 7,0. Posteriormente obteve-se o espectro da SSZ na presença das proteínas HSA e BSA usando concentração de 30 μM , para as três espécies envolvidas, em tampão fosfato pH 7,0. Os experimentos foram conduzidos a temperatura de 298 K.

- **Teórico**

A fim de verificar o comportamento do ECD em função da conformação, fez-se a varredura de dois diedros da SSZ (Figura 7) com posterior ECD de cada conformero obtido. A varredura foi realizada de 0° a 360° com 36 passos de 10° cada, no funcional CAM-B3LYP e função de base 6-31G(d,p). Sendo assim obteve-se, ao todo, 36 conformações para cada diedro que foram otimizadas no mesmo nível teórico que se realizou a varredura.

Figura 7- Diedros selecionados (diedro 1 e 2) para realizar a varredura (scan) considerando 36 passos que variaram 10°. Em amarelo encontra-se destacados os átomos que compõe os diedros e na legenda abaixo da SSZ encontram-se as numerações desses átomos.



Após a otimização, fez-se os ECDs no vácuo usando o funcional CAM-B3LYP e função de base 6-311+G(d,p). Outra forma de avaliar a conformação é realizando o ECD das estruturas provenientes do *docking*. Como no experimental o sinal é devido a interação entre o fármaco e o ambiente proteico que tem polaridade diferente da solução, fez-se o ECD das conformações do *docking*, na HSA e BSA, em solventes com diferentes constantes dielétricas.

Os espectros foram calculados com o funcional CAM-B3LYP e a função de base 6-311+G(d,p). Os solventes foram tratados de maneira implícita, onde considerou-se somente suas constantes dielétricas (ϵ_r). Usou-se água ($\epsilon_r = 78,3$), DMF ($\epsilon_r = 37,2$), pentan-1-ol ($\epsilon_r = 15,1$) e tolueno ($\epsilon_r = 2,4$) (GAUSSIAN, 2021).

5.2.8. Ensaios de competição de sítio na HSA, por dicroísmo circular eletrônico, entre a SSZ e os fármacos: ibuprofeno, varfarina, digitoxina, tiroxina e mesalazina

A competição de sítio através de ECD foi feita utilizando os mesmos competidores da absorbância (5-ASA, varfarina, digitoxina, *L*-tiroxina e ibuprofeno), porém ao invés de se determinar constante de associação a competição por ECD é qualitativa. Em outras palavras, observa-se o efeito que o competidor tem no sinal da SSZ. Usou-se 30 μM de SSZ e de HSA, junto da titulação do competidor de 0 a 18 μM . Fez-se, no total, três adições de 6 μM cada. Todos os ensaios foram conduzidos em tampão fosfato pH 7,0 e temperatura de 298 K.

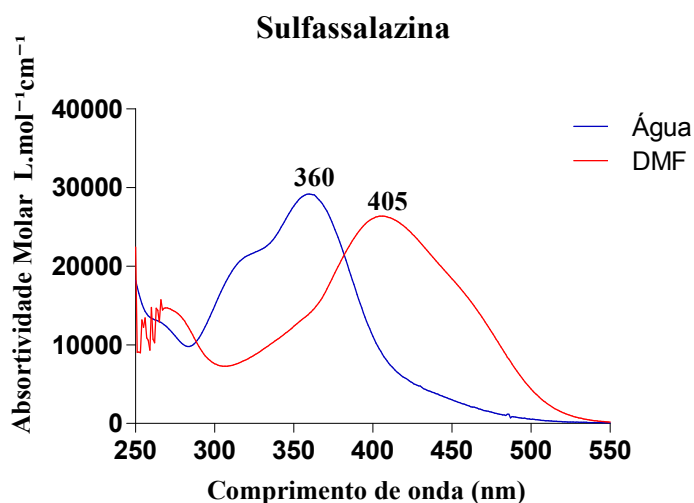
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Obtenção do espectro de absorção, na faixa do UV-Vis, da SSZ em água e em dimetilformamida (DMF)

- **Experimental**

Na Figura 8 encontra-se o espectro de absorção da SSZ em diferentes solventes.

Figura 8- Espectro de absorbância no UV-Vis experimental da SSZ, nos solventes água e DMF. O eixo y é dado em termos de absorvidade molar e o eixo x em termos do comprimento de onda.



Em água o comprimento de onda máximo é de 360 nm, enquanto que em DMF o máximo é 405 nm. A água é um solvente polar prótico, por conta do grupo hidroxila O-H, o que faz com que seu hidrogênio possa interagir com os elétrons não ligantes (n) do soluto

formando ligações de hidrogênio. Essa interação estabiliza fortemente o orbital n , fazendo com que a diferença energética entre ele e o π^* se torne maior. Sendo assim, a absorção máxima da transição $n \rightarrow \pi^*$ aparece em menores comprimento de onda. Já o DMF é um solvente polar aprótico. Apesar de realizar ligação de hidrogênio, o solvente polar aprótico não tem hidrogênios para estabilizar o orbital não ligante do soluto. Pelo contrário, a ligação de hidrogênio entre ele e o soluto polar se dá através da interação dos hidrogênios do soluto com os orbitais não ligantes do próprio solvente. Dessa forma, não ocorre estabilização do orbital n do soluto e a diferença energética da transição $n \rightarrow \pi^*$, nesse meio, será menor do que em um meio prótico. Portanto, o comprimento de onda do máximo de absorção é deslocado para maiores comprimentos de onda (KASHA, 1950).

Além disso, há outras explicações a respeito dessa diferença observada quando a SSZ está em água e em DMF. Uma delas é a explicação através da constante dielétrica dos solventes. Quanto maior a constante dielétrica (mais polar) maior é a solvatação e estabilização dos elétrons não ligantes, inferindo em maior diferença energética da transição $n \rightarrow \pi^*$. Quanto menor a constante dielétrica (menos polar), menor é a solvatação e estabilização do n diminuindo a energia da transição $n \rightarrow \pi^*$. A constante dielétrica afeta as transições eletrônicas de forma muito similar as interações intermoleculares entre soluto e solvente (SABATÉ et al, 2001).

Outra explicação relacionada com o comportamento observado no solvente DMF pode ser o fato da dimetilformamida possuir um grupo básico amídico ($-NR_2$) cujo par de elétrons não ligantes pode interagir com os orbitais π , do sistema conjugado do soluto,

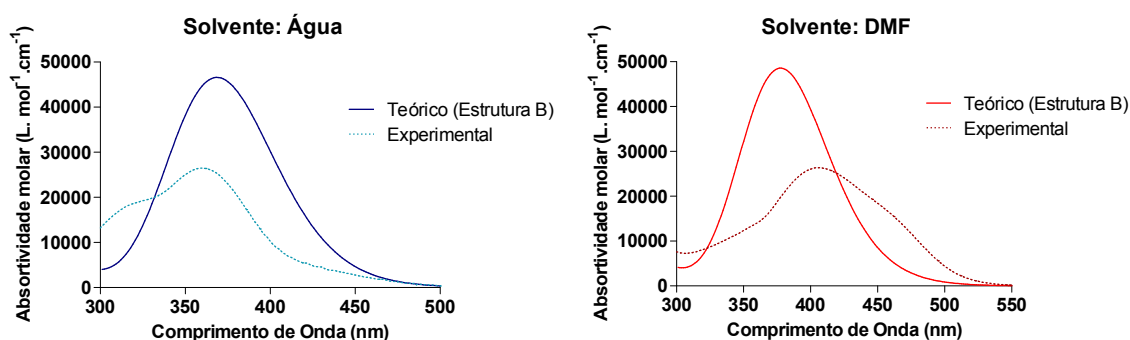
estabilizando o π^* e diminuindo a energia da transição $n \rightarrow \pi^*$ (WEI et al, 1996; CONGDON et al, 1993).

Todos esses apontamentos podem estar contribuindo para os sinais resultantes no espectro, justificando a diferença de 45 nm, no comprimento máximo de absorção, quando em água e em DMF.

- **Teórico**

Abaixo encontra-se os espectros de absorção teórico e experimental da SSZ, em água e em DMF (Figura 9). Ao lado das curvas teóricas, calculadas no nível CAM-B3LYP/6-311+G(d,p), encontra-se a letra referente a qual estado de protonação (Figura 4 e 5) o sinal se refere. No Anexo A encontram-se os resultados e as discussões que justificam o estado de protonação escolhido.

Figura 9- Espectros teóricos e experimentais da SSZ nos solventes água e DMF. Na legenda de cada espectro teórico encontram-se entre parênteses a estrutura escolhida em função de seu estado de protonação.



Nota-se que os valores de absorptividade molar experimentais e teóricos ficaram distantes um do outro. Mas, os comprimentos de onda na absorptividade máxima ficaram próximos (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação entre os valores experimentais e teóricos dos comprimentos de onda no máximo de absorptividade da SSZ em água e DMF.

Solvente	Comprimento de onda máximo de absorptividade (nm)	
	Experimental	Teórico
Água	360	369
DMF	405	387

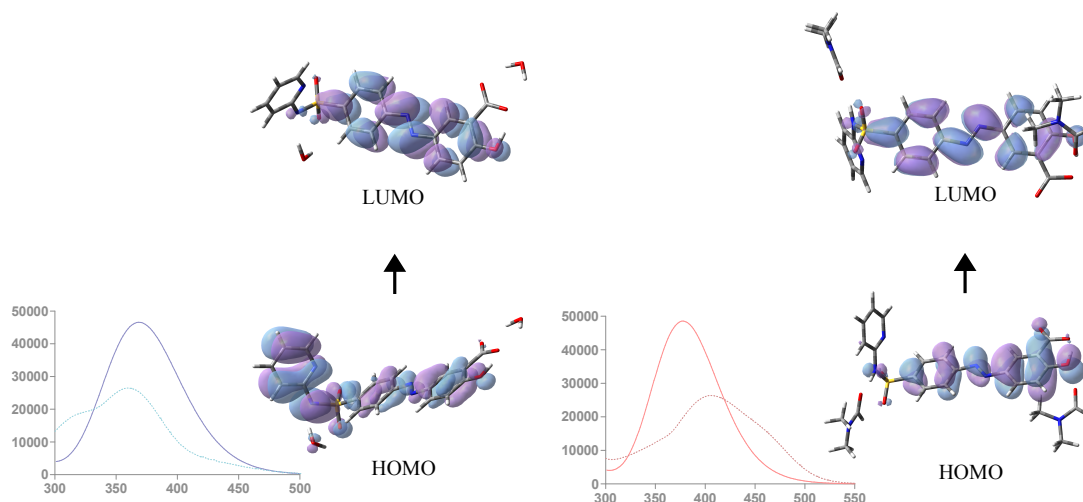
Em água, a diferença entre teórico e experimental foi de apenas 9 nm, enquanto que em DMF a diferença foi de 18 nm. Apesar disso, pode-se dizer que o método híbrido reproduziu de maneira satisfatória o efeito batocrômico de água para DMF, em comparação com o método implícito (Anexo A).

O fato do método implícito não reproduzir corretamente o efeito batocrômico pode significar que o espectro experimental tem influência das interações intermoleculares entre soluto e solvente, que não são reproduzidas ao se considerar somente a constante dielétrica do meio. Ressalta-se, no entanto, que a performance do método implícito também pode estar relacionada com o modelo teórico escolhido para descrevê-lo. Há diversos outros tratamentos de solventes na literatura, além de outras abordagens do modelo SCRF – PCM usado neste trabalho (TOMASI et al, 2005; ZHANG et al, 2017; KLAMT et al, 1998). E

também pode significar que a micro solvatação realizada ao redor do soluto não foi corretamente reproduzida.

O sucesso do método híbrido evidencia a significativa contribuição das interações intermoleculares, entre soluto e solvente, nos sinais de absorção. Podemos afirmar que o sinal da SSZ em água é devido à estabilização do n e que o sinal em DMF é devido à estabilização do orbital π^* através da extensão da conjugação. Os orbitais moleculares confirmam este fato (Figura 10).

Figura 10- Orbitais envolvidos no espectro de absorção da SSZ em água e DMF.



No HOMO observa-se os orbitais não ligantes dos oxigênios carboxílicos e do nitrogênio ligado à sulfona, enquanto que no LUMO tem-se os orbitais π^* .

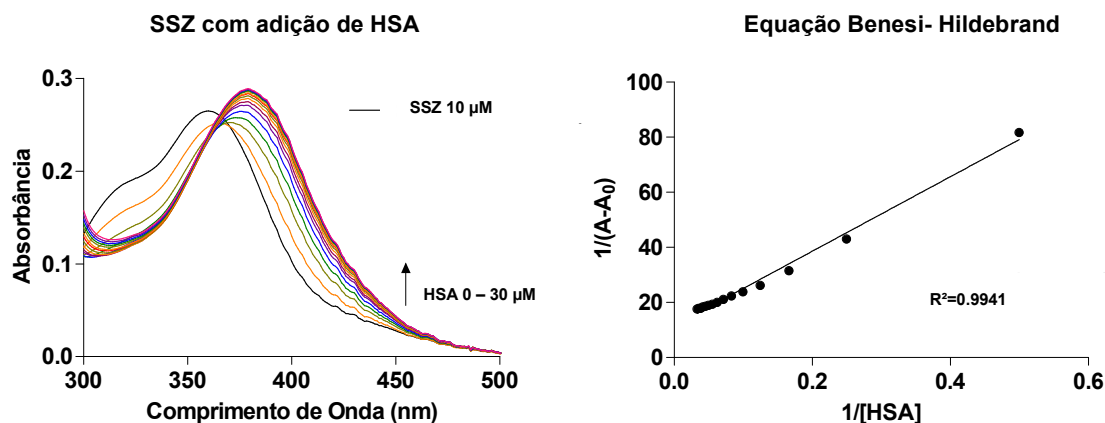
Em relação ao estado de protonação apresentado na simulação, o espectro teórico em água foi obtido com a SSZ desprotonada no ácido carboxílico, pKa 2,6, e no nitrogênio ligado ao grupo sulfona, pKa 6,1 (estrutura B). Como o pH da água é em torno de 7,0, é esperado que esses grupos estejam desprotonados. O resultado teórico desse estado de protonação foi o que mais se aproximou do experimental. Já em relação ao solvente DMF, o estado de protonação com melhor resultado foi a SSZ desprotonada no ácido carboxílico. Estados de protonação em água são mais fáceis de prever e calcular, enquanto que em outros solventes esse trabalho não é trivial.

O estado de protonação em DMF é proveniente de testes que comparavam os espectros teóricos com o experimental, mas a diferença de 18 nm (Tabela 3) entre os comprimentos de onda podem estar relacionados com diversos fatores. Pode ser que em DMF têm-se vários estados de protonação contribuindo para o sinal em 405 nm ou que o tratamento e o modelo de solvatação utilizados não estejam reproduzindo a micro solvatação que o DMF proporciona à SSZ.

6.2. Determinação da constante de associação (K_a), por absorbância, da SSZ na HSA e na BSA

Fixando a concentração de SSZ e variando a concentração de HSA, obtém-se várias curvas de absorbância em função do comprimento de onda (Figura 11).

Figura 11- Espectro de Absorbância da SSZ (10 μM) com adição de HSA (0-30 μM), à esquerda, e aplicação da equação de Benesi- Hildebrand com o R^2 , à direita. Na faixa entre 250 – 300 nm encontra-se a absorbância característica da proteína.



No espectro de absorbância observa-se o encontro das linhas espectrais em 370 nm. Esse ponto chama-se ponto isosbético e sua existência aponta para o surgimento de uma ou mais nova(s) espécie(s), no meio, sem a ocorrência de intermediários na conversão (BRASLAVSKY, 2007; BERLETT et al, 2000). Além disso é possível notar que, a medida que se adiciona HSA, os espectros sofrem efeito batocrômico e hipercrômico. Efeito batocrômico é o deslocamento do comprimento de onda máximo de absorção para valores maiores e efeito hipercrômico é o aumento da absorbância. Esses dois efeitos podem estar relacionados com a polaridade do meio (constante dielétrica) em que a SSZ se encontra e/ou com o aparecimento de interações intermoleculares entre o ligante e os resíduos de aminoácidos (CHOWDHURY et al, 2019). Na sessão 6.1 foi mostrado que a transição em 360 nm da SSZ envolve os elétrons n e π^* .

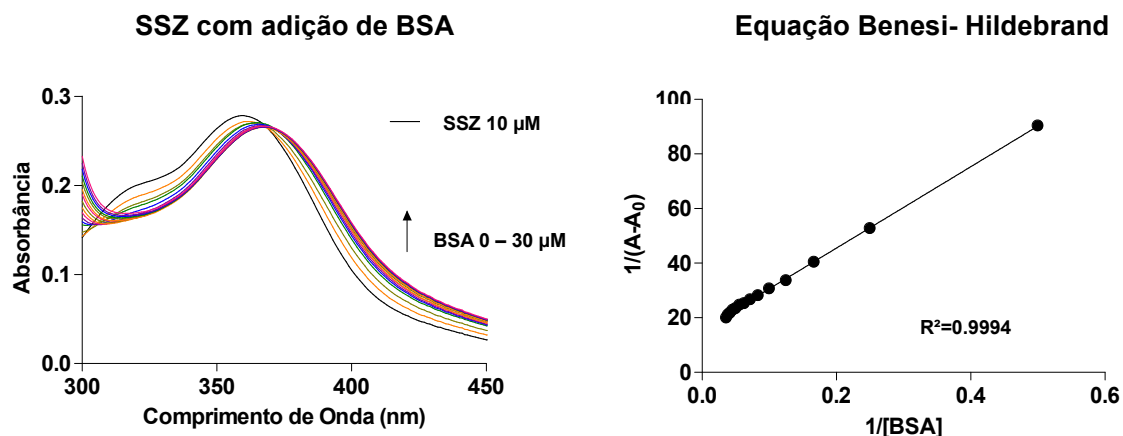
A polaridade interfere na transição $n \rightarrow \pi^*$ aumentando a energia entre eles, quanto maior a constante dielétrica, e diminuindo a energia entre eles quanto menor a constante dielétrica. O interior proteico é mais hidrofóbico do que a água, de forma que o ligante fica exposto a um meio com menor constante dielétrica, quando complexado. Dessa forma, ocorre deslocamento batocrômico em função da adição de HSA. A diminuição da energia entre n e π^* também torna a transição mais eficiente, causando efeito hipercrômico (SABATÉ et al, 2001).

E as interações intermoleculares interferem de maneira que ligações de hidrogênio envolvendo os elétrons n deslocam a transição $n \rightarrow \pi^*$ para maiores comprimentos de onda e as interações hidrofóbicas (empacotamento $\pi - \pi$, $\pi - \text{alquil}$, interação $\pi - \sigma$ etc), promovem uma extensão da conjugação dos anéis aromáticos do soluto, diminuindo a energia do orbital π^* e, conseqüentemente, a energia da transição $n \rightarrow \pi^*$ (CONGDON et al, 1993; WEI et al, 1996; WEI et al, 1997; ZSILA et al, 2005). Sendo assim, os efeitos observados no espectro é uma mistura do efeito da polaridade do meio e das interações intermoleculares.

Pela equação de Benesi o K_a do complexo SSZ- HSA é $(0,81 \pm 0,02) \times 10^5$ L.mol⁻¹.

No caso da proteína BSA (Figura 12), observa-se que o efeito batocrômico e hipercrômico são menos acentuados do que na HSA.

Figura 12- Espectro de Absorbância da SSZ (10 μ M) com adição de BSA (0-30 μ M), à esquerda, e aplicação da equação de Benesi- Hildebrand com o R^2 , à direita. Na faixa entre 250 – 300 nm encontra-se a absorbância característica da proteína.



Isso pode estar relacionado com um menor número de interações hidrofóbicas entre SSZ e os resíduos de aminoácidos (microambiente) e/ou com uma menor hidrofobicidade do DS1 da BSA como um todo (ambiente químico do sítio). Essas duas hipóteses relacionam-se diretamente com a disposição e conformação do ligante no sítio que, nesse caso, parece ocorrer de forma diferente nas duas proteínas. Destaca-se, no entanto, que a afinidade do fármaco com ambas as proteínas é similar, sendo o K_a na BSA igual a $(1,1 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}$.

O R^2 se aproximou satisfatoriamente de 1 na determinação das constantes para HSA e BSA.

6.3. Ensaios de competição de sítio na HSA, por absorvância, entre a SSZ e os fármacos: ibuprofeno, varfarina, digitoxina, tiroxina e mesalazina

Fixando a concentração de SSZ e a concentração do competidor de sítio, junto da adição de HSA obtêm-se curvas cujos dados podem ser tratados também com a aplicação da equação de Benesi- Hildebrand. A competição de sítio foi realizada com um fármaco por vez e as constantes de associação da SSZ, para cada situação, encontram-se na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4 - Valores das constantes de associação, K_a , em $L.mol^{-1}$ do conjunto SSZ + HSA na ausência e na presença dos competidores de sítio digitoxina, ibuprofeno, mesalazina, tiroxina e varfarina.

Fármacos	Constante de Associação da SSZ em $(mol/L)^{-1}$
SSZ	$(0,81 \pm 0,02) \times 10^5$
SSZ + Digitoxina	$(0,51 \pm 0,09) \times 10^5$
SSZ + Ibuprofeno	$(0,82 \pm 0,11) \times 10^5$
SSZ + Mesalazina	$(2,57 \pm 0,15) \times 10^5$
SSZ + Tiroxina	$(0,45 \pm 0,12) \times 10^5$
SSZ + Varfarina	$(0,51 \pm 0,09) \times 10^5$

Os espectros de absorvância e os gráficos da equação de Benesi encontram-se no Anexo B. Eles assemelham-se bastante ao apresentado na sessão anterior.

Observa-se pelo comportamento do K_a que na presença dos fármacos varfarina (DS1), digitoxina (DS3) e tiroxina (FA5 e DS1) ocorre uma diminuição. Essa diminuição pode indicar afinidade por esses sítios, mas como a constante diminuiu em magnitude

semelhante com os três competidores não é possível dizer somente por esses valores qual sítio aparenta ser o preferencial. É importante destacar que um fármaco ter um sítio preferencial na proteína não significa que ele não se aloca em outras regiões. Por exemplo, a L-tiroxina é encontrada no sítio 5 de ácidos graxos, mas também pode se alocar no DS1 e no DS2 como mostrado pela estrutura cristalográfica realizada por Isabelle Peptipas e colaboradores (PEPTITPAS et al, 2003). A diminuição do K_a na presença da tiroxina pode ser devido a competição por ambos os sítios DS1 e FA5 ou apenas por um deles, não sendo possível determinar qual apenas com os resultados obtidos.

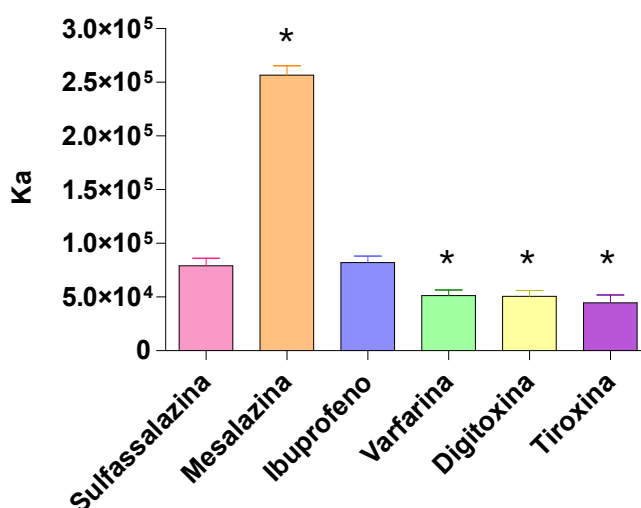
Outra observação é o aumento no K_a da SSZ na presença da mesalazina, que vai de $0,81 \times 10^5$ para $2,57 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}$. Essa variação é bem expressiva quando comparado com a variação provocada pela presença dos demais competidores, sendo que a constante é cerca de 3 vezes maior quando 5-ASA encontra-se presente. Uma hipótese para explicar esse fenômeno do aumento é a ocorrência de tipo de efeito alostérico na proteína. Efeito alostérico é quando a complexação entre duas moléculas provoca mudanças estruturais em uma delas, fazendo com que a molécula afetada possa interagir mais ou menos com outras moléculas (ASCENZI et al, 2006).

Esse fenômeno não é incomum, uma vez que a HSA é uma macromolécula de 66 kDa de peso molecular e com várias cavidades que podem abrigar moléculas. No sangue, ela encontra-se preenchida quase que inteiramente por substância menores, o que não é inesperado para uma molécula de transporte (FASANO et al, 2005). Sendo assim, a complexação da mesalazina no DS2 da HSA poderia estar induzindo mudanças na cadeia polipeptídica, que torna a complexação entre ela e a SSZ mais favorável, aumentando o K_a .

6.4. Teste estatístico para comparar os resultados da constante de associação da SSZ e HSA, na presença dos competidores

O teste estatístico ANOVA ($P < 0,05$) realizado a fim de comparar as diferenças entre o K_a do sistema SSZ + HSA com as constantes na presença de competidores, indicou diferença no valor com os fármacos mesalazina, digitoxina, varfarina e tiroxina (Figura 13).

Figura 13- Comparação Estatística entre os valores de constante de associação apenas da sulfassalazina e da sulfassalazina na presença dos competidores de sítio (mesalazina, ibuprofeno, varfarina, digitoxina e tiroxina). O asterisco indica quais competidores alteram o K_a de forma significativa ($P < 0,05$).



Não houve diferença encontrada no valor do K_a com a adição de ibuprofeno, como pode ser visto no gráfico da Figura 17. Esse resultado corrobora com a discussão proposta no item anterior, apontando para certa afinidade da SSZ pelos sítios DS1, DS3 e FA5

sem que se possa distinguir qual é o preferencial. Em relação ao DS2, pode-se afirmar que não há competição pelo mesmo.

O resultado com ibuprofeno parece mostrar que não há competição pelo DS2. Isso se confirma ao comparar as constantes de associação dos dois fármacos na HSA. O K_a do ibuprofeno é $20.10^5 \text{ L.mol}^{-1}$, cerca de 25 vezes maior do que da SSZ (EVOLI et al, 2016). Se ambos estivessem competindo pelo mesmo sítio certamente haveria diminuição no K_a da SSZ, já que sua afinidade pela proteína é menor do que o competidor ibuprofeno.

6.5. Determinação da energia livre de Gibbs do complexo SSZ + HSA, na presença e ausência de competidores, através do valor de K_a

Na Tabela 5 abaixo encontram-se as energias livre de Gibbs calculadas pela fórmula (56) que envolvem o complexo SSZ + HSA. Para o cálculo foram considerados os valores de K_a obtidos em triplicata.

Tabela 5 - Valores calculados de energia livre de Gibbs, em kcal/mol, a partir dos valores de K_a do complexo SSZ-HSA com e sem adição de competidores.

Complexo SSZ + HSA	$K_a (\text{mol/L})^{-1}$	$\Delta G (\text{kcal/mol})$
Sem competidor	$(0,81 \pm 0,02) \times 10^5$	$- 6,70 \pm 0,02$
Digitoxina	$(0,51 \pm 0,09) \times 10^5$	$- 6,42 \pm 0,11$
Ibuprofeno	$(0,82 \pm 0,11) \times 10^5$	$- 6,70 \pm 0,08$
Mesalazina	$(2,57 \pm 0,15) \times 10^5$	$- 7,38 \pm 0,03$
Tiroxina	$(0,45 \pm 0,12) \times 10^5$	$- 6,33 \pm 0,18$
Varfarina	$(0,51 \pm 0,09) \times 10^5$	$- 6,42 \pm 0,11$

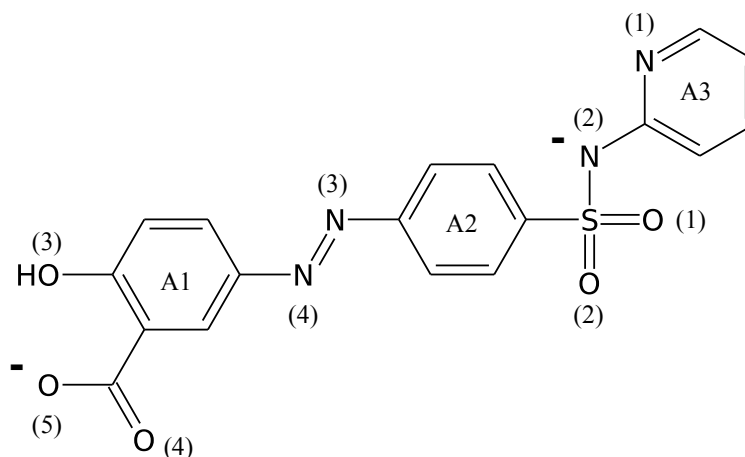
A energia livre de Gibbs ficou na faixa entre -6 e -7 kcal/ mol, sendo que seu menor valor encontrado (-7.38 kcal/mol) foi na presença da mesalazina. Isso denota que o efeito alostérico causado pela mesalazina aumenta a estabilidade do complexo SSZ-HSA. Conforma o valor do Ka aumenta, ocorre diminuição da energia livre de Gibbs e, logo, maior estabilidade da nova espécie formada.

Apesar de não estar presente na Tabela 5, também foi feito o cálculo do ΔG para o complexo entre SSZ e BSA, resultando em $(-6,85 \pm 0,11)$ kcal/mol. Esse valor, assim como o Ka, ficou próximo do obtido para a HSA.

6.6. *Docking* molecular e análise de interações não covalente

Na Figura 14 abaixo segue a numeração da SSZ usada para nomear as partes do fármaco que interagem com os aminoácidos do sítio DS1 da HSA e BSA, junto do estado de protonação usado no *docking*.

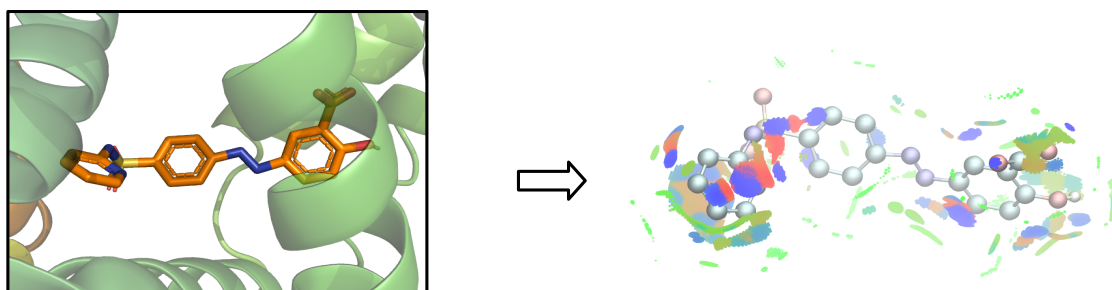
Figura 14- Representação 2D da SSZ com os átomos, que sofrem interações intermoleculares no *docking*, enumerados.



- **SSZ no DS1 da HSA**

A energia da melhor pose obtida no *redocking* da SSZ (Figura 15) foi de -10,2 kcal/mol. A melhor pose tem um RMSD de 0,15 Å em relação as coordenadas cristalográficas da SSZ localizada no DS1.

Figura 15- Redocking da SSZ no DSI da HSA, à esquerda, e superfícies de interação não covalente computadas pelo software NCIPLOT4, à direita.



A diferença entre a energia do *docking* e a energia livre de Gibbs é de -3,5 kcal/mol. As interações encontradas estão organizadas na Tabela 6 abaixo:

Tabela 6 - Interações não covalentes obtidas do *redocking* da SSZ no DS1 da HSA.

Aminoácido	SSZ	Interação	Distância (Å)
LYS 199 - (+NH ₃)	O1 (SO ₂)	Ligação de Hidrogênio Convencional	2,2
TRP 214 - (NH)	O2 (SO ₂)		3,0
ARG 257 - (NH)	O5 (O ⁻)		2,6
SER 287 - (OH)	O4 (C=O)		2,8
LYS 199 - (+NH ₃)	N2 (N ⁻)	Eletrostática - Atração	3,9
ARG 257 - (+NH ₂)	O5 (O ⁻)		4,0
ARG 222 - (+NH ₂)	A2		4,0
TRP 214 – Anel 6 membros	A3	Empacotamento π - π	4,5
TRP 214 – Anel 5 membros	A3		3,6
ILE 290 - (CH ₃)	A1	π - σ	3,9
LEU 198 - (CHCH ₃)	A3	π - Alquil	5,0
LYS 199 - (CH ₂)	A3		4,0
ARG 218 - (CH ₂ CH ₂)	A2		4,9
ALA 291 - (CH ₃)	A1		4,9
LEU 260 - (CHCH ₃)	A1		5,2
LEU 238 - (CHCH ₃)	A1		5,5
LEU 238 - (CHCH ₃)	A2		5,4

O RMSD entre a estrutura do *redocking* e a cristalográfica é pequeno, indicando que o *redocking* foi feito de maneira satisfatória sendo possível realocar o ligante com a mesma conformação e mesma disposição que o ligante experimental. Das interações intermoleculares encontradas destacam-se, entre as polares, que há 4 ligações de hidrogênio e 3 interações eletrostáticas do tipo atrativas. As ligações de hidrogênio são as mais fortes

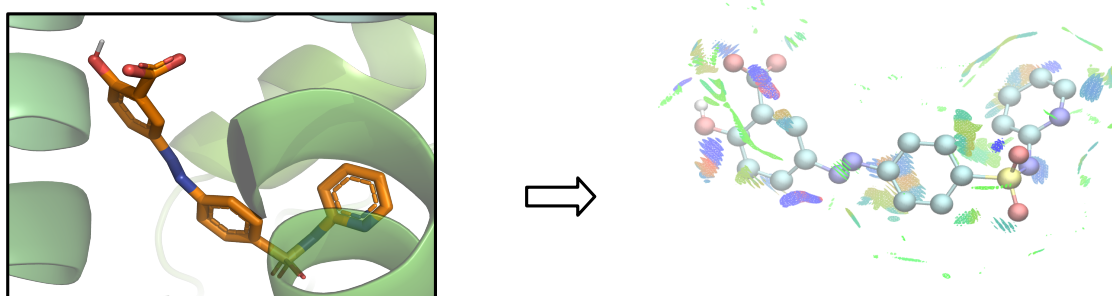
dentre as interações intermoleculares e elas envolvem os hidrogênios polares dos resíduos de aminoácidos Lys 199, Trp 214, Arg 257 e Ser 287.

Das interações hidrofóbicas temos: empacotamento $\pi - \pi$, interação $\pi - \sigma$ e interação $\pi - \text{alquil}$. Juntas elas somam 10 interações intermoleculares, sendo mais numerosas do que as polares. A predominância de interações hidrofóbicas pode ser uma justificativa do deslocamento batocrômico observado no espectro de absorbância com a proteína HSA. Elas envolvem os resíduos Ile 290, Leu 198, Lys 199, Arg 218, Ala 291, Leu 260 e Leu 238. Destaca-se que a interação hidrofóbica de menor distância é o empacotamento $\pi - \pi$ com o anel de 5 membros do triptofano 214.

- **SSZ no DS1 da BSA**

A energia obtida no *docking* da SSZ (Figura 16) na estrutura foi de -9,1 kcal/mol.

Figura 16- docking da SSZ no DS1 da BSA, à esquerda, e superfícies de interação não covalente computadas pelo software NCIPLOT4, à direita.



A diferença da energia do *docking* e a energia livre de Gibbs é de -2,2 kcal/mol. A energia dos dois *dockings*, HSA (-10,2 kcal/mol) e BSA (-9,1 kcal/mol), foram similares o que corrobora com o resultado experimental, uma vez que o K_a e a energia livre de Gibbs dos complexos SSZ-HSA (-6,70 kcal/mol) e SSZ-BSA (-6,87 kcal/mol) são similares.

Na Tabela 7 abaixo seguem as interações encontradas entre a SSZ e a BSA:

Tabela 7 - Interações não covalentes obtidas do *docking* da SSZ no DS1 da BSA.

Aminoácido	SSZ	Interação Intermolecular	Distância (Å)
ALA 290 - (OH)	N4 (N=N)	Ligação de Hidrogênio Convencional	3,2
ARG 198 - (+NH ₂)	O5 (O ⁻)		2,2
ARG 198 - (+NH ₂)	O5 (O ⁻)	Eletrostática - Atração	3,0
ARG 217 - (+NH ₂)	A1		4,5
ARG 194 - (CH ₂ CH ₂)	A1	π - Alquil	5,0
ALA 290 - (C β)	A1		5,0
ALA 260 - (CH ₃)	A3		5,0
LEU 259 - (CHCH ₃)	A3		5,0
ILE 289 - (CH ₃)	A3		4,5
LEU 237 - (CHCH ₃)	A2		5,3
ALA 290 - (CH ₃)	A3		5,5
ALA 256 - (CH ₂ CH ₂)	A3		5,3
ALA 290 - (C β)	A2	π - σ	3,9

Dentre as interações intermoleculares polares encontradas na BSA têm-se 2 ligações de hidrogênio e 2 interações eletrostáticas atrativas. As ligações de hidrogênio envolvem os hidrogênios dos resíduos Ala 290 e Arg 198. Dentre as interações intermoleculares hidrofóbicas encontram-se interação $\pi - \sigma$ e interação $\pi -$ alquil. Assim

como na HSA, na BSA as interações apolares também são as predominantes, somando 9 interações, e envolvem os resíduos Arg 194, Ala 290, Ala 260, Leu 259, Ile 289, Leu 237 e Ala 256.

As interações hidrofóbicas na BSA não foram significativamente diferentes das encontradas na HSA que justifiquem o deslocamento batocrômico menos intenso na absorbância com a proteína bovina. Pode-se destacar que na HSA há empacotamento $\pi - \pi$, interação que não se observa na BSA. Mas é difícil afirmar que é isso o que justifica as diferenças no deslocamento batocrômico para as duas proteínas.

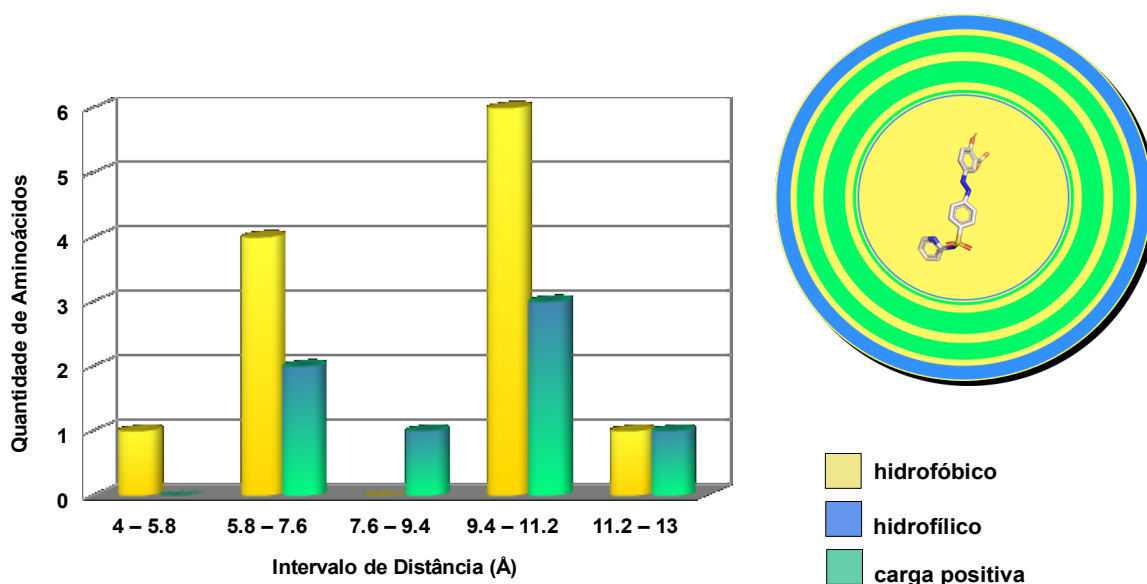
As interações intermoleculares permitem uma leitura do microambiente ao redor do ligante, mas pode ser que a polaridade do sítio esteja contribuindo no batocromismo. Para investigar essa hipótese, fez-se um mapeamento da polaridade dos aminoácidos do DS1 das duas proteínas. Mediu-se as distâncias entre o carbono alfa dos aminoácidos que compõe o DS1 das proteínas e o centro de massa da SSZ. As distâncias foram obtidas dos resultados do *docking* através do software Discovery Studios 2021.

Os aminoácidos que caracterizam o sítio 1 da HSA são amplamente conhecidos, sendo: TYR150, LYS199, PHE211, TRP214, ALA215, ARG218, LEU219, ARG222, PHE223, LEU234, LEU238, HIS242, ARG257, LEU260, ALA261, ILE264, ILE290, ALA291, GLU292 (PETERS, 1996). Já para a BSA há uma carência de estudos que determinam os aminoácidos que aparecem com mais frequência nas vizinhanças do ligante. Portanto, a escolha dos aminoácidos da BSA foram feitos considerando três estruturas cristalográficas no Protein Data Bank que possuem ligante no DS1: o PDB 4or0 com ligante naproxeno, o PDB 4jk4 com ligante 3,5- diiodossalicílico e o próprio PDB 6qs9 com ligante

cetoprofeno (BUJACZ et al, 2014; SEKULA et al, 2013; CASTAGNA et al, 2019). Sendo assim, para a BSA os aminoácidos são: TYR149, ARG194, ARG198, ARG217, LEU218, LYS221, PHE222, LEU237, HIS241, ARG256, LEU259, ALA260, ILE263, SER286, ILE289, ALA290, GLU291.

No anexo A encontra-se os valores de distância coletados organizados em uma tabela. Com esses dados foram feitos círculos concêntricos, onde o centro dos mesmos é o centro de massa da SSZ e os raios são as distâncias. Os círculos foram coloridos de acordo com a polaridade do aminoácido, sendo amarelo para hidrofóbicos, azul para hidrofílicos e verde para carregados positivamente. Também fez-se gráficos em barra onde as distâncias foram agrupadas em intervalos e contabilizados a quantidade de aminoácidos polares e apolares em cada intervalo. Na Figura 17 abaixo seguem os resultados coletados para a SSZ na HSA.

Figura 17- Gráfico em barras e círculos concêntricos realizados com as distâncias da SSZ até os resíduos de aminoácidos do DS1 da HSA, junto da polaridade dos mesmos separadas por cor.

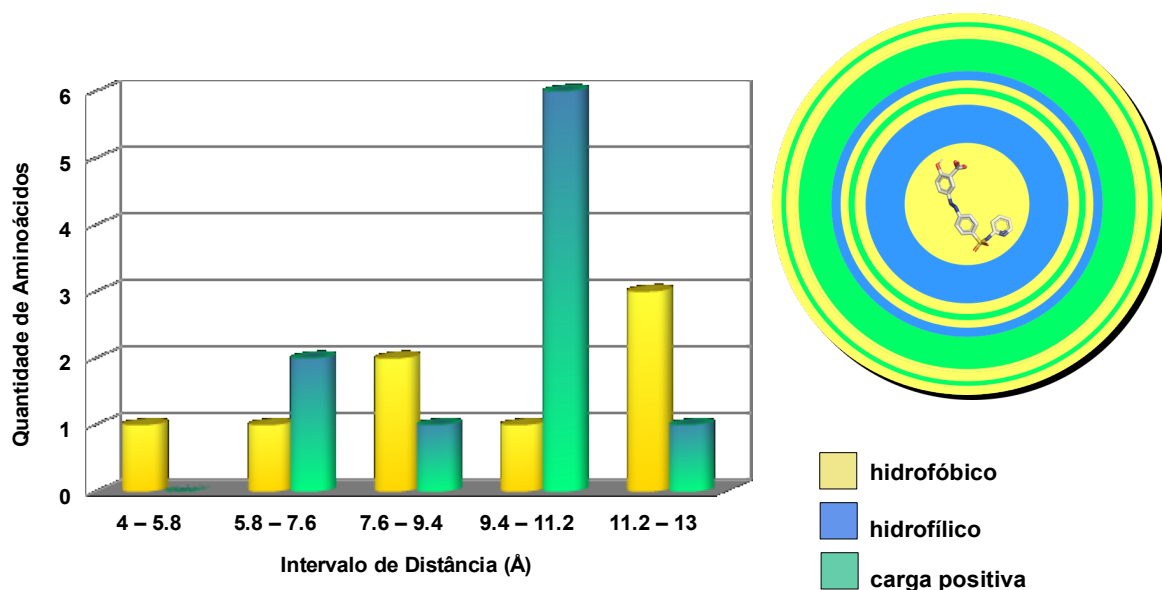


Como já apontado anteriormente, a distribuição dos aminoácidos em função das distâncias mostra que a região onde a sulfassalazina está no DS1 da HSA é predominantemente apolar. Nessa proposta de análise há dependência da posição do centro de massa do ligante, algo que pode mudar em função da disposição do mesmo no sítio. Como esses resultados vieram de uma estrutura experimental, deduz-se que a distribuição dos resíduos e posição do ligante estão mais próximas do real, de forma que podemos afirmar que o meio em que a SSZ está inserida é bastante hidrofóbico e, provavelmente, junto das

interações intermoleculares apolares é o que causa o acentuado deslocamento do comprimento de onda de absorção para o vermelho.

Já para a BSA (Figura 18) os dados devem ser analisados com cautela, porque não tem estrutura cristalográfica da albumina bovina com ligante SSZ como tem da HSA. Então pode-se fazer apenas uma estimativa da distribuição de aminoácidos em relação ao ligante. Estimativa essa que provém dos resultados de *docking*.

Figura 18- Gráfico em barras e círculos concêntricos realizados com as distâncias da SSZ até os resíduos de aminoácidos do DS1 da HSA, junto da polaridade dos mesmos separadas por cor.



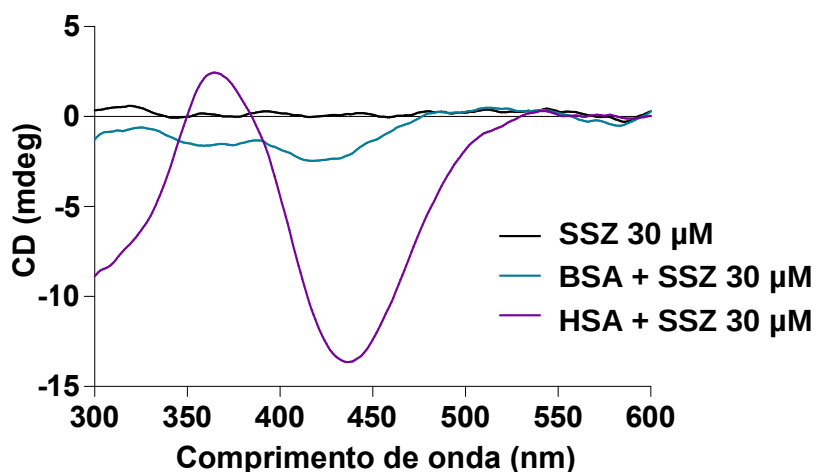
A distribuição de aminoácidos na proteína bovina demonstra, no geral, um perfil mais hidrofóbico do que hidrofílico. Mas, em comparação com o perfil obtido na HSA ele tem menor hidrofobicidade. Isso vai de encontro ao deslocamento batocrômico menos intenso observado no espectro de absorção com a BSA. Um estudo conduzido por Rahman e Khalil apontam que a SSZ complexa no sítio 1 de Sudlow para as duas proteínas (RAHMAN et al, 2023). Isso indica fortemente que os resultados experimentais tem maior contribuição da complexação no DS1 do que em demais sítios que a sulfassalazina possa se alocar. As simulações foram conduzidas considerando apenas o DS1 e conversam com os resultados de absorbância, indicando que o efeito batocrômico e hipercrômico relacionam-se com a polaridade do sítio e com as interações intermoleculares hidrofóbicas. Sendo assim, existem diferenças na forma como a SSZ complexa nas duas proteínas, apesar de ser o mesmo sítio e delas serem muito similares.

6.7. Obtenção do espectro de dicroísmo circular eletrônico do fármaco SSZ na ausência e na presença das proteínas HSA e BSA

- **Experimental**

Os espectros individuais das proteínas isoladas encontram-se representados no Anexo B. Na Figura 19 abaixo encontram-se os espectros de ECD da SSZ sem e com a adição das proteínas. O sinal de Dicroísmo Circular (CD) é apresentado no eixo y em miligraus (mdeg).

Figura 19- Espectros experimental de ECD da SSZ nas proteínas HSA e BSA.



O que se observa é que o fármaco isolado não apresenta nenhum sinal de ECD.

Esse resultado é esperado, uma vez que a SSZ não possui centro quiral. Já no interior das proteínas ocorre o aparecimento de um modesto sinal. Esse sinal surge devido à interação entre proteína e ligante e chama-se Dicroísmo Circular Induzido (em inglês *Induced Circular Dichroism*, ICD) (DE SOUZA et al, 2019). O ICD pode estar relacionado com as interações estabelecidas entre a SSZ e um ambiente quiral, como os resíduos de aminoácidos. As interações não covalentes podem fazer com que o ligante fique impossibilitado de sofrer rotação(ões) em torno de sua(s) ligação(ões) simple(s), levando ao aparecimento de certa quiralidade axial (atropoisômero ou rotâmero) (DE SOUZA et al, 2017).

Atropoisômeros apresentam atividade ótica podendo ser detectados através da técnica de dicroísmo circular. Quando livre em solução a molécula não apresenta quiralidade

axial, porque a mesma está livre para rotacionar suas ligações simples, assumindo todos os atropoisômeros possíveis cujos sinais de ECD se cancelam (DOS SANTOS et al, 2007). Uma forma de atestar essa hipótese é realizando o scan da molécula de sulfassalazina, junto do ECD de cada confôrmero obtido para verificar se há conformações com sinais de ECD opostos.

A polaridade do meio também pode interferir no sinal de ICD, pois o sinal e a polaridade estão diretamente relacionados com as transições eletrônicas. A polaridade do meio pode alterar a energia de uma transição tornando-a mais, ou menos, eficiente (DE SOUZA et al, 2017; SABATÉ et al, 2001). Além disso, o aparecimento de ICD pode ser explorado para realização de competição de sítio, porque a presença de um outro ligante pode provocar alterações no sinal do fármaco de interesse.

É possível notar que esse sinal aparece mais intensamente na proteína HSA , enquanto que na BSA ele é bastante discreto. Há inúmeras hipóteses para explicar essa discrepância. A SSZ pode estar assumindo conformações distintas, no interior das duas proteínas, que respondem de forma diferente à luz circularmente polarizada resultando nos ICDs observados. Pode ser que, além da conformação, também haja influência da polaridade dos sítios no sinal. Polaridade essa que se mostrou diferente em ambas as proteínas nos resultados de absorbância.

Também pode-se interpretar que o aparecimento do sinal é devido a uma atropoisomeria decorrente da interação da SSZ com os resíduos de aminoácidos. Essa atropoisomeria pode ser oriunda de uma maior rigidez do fármaco na HSA por conta do maior número de ligações de hidrogênio observadas no *docking*. Na BSA as ligações de hidrogênio

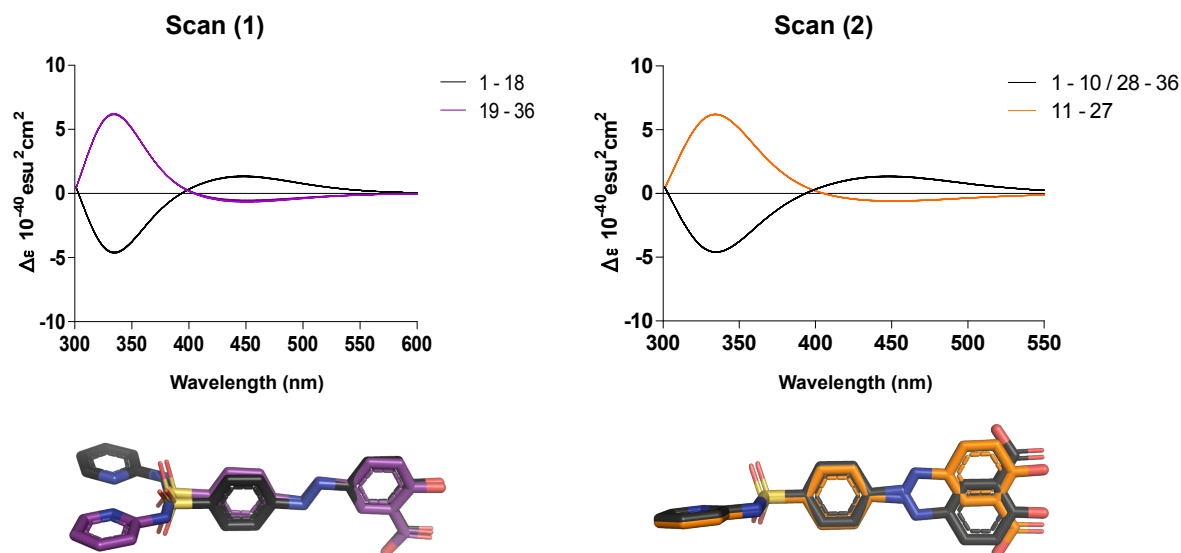
são menos numerosas, o que poderia facilitar a rotação das ligações simples da SSZ deixando-a mais livre para assumir outros arranjos espaciais. Dessa forma, seria um cenário parecido com o que ocorre quando o fármaco está em solução: ao rotacionar suas ligações simples, ele assume conformações cujos sinais de ICD podem se reduzir ou até mesmo se excluir. Essa hipótese já foi levantada antes na literatura. Shahi Reja e colaboradores reportaram no estudo de uma sonda fluorescente, que a mesma possui maior seletividade com a HSA devido ao menor tamanho do sítio 1 que impede rotações das ligações simples da sonda. Já na BSA o sítio 1 é maior, fazendo com que a sonda tenha maior liberdade rotacional, ligando-se mais fracamente. Os tamanhos dos DS1 foram comparados através de uma medida de área do DS1 que atribui à HSA o valor de $820,63 \text{ cm}^{-2}$ e a BSA o de $868,27 \text{ cm}^{-2}$ (REJA et al, 2016).

Uma outra explicação para os sinais pode estar relacionados com a complexação da SSZ em mais de um sítio proteico. Sendo assim, o sinal de ICD seria a soma dos sinais, de cada conformação adotada pela SSZ, em todos os sítios que a mesma se aloca.

- **Teórico**

O scan realizado nos diedros 1 e 2 resultaram em um gráfico onde das conformações em função da energia. Os gráficos estão apresentados no Anexo A. O que se observa deles é que as conformações obtidas possuem energia muito próximas, indicando que a molécula pode assumir todas as formas calculadas sem uma barreira energética que impeça. Isso está de acordo com a explicação de que a SSZ assume todas as formas possíveis, em solução, não apresentando sinal de dicroísmo circular. Além disso, os espectros de ECD dos confôrmeros do scan também apresentaram sinais que se cancelam (Figura 20).

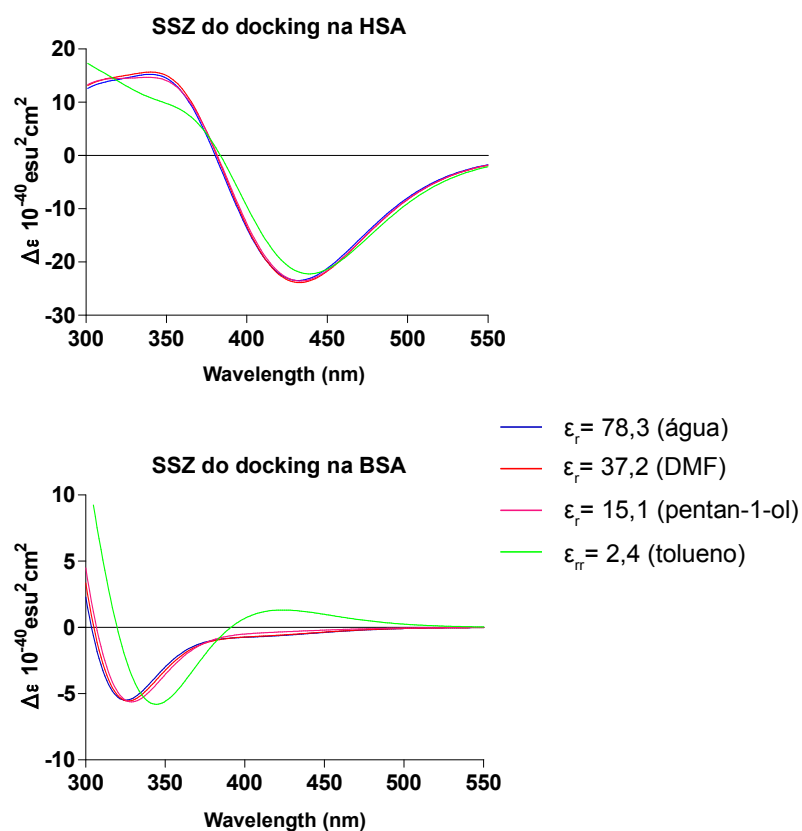
Figura 20- Espectros de dicroísmo circular obtidos de cada conformação da varredura realizada nos diedros 1 e 2. Os conformêros estão enumerados de 1 a 36. Abaixo dos espectros encontram-se dois conformêros, de exemplo, explicitando a diferença conformacional entre as moléculas que se obtém na varredura.



Esse resultado é uma elucidação da explicação que envolve o atropoisomerismo da sulfassalazina. Apesar de não possuir centro quiral a molécula pode rotacionar ligações simples assumindo isomeria axial. O isômero axial (rotâmero) interage com a luz circularmente polarizada apresentando sinal de dicroísmo circular. Mas, em solução, a SSZ assume todos os atropoisômeros possíveis, resultando em sinal nulo. Ao interagir com um ambiente quiral, como um sítio proteico, um rotâmero pode ser selecionado, em detrimento dos demais, de acordo com as interações estabelecidas com esse ambiente. Além disso, a polaridade da região e o tamanho da mesma podem influenciar no sinal.

O resultado dos ECDs das estruturas obtidas do *docking* (Figura 21) estão em função da variação da constante dielétrica para assim, ser possível avaliar tanto conformação quanto a polaridade do meio.

Figura 21- Dicroísmo circular das estruturas da SSZ provenientes do docking, na HSA e na BSA, obtidos em diferentes constante dielétricas, sendo: 78,3 (água), 37,2 (DMF), 15,1 (pentan-1-ol) e 2,4 (tolueno).



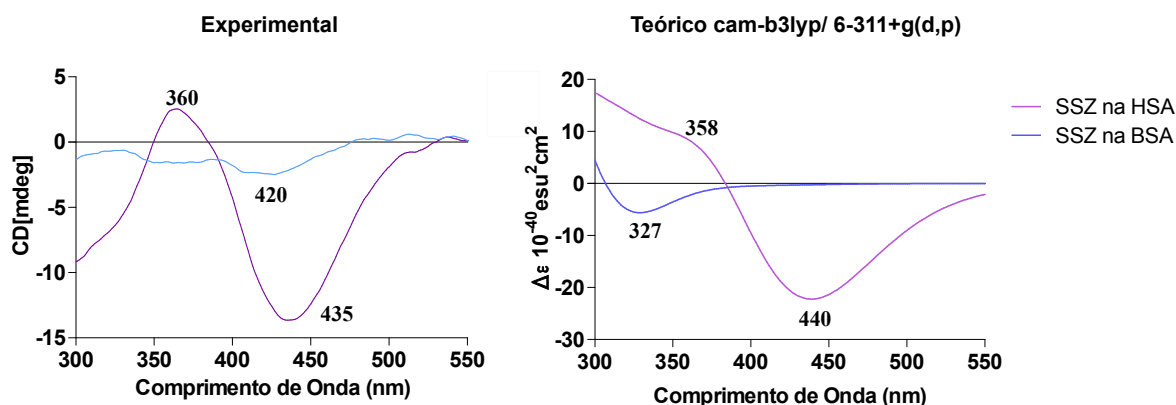
O perfil do sinal obtido na HSA e BSA são diferentes, o que reflete que há diferença conformacional na SSZ alocada nos sítios 1 de ambas as proteínas. No Anexo A encontram-se apresentadas as estruturas do *docking* alinhadas a fim de explicitar as diferenças conformacionais.

Nos dois casos observa-se que não há mudanças no espectro de ECD para as constantes dielétricas 78,3, 37,2 e 15,1. Mas para a constante dielétrica de valor 2,4 ocorre deslocamento batocrômico.

Na HSA, o sinal que mais se aproximou do experimental (Figura 22) foi o obtido com o solvente tolueno, cujos picos de absorção se localizam em 360 nm e 440 nm. Apesar disso, os espectros obtidos nos meios mais polares também tiveram resultados satisfatórios. Seus comprimentos de onda se localizam em menores valores, mas o perfil do sinal se manteve o mesmo e a transição envolvida é a $n \rightarrow \pi^*$. A conformação adotada pela SSZ na HSA não sofre significativas alterações quando se altera a constante dielétrica.

Na BSA ocorre o contrário. O sinal obtido no solvente tolueno apresenta um pico positivo em 420 nm que não se observa no experimental. Todos os sinais envolvem a transição $n \rightarrow \pi^*$, mas em 420 nm tem-se a contribuição de orbitais HOMO e LUMO que não aparecem nos demais espectros. Os sinais mais próximos do experimental são os obtidos com constante dielétricas maiores (Figura 22).

Figura 22- Comparação entre os espectros experimentais e teóricos da SSZ na proteína HSA e BSA. Os eixos y estão diferentes, mas a comparação foi feita apenas com os valores de comprimento de onda encontrados no eixo x. Os valores máximos encontram-se destacados em negrito.



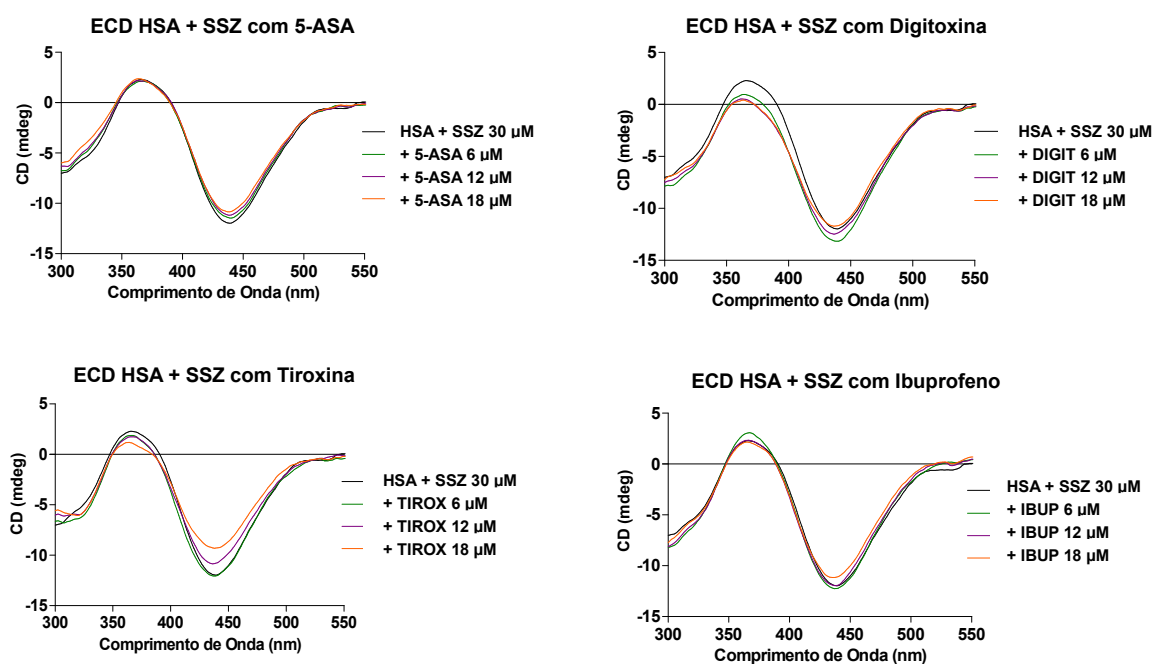
O resultado teórico da HSA foi o que mais se aproximou do experimental, sinalizando que a conformação da SSZ encontrada na estrutura cristalográfica 6r7s está muito próxima da realidade experimental. Para a BSA pode-se dizer que houve aproximação entre o teórico e o experimental, embora os comprimentos de onda tenham ficado distantes. A tendência observada é um fraco sinal negativo, demonstrando que a conformação obtida no *docking* foi satisfatória e que a análise da polaridade do sítio 1 da mesma também está de acordo com o observado ao variar as constantes dielétricas. No entanto, não se pode excluir a possibilidade do sinal na BSA ser devido à contribuição de outras conformações encontradas em outros sítios da proteína. Nesse trabalho não foi realizado ensaios de competição de sítio na BSA que poderia auxiliar no entendimento dessa possibilidade. Também não se deve excluir a possibilidade do fármaco possuir mais graus de liberdade rotacional no DS1 da BSA,

já que os resultados do *docking* mostraram um número menor de ligações de hidrogênio e há relato na literatura desse fenômeno.

6.8. Ensaios de competição de sítio na HSA, por dicroísmo circular eletrônico, entre a SSZ e os fármacos: ibuprofeno, varfarina, digitoxina, tiroxina e mesalazina

Na Figura 23 abaixo seguem os resultados de competição de sítio com os fármacos 5-ASA, ibuprofeno, digitoxina e *L*-tiroxina. As concentrações de SSZ e HSA usadas foram de 30 μ M cada.

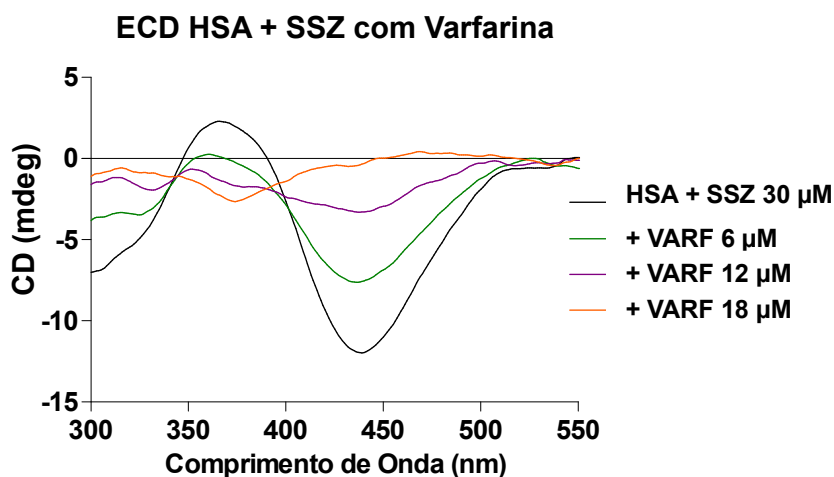
Figura 23- Espectros de ECD da SSZ e da HSA na presença dos fármacos mesalazina (5-ASA), digitoxina (DIGIT) e tiroxina (TIROX) e ibuprofeno (IBUP).



Observa-se que com os fármacos *L*-tiroxina e digitoxina há uma leve supressão no sinal da SSZ. Esse comportamento indica competição de sítio, o que corrobora com a diminuição do K_a quando esses mesmos fármacos estão presentes. O resultado com a digitoxina sugere afinidade pelo DS3 e o resultado com a *L*-tiroxina sugere afinidade pelo DS1 ou FA5, já que o hormônio pode ser sonda de ambos os sítios. Com ibuprofeno e mesalazina não ocorre supressão do ICD, confirmando que a SSZ não é um fármaco de DS2 como já apontado anteriormente pelo valor de K_a .

Para o fármaco varfarina (Figura 24) a supressão de sinal de ICD foi muito significativa.

Figura 24- Espectro de ECD da SSZ e da HSA na presença de varfarina (VARF).



A varfarina é um conhecido fármaco de sítio 1 de Sudlow da HSA e que possui constante de associação com a HSA de magnitude $3,3 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}$ (PINKERTON et al, 1990). A supressão do sinal da SSZ sugere que a adição de varfarina retira a sulfassalazina, uma vez que sua afinidade é maior. Como a supressão é mais efetiva com a varfarina do que com os demais fármacos, é possível confirmar que o sítio preferencial da SSZ é o DS1. Esse resultado não é tão claro quando visto apenas pelo ponto de vista do valor do K_a medido por absorbância. E está de acordo com resultados divulgados na literatura (RAHMAN et al, 2023; SULKOWSKA et al, 2005; RÓWNICKA-ZUBICK et al, 2008).

O ensaio de competição por ECD demonstra que o sinal da SSZ provém, em sua totalidade, da conformação que o mesmo adota no DS1 da albumina humana.

7. CONCLUSÃO

Com base nos estudos dirigidos neste trabalho, podemos concluir:

Em relação aos estudos de absorbância da SSZ em diferentes meios que ocorre um deslocamento batocrômico da água para o DMF. Isso é devido a diferença de polaridade desses solvente e a interações intermoleculares entre eles e o soluto que altera a diferença energética entre o n e o π^* . Esse comportamento se repete conforme as proteínas BSA e HSA são acrescida no espectro de absorção, do fármaco, indicando a ocorrência de complexação sinalizada também pelo ponto isobéstico e pelo efeito hipercrômico. Apesar da aproximação dos valores de K_a e de energia livre de Gibbs obtidos para duas proteínas, o deslocamento batocrômico foi maior na HSA.

Com o *docking* foi possível compreender que o ambiente químico do DS1 no qual o fármaco está exposto na HSA é mais hidrofóbico do que o da BSA. Também foi possível obter a energia do *docking* para os dois sistemas. Os valores ficaram um pouco distantes da energia de Gibbs, mas mantiveram o mesmo perfil quando comparados entre as proteínas. A estabilidade dos complexos são semelhantes, de forma que as diferenças encontradas são devido a estrutura do complexo e não a sua formação.

Em relação à competição de sítio envolvendo o fármaco SSZ e demais competidores na HSA, pode-se concluir pelos ensaios de absorbância e ECD que a SSZ possui preferência pelo DS1 e nenhuma afinidade pelo DS2. Já em relação aos demais sítios é possível verificar que há afinidade da SSZ pelo DS3.

Além disso, o sinal de ICD nas proteínas é por conta do surgimento de quiralidade axial do ligante por conta das interações estabelecidas com o ambiente quiral do sítio. Na

HSA o espectro está diretamente relacionado com a conformação que o fármaco adota no DS1, junto do efeito da polaridade do ambiente químico que compõe o sítio. Para a BSA não se pode afirmar que o sinal é devido inteiramente a conformação e/ou a polaridade do sítio. É necessário realizar mais estudos a fim de verificar o que faz com que o sinal de ICD nessa proteína seja menos intenso. As possíveis explicações são: maior grau de liberdade do ligante no sítio e/ou contribuição de outras conformações encontradas em outros sítios.

Referências Bibliográficas

ABRAHAM, M. H. Scales of Solute Hydrogen-Bonding: Their Construction and Application to Physicochemical and Biochemical Processes. *Chemical Society Reviews*, v. 22, n. 2, p. 73-83, 1993.

ADAMO, C., BARONE, V. Toward Reliable Density Functional Methods Without Adjustable Parameters: The PBE0 Model. *The Journal of Chemical Physics*, v. 110, n. 13, p. 6158-6170, 15 abr. 1999.

ADAMO, C., JACQUEMIN, D. The Calculations of Excited-State Properties with Time-Dependent Density Functional Theory. *The Royal Society of Chemistry*, v. 42, n. 3 p. 845–856, 2013.

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, 1 set. 2019.

ALBERTS, B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1464 p.

ANSLYN, E. V., DOUGHERTY, D. A., *Modern Physical Organic Chemistry*. California: University Science Books, 2006.

ASCENZI, P., et al. Allosteric Modulation of Drug Binding to Human Serum Albumin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 6, n. 4, p. 483-489, 2006.

ASCENZI, P., et al. The Drug-Dependent Five- to Six-Coordination Transition of the Heme-Fe Atom Modulates Allosterically Human Serum Heme-Albumin Reactivity. *Rendiconti Lincei*, v. 28, n. (Suppl 1), p. 207-215, 2016.

ATKINS, P. W. *Físico-Química*. v. 1, 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999.

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.

BACH, A. Classification of Indistinguishable Particles. *Europhysics Letters*, v. 21, n. 5, p. 515-520, 10 fev. 1993.

BACH, A. Indistinguishable particles: definitions and implications. *Physics Letters*, v. 151, n. 1,2, 26 nov. 1990.

BAGAYOKO, D. Understanding Density Functional Theory (DFT) and Completing it in Practice. *API Advances*, v. 4, n. 12, p. 127104(1-12), 2014.

BAK, K. L. et al. Ab initio Calculation of Electronic Circular Dichroism Fortrans-Cyclooctene using London Atomic Orbitals. *Theoretica Chimica Acta*, v. 90, n. 5-6, p.441–458, 1995.

BALL, D. W. *The Basics of Spectroscopy*. Bellingham, WA: SPIE - The International Society for Optical Engineering, 2001. 133 p.

BARCELOS, G. B. et al. Molecular Modeling as a Tool for Drug Discovery. *Current Drug Targets*, v. 9, n. (S.I.), p. 1084-1091, 2008.

BARON, R., McCAMMON, J. A. Molecular Recognition and Ligand Association. Annual Review of Physical Chemistry, v. 64, n. 1, p. 151–175, 2013.

BARONI, S. et al. Effect of Ibuprofen and Warfarin on the Allosteric Properties of Human Serum Albumin. European Journal of Biochemistry, v. 268, n. 23, p. 6214–6220, 2001.

BECKE, A. D. A New Mixing of Hartree–Fock and Local Density-Functional Theories. The Journal of Chemical Physics, v. 98, n. 2, p. 1372-1377, 15 jan. 1993.

BECKE, A. D. Density- Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic Behavior. Physical Review A, v. 38, n. 6, p. 3098-3100, 15 set. 1988.

BECKE, A. D. Density-Functional Thermochemistry. IV. A New Dynamical Correlation Functional and Implications for Exact-Exchange Mixing. The Journal of Chemical Physics, v. 104, n.3, p. 1040-1046, 1996.

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

BERLETT, B. S.; LEVINE, R. L.; STADTMAN, E. R. Use of Isosbestic Point Wavelength Shifts to Estimate the Fraction of a Precursor That Is Converted to a Given Product. Analytical Biochemistry, v. 287, n. 2, p. 329 –333, 2000.

BERTOZO, L. C. Desenvolvimento de Sondas Fluorescentes para Determinação de Sítios de Ligação em Albumina: Estudo da Relação entre Estrutura Molecular, Constante de

Associação e Especificidade. 2021. 151 f. Tese (Doutor em Ciência e Tecnologia de Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2021.

BEZZIO, C., FESTA, S., SAIBENI, S., PAPI, C., Chemoprevention of Colorectal Cancer in Ulcerative Colitis: Digging Deep in Current Evidence. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, v. 11, n. 4, p. 339-347, 2017.

BHATTACHARYA, A. A., GRUNE, T., CURRY, S. Crystallographic Analysis Reveals Common Modes of Binding of Medium and Long-chain Fatty Acids to Human Serum Albumin. *Journal of Molecular Biology*, v. 303, n. 5, p. 721-732, 10 nov. 2000.

BHATTACHARYA, A. A.; CURRY, S., FRANKS, N. P. Binding of the General Anesthetics Propofol and Halothane to Human Serum Albumin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 49, p. 38731-38738, 8 dez. 2000.

BISHOP, D. M., KIRTMAN, B. A Perturbation Method for Calculating Vibrational Dynamic Dipole Polarizabilities and Hyperpolarizabilities. *The Journal of Chemical Physics*, v. 95, n. 4, p. 2646–2658, 1991.

BLUNDELL, T. L. Protein Crystallography and Drug Discovery: Recollections of Knowledge Exchange Between Academia and Industry. *International Union of Crystallography Journal*, v. 4, n. 4, p. 308-321, 2017.

BOHR, N. On the Constitution of Atoms and Molecules. *Philosophical Magazine and Journal of Science*, v. 26, n. 6, p. 1-24, 1913.

BORN, M., OPPENHEIMER, R. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Annalen der Physik*, v. 84, n. 20, p. 457-484, 25 ago. 1927.

BOTO, R. A. et al. Interpretation of the Reduced Density Gradient. *Molecular Physics*, v. 114, n. 7-8, p. 1406–1414, 2015.

BOYS, S. F. .Electronic Wave Functions. I. A General Method of Calculation for the Stationary States of Any Molecular System. *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 200, n. 1063, p. 542-554, 1950.

BRASLAVSKY, S. E. Glossary of Terms Used in Photochemistry 3rd Edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*, v. 79, n. 3, p. 293-465, 2007.

BRITO, M. A. Estudando Interações Fármaco-Receptor com o Protein Data Bank (PDB) e Programas Gratuitos. *Revista Virtual de Química*, v. 3, n. 6, p. 467-483, 2011.

BUJACZ, A.; ZIELINSKI, K.; SEKULA, B. Structural Studies of Bovine, Equine, and Leporine Serum Albumin Complexes with Naproxen. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 82, n. 9, p. 2199–2208, 2014.

CAETANO, R. A. Spin-Current and Spin-Splitting in Helicoidal Molecules Due to Spin-Orbit Coupling. *Scientific Reports*, v. 6, n.1, p. 1-11, 24 mar. 2016.

CAPRILLI, R. et al., The Long Journey of Salicylates in Ulcerative Colitis: The past and the future. *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 3, n. 3, p. 149-156, 1 set. 2009.

CARTER, D. C. et al. Three-Dimensional Structure of Human Serum Albumin. *Science*, v. 244, n. 4909, p. 1195–8, 9 jun. 1989.

CASIDA, M. E. Time-Dependent Density-Functional Response Theory for Molecules. In: CHONG, D.P., editor. Recent advances in density functional methods. Singapura: World Scientific 1995. p. 155–192.

CASTAGNA, R. et al. Biohybrid Electrospun Membrane for the Filtration of Ketoprofen Drug from Water. ACS Omega, v. 4, n 8, p. 13270–13278, 2019.

CHANDEL, T. I., et al. A Mechanistic Insight Into Protein-Ligand Interaction, Folding, Misfolding, Aggregation and Inhibition of Protein Aggregates: An Overview. International Journal of Biological Macromolecules. [S.l.]: Elsevier B.V., 2018.

CHOWDHURY, T. et al. Unveiling the Binding Interaction of Zinc (II) Complexes of Homologous Schiff-Base Ligands on the Surface of BSA Protein: A Combined Experimental and Theoretical Approach. Applied Organometallic Chemistry, v. 34, n. 4, p. 1-19, 2020.

CONGDON, R. W.; MUTH, G. W.; SPLITTGERBER, A. G. The Binding Interaction of Coomassie Blue with Proteins, v. 213, n. [S.I], p. 407-413, 1993.

CONTRERAS-GARCIA, J. et al. NCILOT: A Program for Plotting Non-Covalent Interaction Regions. Journal of Chemical Theory and Computational, v. 7, n. 3, p. 625-632, 8 mar. 2011.

CONTRERAS-GARCIA, J., YANG, W., JOHNSON, E. R. Analysis of Hydrogen-Bond Interaction Potentials from the Electron Density: Integration of Noncovalent Interaction Regions. The Journal of Physical Chemistry A, v. 115, n. 45, p. 12983–12990, 2011.

CORNATON, Y., FROMAGER, E. Double Hybrid Density-Functional Theory Using the Coulomb-Attenuating Method. *International Journal of Quantum Chemistry*, v. 114, n. 18, p. 1199-1211, 2014.

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.

COX, M. M., DOUDNA, J. A., O'DONNELL, M. *Biologia Molecular: Princípios e Técnicas*, Porto Alegre: Artmed, 2012. 943 p.

CRAMER, C.J. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. EUA: Wiley, 2004. 624 p.

CUI, F. L. et al. Fluorescence Spectroscopy Studies on 5-aminosalicylic Acid and zinc 5-aminosalicylate Interaction with Human Serum Albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 34, n. 1, p. 189-197, 2003.

CUNLIFFE, R. N., SCOTT, B. B., Review Article: Monitoring for Drug Side-Effects in Inflammatory Bowel Disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 16, n. 4, p. 647-662, 3 abr. 2002.

DAMASCENO, M. V. A. *Estudos dos Efeitos de Solventes nos Espectros de Absorção Eletrônica da Merocianina de Brooker e Derivados*. 2015. 269 f. Tese (Doutor em Ciências) – USP, Instituto de Física, São Paulo, 2015.

DAS, K. M., DUBIN, R., Clinical Pharmacokinetics of Sulphasalazine. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 1, n. 6, p. 406-425, 1976.

DAVISSON, C., GERMER, L. H. Reflection of Electrons by a Crystal of Nickel. *Nature*, v. 119, n. 2998, p. 558-560, 16 abr. 1927.

DE BROGLIE, L. Recherches sur la Théorie des Quanta. *Annales de Physique*, v. 3, n. 10, p. 22-128, 1925.

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. 135-142, 2019.

DE SOUZA, A. R.; XIMENES, V. F.; MORGON, N. H. Solvent Effects on Electronic Circular Dichroism Spectra. *In*: CHENG, H. N.; et al. Stereochemistry and Global Connectivity: The Legacy of Ernest L. Eliel (ACS Symposium Series). American Chemical Society: Washington, DC, 2017.

DE SOUZA, A. R.; XIMENES, V. F.; MORGON, N. H. Study of Relative Stability of Tautomeric Forms of Phenylbutazone and Calculation of UV-Vis and ECD Spectra. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 2, p. 525-535, 2016.

DESREUMAUX, P., GHOSH, S., Review Article: Mode of Action and Delivery of 5-aminosalicylic Acid – New Evidence. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 24, n. (suppl. 1), p. 2-9, 2006.

DI NOLA, A., ROCCATANO, D., BERENDSEN, H. J. C. Molecular Dynamics Simulation of the *docking* of Substrates to Proteins. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, v. 19, n. 3, p. 174–182, 1994.

DIVSALAR, A.; KHODABAKHSHIAN, S. Probing the Binding Site of a New Synthesized Anti-Cancer Compound to HSA Via Competitive Ligand Binding Method. *Journal of Molecular Liquids*, v. 206, n. [S.I], p. 82-88, 2015.

DOS SANTOS, A. R. et al. Atropoisomerismo: O Efeito da Quiralidade Axial em Substâncias Bioativas. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 125-135, 2007.

DU, X., et al. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 2, 26 jan. 2016.

DUNNET, C. W. A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *Journal of the American Statistical Association*, v. 50, n. 272, p. 1096–1121, 1955.

DUTTA, S., BERMAN, H. M. Large Macromolecular Complexes in the Protein Data Bank: A status report. *Structure*, v. 13, n. (S.I.), p. 381 –388, 2005.

ECKART, C. Operator Calculus and the Solution of the Equations of Quantum Dynamics. *Physical Review*, v. 28, p. 711-726, 1926.

EINSTEIN, A. Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes Betreffenden Heuristischen Gesichtspunkt. *Annalen der Physik*, v. 17, n. 4, p. 132-148, 1905.

ELIEL, E. L. Infelicitous Stereochemical Nomenclature. *Quirality*, v. 9, n. 5-6, p. 428-430, 1997.

ERNZERHOF, M., SCUSERIA, G. E. Assessment of the Perdew–Burke–Ernzerhof Exchange-Correlation Functional. *The Journal of Chemical Physics*, v. 110, n. 11, p. 5029-5036, 15 mar. 1999.

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, 2016.

FANALI, G. et al. Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 33, n. 3, p. 209-290, 2012.

FASANO, M., et al. The Extraordinary Ligand Binding Properties of Human Serum Albumin. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, v. 57, n. 12, p. 787–796, 2005.

FASMAN, G. D. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Nova York: Plenum Press, 1996. 739 p.

FERMI, E. Statistical Method to Determine Some Properties of Atoms. *Accademia Nazionale dei Lincei*, v. 6, n. [S.I], p. 602-607, 1927.

FOCK, V. A. Näherungsmethode zur Lösung des Quantenmechanischen Mehrkörperproblems. *Zeitschrift für Physik*, v. 61, n.1, p. 128-148, 1930.

FORESMAN, J.B.; FRISCH, A. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. 2. ed. Pittsburgh: Gaussian Inc., 1996. 335 p.

FROESER FISCHER, C. General Hartree- Fock Program. *Computer Physics Communications*, v. 43, n. 3, p. 355-365, 1987.

GAUSSIAN 09, Revision C.01, Frisch, M. J. et al. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

GAUSSIAN 16, Revision C.01, Frisch, M. J. et al. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.

GAUSSIAN. Creating UV/Visible Plots from the Results of Excited States Calculations, 2017.

Disponível em: <https://gaussian.com/uvvisplot/> < Acessado em 6 de out. de 2023 >

GAUSSIAN. SCRF: Solvents, 2021. Disponível em: <https://gaussian.com/scrf/> < Acessado em 15 de dez. de 2023 >

GAUSSVIEW, Version 6, Dennington, R.; Keith, T. A.; Millam, J. M. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2016.

GELLMAN, S. H. Introduction: Molecular Recognition. Chemical Reviews, v. 97, n. 5, p.1231–1232, 1997.

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, 14 out. 2005.

GRAPHPAD PRISM, versão 5.0, Dotmatics. Disponível em: <https://www.graphpad.com/> < Acessado em 6 de jan. de 2004.

GRAY, C. G., KARL, G., NOVIKOV, V. A. Progress in Classical and Quantum Variational Principles. Reports on Progress in Physics, v. 67, n. 2, p.159-208, 2004.

GUPTA, A. K., et al. Sulfasalazine Improves psoriasis: A Double-Blind Analysis. Archives of Dermatology, v. 126, n. 4, p. 487-493, 1990.

HAGE, D. S.. SENGUPTA, A. Characterisation of the Binding of Digitoxin and Acetyldigitoxin to Human Serum Albumin by High-Performance Affinity Chromatography.

Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 724, n. 1, p. 91–100, 1990.

HARTREE, D. R. The Wave Mechanics of an Atom with a Non-Coulomb Central Field. Part II. Some Results and Discussion. Proceedings of the Cambridge Philosophical Society, v. 24, n. 89, p. 111-132, 1928.

HARTREE, D. R., HARTREE W. Self-Consistent Field, with Exchange, for Beryllium. Proceedings of the Royal Society of London, v. 150, n. 869, p. 9-33, 25 fev. 1935.

HASHEMPOUR, S., et al. Binding Studies of AICAR and Human Serum Albumin by Spectroscopic, Theoretical, and Computational Methodologies. Molecules, v. 25, n. 22, p. 5410-5427, 2020.

HEISENBERG, W. Über quantentheoretische Umdeutung kinematischer und mechanischer Beziehungen. Zeitschrift für Physik, v. 33, p. 879-893, 1925.

HELGAKER, T. JORGENSEN, P. An electronic Hamiltonian for origin independent calculations of magnetic properties. The Journal of Chemical Physics, v. 95, n.4, p. 2595–2601, 1991.

HERFARTH, H., The Role of Chemoprevention of Colorectal Cancer with 5-Aminosalicylates in Ulcerative Colitis. Digestive Diseases, v. 30, n. (suppl. 2), p. 55-59, 2012.

HEWITT, L. F. Separation of Serum Albumin Into Two Fractions. Biochemical Journal, v. 30, n. 12, p. 2229–2236, 1936.

HOHENBERG, P., KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review*, v. 136, n. 3B, p. B864–B871, 9 nov. 1964.

HOUSE, J. E. *Fundamentals of Quantum Chemistry*. 2 ed. Califórnia: Academic Press, 2003. 291 p. (Complementary Science Series).

IIKURA, H. et al. A Long-Range Correction Scheme for Generalized-Gradient-Approximation Exchange Functionals. *The Journal of Chemical Physics*, v. 115, n. 8, p. 3540-3544, 2001.

JACQUEMIN, D., MENNUCCI, B., ADAMO, C. Excited-state Calculations with TD-DFT: From Benchmarks to Simulations in Complex Environments. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 13 n. 38, p. 16987-16998, 2011.

JANIN, J. Protein- Protein Recognition. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 64, n. 2-3, p. 145-166, 1995.

JOHNSON, E. R. et al. Revealing Noncovalent Interaction. *Journal of American Chemical Society*, v.132, n. 18, p. 6498-6506, 2010.

KLAMT, A.; et al. Refinement and Parametrization of COSMO-RS. *The Journal of Physical Chemistry A*, v. 102. n. 26, p. 5074-5085, 1998.

KARLSSON, B. C. G., et al. The Spectrophysics of Warfarin: Implications for Protein Binding. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 111, n. 35, p. 10520–10528, 2007.

KASHA, M. Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules. *Discussions of the Faraday Society*, v. 9, n. [S.I], p. 14-19, 1950.

KHALAF, S., et al. TiO₂ and Active Coated Glass Photodegradation of Ibuprofen. *Catalysts*, v. 10, n. 5, p. 560-577, 2020.

KNOX, J. R., PRATT, R. F. Different modes of vancomycin and D-alanyl-D-alanine peptidase binding to cell wall peptide and a possible role for the vancomycin resistance protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 34, n. 7, p. 1342–1347, 1990.

KOHN, P., SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review*, v. 140, n. 4A, p. A1133-A1138, 15 nov. 1965.

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.

KSENOFONTOV, A. A., et al. Water-Soluble BODIPY-Based Fluorescent Probe for BSA and HSA Detection. *Journal of Molecular Liquids*, v. 345, n. [S.I], p. 117031–117040, 2021.

LAURENT, A. D., ADAMO, C., JACQUEMIN, D. Dye chemistry with time-dependent density functional theory. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 16, n. 28, p. 14334–14356, 28 jul. 2014.

LEE, C., YANG, W., PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Physical Review B*, v. 37, n. 2, p. 785-789, 15 jan. 1988.

LENGAUER, T., RAREY, M. Computational Methods for Biomolecular *docking*. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 6, n.3, p. 402–406, 1996.

LUBRIN, N. C. M. et al. Dialkylated Dihydroazulene and Vinylheptafulvene Derivatives - Synthesis and Switching Properties. *European Journal of Organic Chemistry*, v. 2017, n. 20, p. 2932–2939, 2017.

MAHADEVI, A. S., SASTRY, G. N. Cation– π Interaction: Its Role and Relevance in Chemistry, Biology, and Material Science. *Chemical Reviews*, v. 113, n. 3, p. 2100–2138, 2012.

MAJOREK, K. A., et al. Structural and Immunologic Characterization of Bovine, Horse, and Rabbit Serum Albumins. *Molecular Immunology*, v. 52, n. (3- 4), p. 174-182, 2012.

MARDIROSSIAN, N., HEAD-GORDON, M. Thirty Years of Density Functional Theory in Computational Chemistry: An overview and Extensive Assessment of 200 Density Functionals. *Molecular Physics*, v. 115, n. 19, p. 2315-2372, 2017.

MARTINS, P., et al. Utilização de Sulfassalazina no Tratamento de Doentes com Urticária Crónica Idiopática – Experiência de um Serviço de Imunoalergologia. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, v. 13, n. 2, p. 165-170, 2005.

MARVINVIEW, versão 17.21.0, Chemaxon. Disponível em: <https://chemaxon.com/>. < Acessado em 6 de jan. de 2024 >

MORGON, N. H., CUSTODIO, R. Funções de Base: O Ajuste Variacional. *Chemkeys*, v. [s.i.], n. 2, p. 1-17, 2001.

MORGON, N. H., CUSTODIO, R. Teoria do Funcional da Densidade. *Química Nova*, v. 18, n. 1, p. 44-55, 1995.

MORRIS, G. M. et al. Autodock4 and AutoDockTools4: Automated *docking* with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

MURPHY, B. E. P., PATTEE, C. J. Determination of Thyroxine Utilizing the Property of Protein-Binding. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 24., n. 2, p. 187–196, 1964.

NEUMANN, V. C., GRINDULIS, K. A., Sulphasalazine in Rheumatoid Arthritis: An Old Drug Revived. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v. 77, n. 3, p. 169-172, 7 mar 1984.

NOCEDAL, J., WRIGHT S. J. Numerical Optimization. Berlim: Springer Verlag, 1999. (Springer Series in Operations Research).

PANSINI, F. N. N. Conjunto de Bases Gaussianas Universal para átomos de K até Kr. 2013. 77 f. Dissertação (Mestre em Física Atômica e Molecular) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Vitória, 2013.

PAULING, L., WILSON, E. B. Introduction to Quantum Mechanics. Singapura: McGraw-Hill Book Company, 1935. 468 p. (Physics Series).

PEPTITPAS, I., et al. Structural Basis of Albumin–Thyroxine Interactions and Familial Dysalbuminemic Hyperthyroxinemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100. n. 11, p. 6440-6445, 2003.

PERDEW, J. P., BURKE, K., ERNZERHOF, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Physical Review Letters*, v. 77, n. 18, p. 3865-3868, 26 out. 1996.

- PERDEW, J. P., ERNZERHOF, M., BURKE, K. Rationale for Mixing Exact Exchange with Density Functional Approximations. *The Journal of Chemical Physics*, v. 105, n. 22, p. 9982-9985, 1996.
- PETERS, T. JR. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*. San Diego: Academic Press Inc, 1996, 432 p.
- PETROV, A. I., LUTOSHKIN, M. A. TD-DFT Assessment of UV-Vis Spectra Palladium and Platinum Complexes with Thiols and Disulfides. *Journal of Molecular Modeling*, v. 27, n. 6, p. (S.I.), 2021.
- PINKERTON, T. C.; KOEPLINGER, K. A. Determination of Warfarin-Human Serum Albumin Protein Binding Parameters by an Improved Hummel-Dreyer High-Performance Liquid Chromatographic Method Using Internal Surface Reversed-Phase Columns. *Analytical Chemistry*, v. 62, n. 19, p. 2114–2122, 1990.
- PLANCK, M. On the Law of Distribution of Energy in the Normal Spectrum. *Annalen der Physik*, v. 4, n. 4, p. 553, 1901.
- POPLE, J. A., GILL, P. M., JOHNSON, B. G. Kohn—Sham density-functional theory within a finite basis set. *Chemical Physics Letters*, v. 199, n.6, p. 557–560, 1992.
- PRETSCH, E., BUHLMANN, P., BADERTSCHER, M. *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*. 4. ed. Berlin: Springer, 2009. 433 p.
- RAHMAN, N. KHALIL, N. Characterization of Sulfasalazine-Bovine Serum Albumin and Human Serum Albumin Interaction by Spectroscopic and Theoretical Approach.

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 300, n. [S.I.], p. 122865- 122880, 2023.

RANDAD, R. S., et al. Allosteric Modifiers of Hemoglobin. 1. Design, Synthesis, Testing, and Structure-Allosteric Activity Relationship of Novel Hemoglobin Oxygen Affinity Decreasing Agents. Journal of Medicinal Chemistry, v. 34, n. 2, p. 752–757, 1991.

REJA, S. I. et al. A TICT Based NIR-Fluorescent Probe for Human Serum Albumin: A Pre-Clinical Diagnosis in Blood Serum. Chemical Communications, v. 52, n. 6, p. 1182-1185, 2016.

RIBEIRO, D. Gustav Kirchhoff. Revista de Ciência Elementar, v. 4, n. 2, p. 24-26, 2015.

RILEY, K. E., HOBZA, P. On the Importance and Origin of Aromatic Interactions in Chemistry and Biodisciplines. Accounts of Chemical Research, v. 46, n. 4, p. 927–936, 2012.

RÓWNICKA-ZUBICK, J., et al. Fluorescence Analysis of Sulfasalazine Bound to Defatted Serum Albumin in the Presence of Denaturing Factors. Journal of Molecular Structure, v. 924–926, n. (S.I.), p. 371–377, 2008.

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.

RUNGE, E., GROSS, E. K. U. Density-Functional Theory for Time-Dependent Systems. Physical Review Letters, v. 52, n. 12, p. 997-1000, 19 mar. 1984.

RYAN, A. Azoreductases in Drug Metabolism. *British Journal of Pharmacology*, v. 174, n. 14, p. 2161–2173, 2017.

SABATÉ, R.; FREIRE, L.; ESTELRICH, J. Influence of Dielectric Constant on the Spectral Behavior

of Pinacyanol. *Journal of Chemical Education*, v. 78, n. 2, p. 243-244, 2001.

SALH, B., et al., Dissociated ROS Production and Ceramide Generation in Sulfasalazine-Induced Cell Death in Raw 264.7 cells. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 72, n. 4, p. 790-799, 2002.

SANTRA, B. Density-functional Theory Exchange-Correlation Functionals for Hydrogen Bonds in Water. 2010. 152 f. Tese (Doutor em Física Teórica) - Fakultät II of Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Berlin, Departamento de Teoria Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin, 2010.

SCHRODINGER, E. Quantisierung als Eigenwertproblem. *Annalen der Physik*, v. 79, n. 6, p. 361-376, 1926.

SEKULA, B.; ZIELINSKI, K.; BUJACZ, A. Crystallographic Studies of the Complexes of Bovine and Equine Serum Albumin with 3,5-Diiodosalicylic Acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 60, n. [S.I], p. 316–324, 2013.

SHAHABADI, N., FILI, S. M. Molecular Modeling and Multispectroscopic Studies of the Interaction of Mesalamine with Bovine Serum Albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 118, n. (S.I.), p. 422–429, 2014.

- SHARMA, A.; PURKAIT, B. Energy in Commercially Available Ultra-Diluted Natural Cardiotropic Drug *Digitalis purpurea*: An UV Spectroscopic Study. *Research Journal of Pharmacology*, v. 3, n. 4, p. 58-62, 2009.
- SHOLL, D. S., STECKEL, J. A. *Density Functional Theory: a practical introduction*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- SILVA, C. P. da. *Computação de Alto Desempenho com Placas Gráficas para Acelerar o Processamento da Teoria do Funcional da Densidade*. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) PUC-RIO, Departamento de Engenharia Elétrica, Rio de Janeiro, 2010.
- SIMARD, J. R. et al. Location of High and Low Affinity Fatty Acid Binding Sites on Human Serum Albumin Revealed by NMR Drug-competition Analysis. *Journal of Molecular Biology*, v. 361, n. 2, p. 336-351, 2006.
- SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. *Princípios de Análise Instrumental*. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.
- SKOOG, D. A.. et al. *Fundamentos de Química Analítica*. 8 ed. São Paulo: Ed. Thomson, 2007.
- SLATER, J. C. A Simplification of the Hartree- Fock Method. *Physical Review*, v. 81, n. 3, p. 385-390, 1 fev. 1951.
- SLATER, J. C. Molecular Energy Levels and Valence Bonds. *Physical Review*, v. 38. n. 6, p. 1109–1144, 15 set. 1931.
- SLATER, J. C. Note on Hartree's Method. *Physical Review*, v. 35, n. 2, p. 210-211, 1930

SLATER, J. C. The Self Consistent Field and the Structure Atoms. *Physical Review*, v. 32, n. 3, p. 339-348, 1928.doi:10.1021/ja02261a002

SMEDEGARD, G., BJORK, J., Sulphasalazine: Mechanism of Action in Rheumatoid Arthritis. *British Journal of Rheumatology*, v. 34, n. (suppl. 2), p. 7-15, 1995.

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. 9, 2019.

STÅHLE, L.; WOLD, S. Analysis of variance (ANOVA). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 6, n. 4, p. 259–272, 1989.

SUDLOW, G; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. The Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Molecular pharmacology*, v. 11, n. 6, p. 824–832, 1975.

SULKOWSKA, A. et al. The effect of concentration of guanidine hydrochloride on the sulfasalazine–serum albumin complex. *Journal of Molecular Structure*, v. 744-747, n. [S.I.], p. 775-779, 2005.

SZKUDLAREK, A., WILK, M., MACIAZEK-JURCZYK, M. In Vitro Investigations of Acetohexamide Binding to Glycated Serum Albumin in the Presence of Fatty Acid. *Molecules*, v. 25, n. 10, p. 2340-2359, 2020.

TAWADA, Y. et al. A Long-Range-Corrected Time-Dependent Density Functional theory. *The Journal of Chemical Physics*, v. 120, n. 18, p. 8425-8433, 8 mai. 2004.

THOMAS, L. H. The Calculation of Atomic Fields. Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society, v. 23, n. 5, p. 542-548, 1927.

PYMOL, versão 2.0, The Pymol Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC.

TILLEMENT, J. P., et al. Binding of Digitoxin, Digoxin and Gitoxin to Human Serum Albumin. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, v. 5, n. 3, p. 129–134, 1980.

TOMASI, J., MENNUCCI, B., CAMMI, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. Chemical Reviews, v. 105, n. 8, p. 2999–3094, 2005.

TROTT, O., OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of *docking* with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. Journal of Computational Chemistry, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2009.

UCHIDA, K., et al. Effect of an Allosteric Modifier of Hemoglobin, RSR-4, on Oxygen Affinity and Oxygen Saturation of Hemoglobin in Rabbits. The Japanese Journal of Physiology, v. 48, n. 6, p. 439–444, 1998.

VIVAS, M. G. et al. Revealing the Electronic and Molecular Structure of Randomly Oriented Molecules by Polarized Two-Photon Spectroscopy. The Journal of Physical Chemistry Letters, v. 4 n. 10, p. 1753–1759, 2013.

WALT, B. van der.; CAHNMANN, H. J. Synthesis of thyroid hormone metabolites by photolysis of thyroxine and thyroxine analogs in the near UV, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 79, n. [S.I.], p. 1492-1496, 1982.

- WANDERLEY, A. B. Análise Teórica da Topologia da Densidade de Carga Eletrônica em Sistemas Periódicos Tridimensionais. 2019. 111 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada Computacional) – USP, Instituto de Física, São Carlos, 2019.
- WARNKE, I., FURCHE, F. Circular dichroism: electronic. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, v. 2, n. 1, p. 150–166, 2011.
- WATKINSON, G., Sulphasalazine: A Review of 40 Years' Experience, Drugs, v. 32, n.1, p. 1-11, 1986.
- WEI, Y.; LI, K.; TONG, S. Spectral Study of Interaction of Thymol Blue with Protein in Acid Solution. Analytica Chimica Acta, v. 341, n. 1, p. 97-104, 1997.
- WEI, Y.; LI, K.; TONG, S. The Interaction of Bromophenol Blue with Proteins in Acid Solution. Talanta, v. 43, n. 1, p. 1-10, 1996.
- WENSKOWSKY, L., et al. Resolving Binding Events on the Multifunctional Human Serum Albumin. ChemMedChem, v. 15, n. 9, p. 738-743, 2020.
- WIIG, H.; KOLMANNSKOG, O.; TENSTAD, O.; BERT, J. L. Effect of charge on interstitial distribution of albumin in rat dermis in vitro. The Journal of Physiology, v. 550, n. 2, p. 505–514, 2003.
- WOLLHEIM, F. A., Nanna Svartz (1890-1986). Zeitschrift für Rheumatologie, v. 76, n. 9, p. 813-819, 9 out. 2017.

YAMASAKI, K., et al. Characterization of Site I on Human Serum Albumin: Concept About the Structure of a Drug Binding Site. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1295, n. 2, p. 147-157, 1996.

YANAI, T., TEW, D. P., HANDY, N. C. A New Hybrid Exchange–Correlation Functional Using the Coulomb-Attenuating Method (CAM-B3LYP). *Chemical Physics Letters*, v. 393, n. 1-3. p. 51-57, 2004.

YANG, F., et al. Human Serum Albumin-Based Design of a Diflunisal Prodrug. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 84, n. 3, p. 549–554, 2013.

YOGUIM, M. et al. Studies on the Interaction of Rose Bengal with the Human Serum Albumin Protein under Spectroscopic and *docking* Simulations Aspects in the Characterization of Binding Sites. *Chemosensors*, v. 10, n. 11, p. 440-452, 25 out. 2022.

YOGUIM, M. I., Studies on the Interaction of Rose Bengal with the Human Serum Albumin Protein under Spectroscopic and *docking* Simulations Aspects in the Characterization of Binding Sites. *Chemosensors*, v. 10, n. 11, p. 440-452, 2022.

ZARA, Z. et al. A Comparative Study of DFT Calculated and Experimental UV/Visible spectra for Thirty Carboline and Carbazole Based Compounds. *Journal of Molecular Structure*, v. 1149, n. (S.I.), p. 282–298, 2017.

ZHANG, J.; et al. Comparison of Implicit and Explicit Solvent Models for the Calculation of Solvation Free Energy in Organic Solvents. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 13, n. 3, p. 1034–1043, 2017.

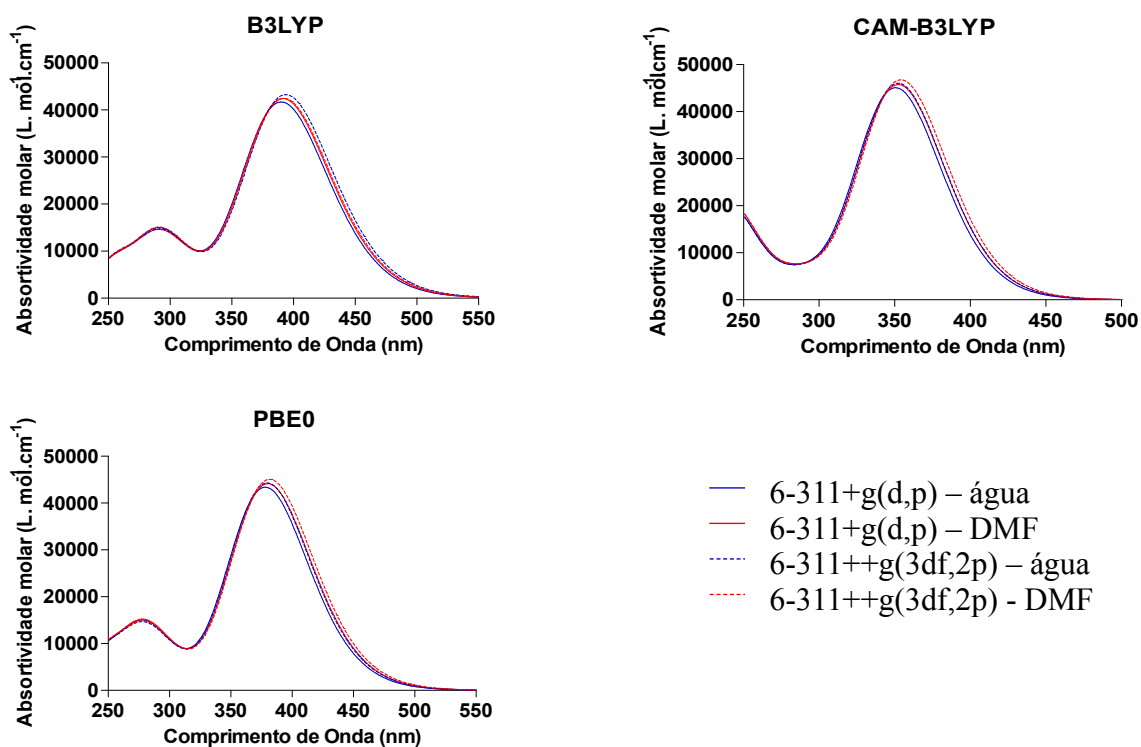
ZSILA, F. et al. Circular Dichroism and Absorption Spectroscopic Data Reveal Binding of the Natural Cis-Carotenoid Bixin to Human $\alpha 1$ -Acid Glycoprotein. *Bioorganic Chemistry*, v. 33, n. 4, p. 298-309, 2005.

ZSILA, F. et al. Evaluation of Drug–Human Serum Albumin Binding Interactions with Support Vector Machine Aided Online Automated *docking*. *Bioinformatics*, v. 27, n. 13, p. 1806–1813, 1 jul. 2011.

ANEXO A

Simulação do espectro de absorção da SSZ com solvente implícito e variação dos funcionais e funções de base

Figura 25- Espectros teóricos da SSZ com variação dos funcionais (B3LYP, CAM-B3LYP e PBE0), variação de funções de base (6-311+G(d,p), 6-311++G(3df,2p)) e solventes água/ DMF tratados de forma implícita.

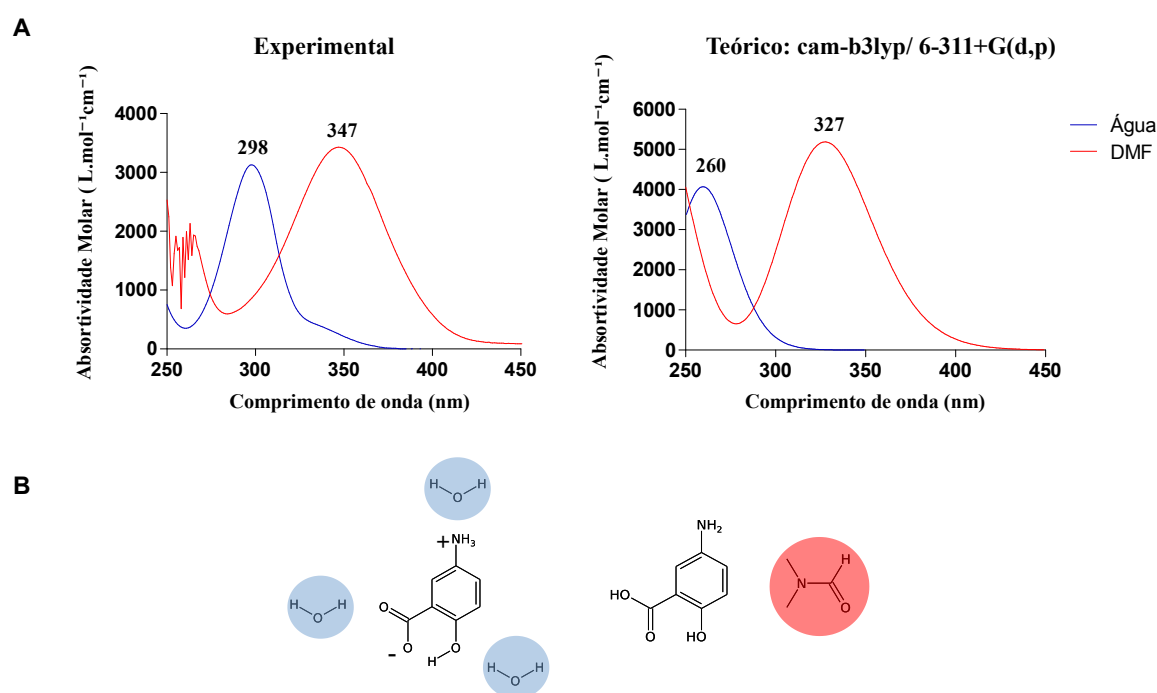


Não foi possível observar diferenças nos comprimentos de onda do máximo de absorção quando mudou-se o solvente de água para DMF. Isso sinaliza um problema no método teórico, que foi consertado ao se considerar os possíveis estados de protonação da

SSZ e solvente tratado de forma híbrida. Ao se variar o funcional e a função de base também não houve diferença significativa nos resultados. Dessa forma, o funcional escolhido para realização dos espectros em método híbrido foi o CAM-B3LYP, por conta dos resultados satisfatórios que o mesmo apresenta em inúmeros trabalhos na literatura. Já para a função de base, foi escolhida a 6-311+G(d,p) cujos resultados demoravam menos para ficarem prontos do que com a 6-311++G(3df,2p).

Resultados prévios de absorção experimental e teórica com a molécula de mesalazina

Figura 26- (A) Absorbância experimental e teórica da mesalazina em água e em DMF. (B) Representação 2D da distribuição dos solventes e estado de protonação usados na simulação computacional.

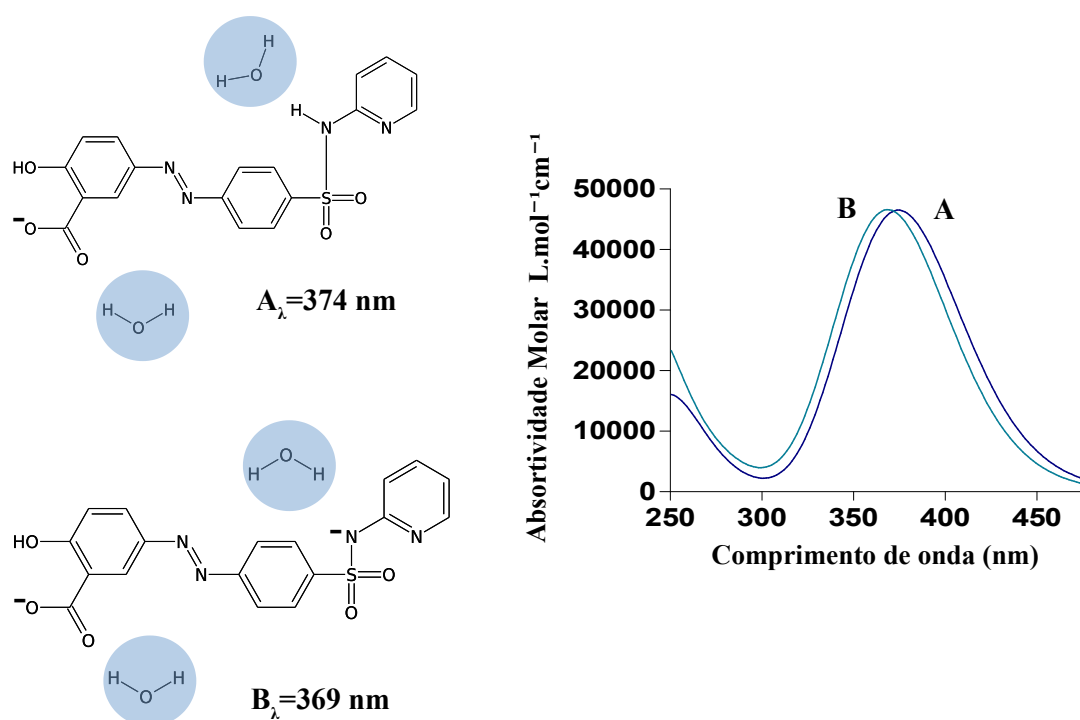


A simulação do espectro de absorção da mesalazina em água e em DMF foi feita no nível teórico CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) com o tratamento dos solventes pelo método

híbrido (constante dielétrica + micro solvatação) e consideração do estado de protonação mais plausível em cada meio. Como os resultados usando esse procedimento foram muito satisfatórios, o mesmo foi realizado para a SSZ já que testes com método implícito e fármaco na forma neutra não foram satisfatórios.

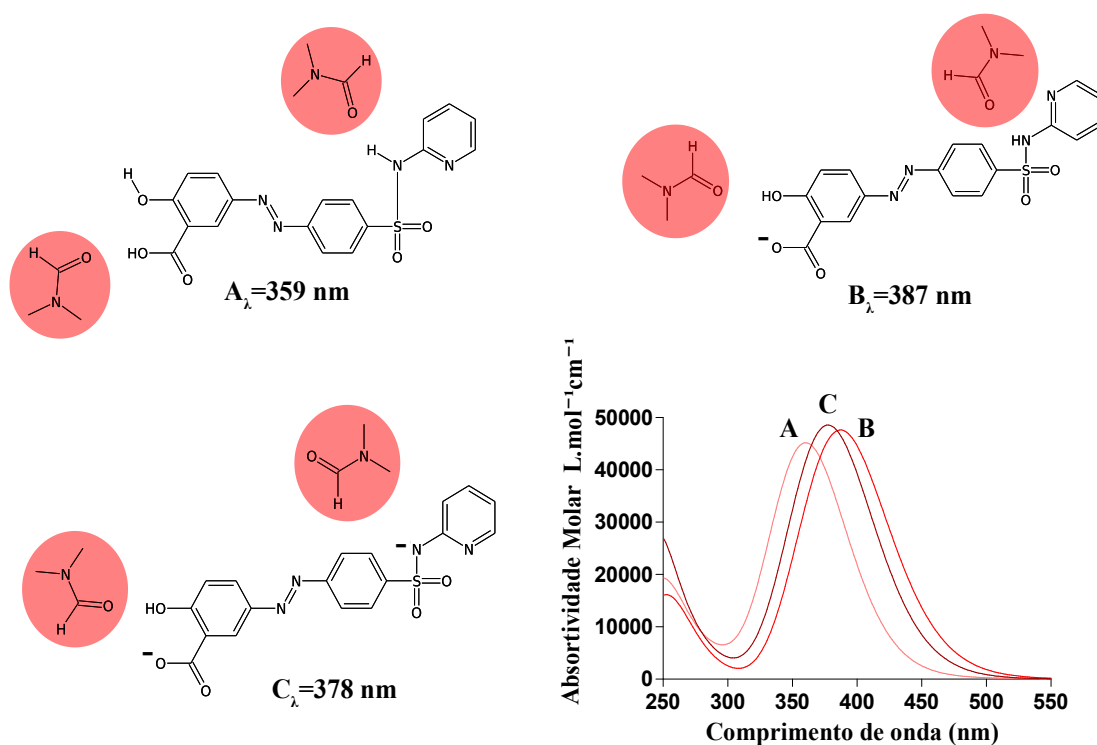
Estados de protonação da SSZ no espectro de absorção em água e DMF + distribuição dos solventes

Figura 27- Apresentação das duas formas protonadas em água, da SSZ, consideradas no cálculo de absorbância junto dos espectros obtidos.



A absorção máxima experimental em água foi de 360 nm. Portanto, a estrutura escolhida para cálculos de orbitais moleculares foi a estrutura B, que teve seu máximo em 369 nm. Esse foi o valor mais próximo obtido nessas condições e o estado de protonação está de acordo com os valores de pKa dos grupos que foram desprotonados. O grupo carboxílico tem pKa de 2,6 e o nitrogênio ligado ao grupo sulfona tem pKa de 6,1. Em pH 7,0, usado no experimento, é coerente que esses grupos estejam desprotonados.

Figura 28- Apresentação das três formas protonadas em DMF, da SSZ, consideradas no cálculo de absorbância junto dos espectros obtidos.



A absorção máxima experimental em DMF tem seu comprimento de onda, no máximo de absorção, em 405 nm. A estrutura que mais se aproximou desse valor foi a B, com comprimento de onda máximo teórico em 387 nm.

Distâncias entre o centro de massa da SSZ e os carbonos alfa dos resíduos de aminoácidos

Abaixo segue a tabela com os valores de distância do carbono alfa dos resíduos de aminoácidos, do DS1 das proteínas HSA e BSA, ao centro de massa da SSZ obtidos através do Discovery Studios 2021.

Tabela 8 - Valores de distância, em Angstrom, do centro de massa da sulfassalazina até os resíduos de aminoácidos que compõe o DS1 das proteínas estudadas.

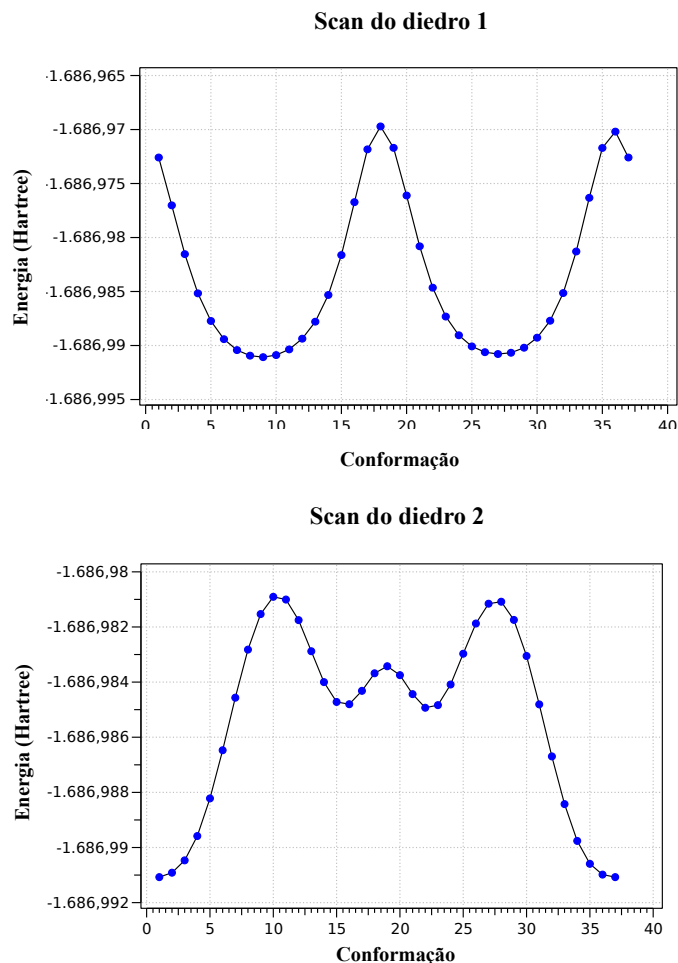
HSA (6r7s)		BSA (6qs9)	
Aminoácido	D(Å)	Aminoácido	D(Å)
ALA291	4,6	ALA290	4,9
ALA215	6,7	GLU291	6,5
GLU292	6,8	ILE289	7,2
LEU219	6,9	ARG217	7,6
ARG218	7,1	LEU218	8,1
LEU238	7,5	SER286	8,7
ILE290	7,6	LEU237	8,7
ARG222	9,0	ARG194	9,7
LEU234	9,5	LYS221	9,7
TRP214	9,6	HIS241	10,2
HIS242	9,8	ARG198	10,7
LYS199	10,0	ARG256	10,8
ARG257	10,7	ALA260	11,0
PHE211	10,9	TYR149	11,0
PHE223	11,0	LEU259	11,6
ALA261	11,1	LYS294	11,9
LEU260	11,1	PHE222	12,0
TYR150	12,0	ILE263	12,5
ILE264	12,1		

A distribuição dos resíduos de aminoácidos na HSA dá um perfil hidrofóbico para o DS1, enquanto que na BSA esse perfil tem uma hidrofobicidade reduzida, apesar de presente.

Resultado da varredura dos diedros 1 e 2 da SSZ

Os gráficos da varredura dos diedros estão apresentados abaixo, onde tem-se as conformações e suas respectivas energias, em Hartree.

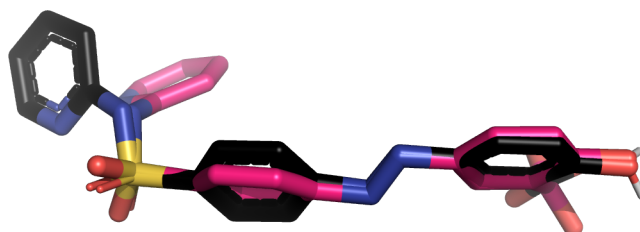
Figura 29- Gráficos da energia em função das conformações obtidas no scan



Como observado, as energias das conformações são muito próximas. Isso demonstra que a molécula pode facilmente rotacionar suas ligações simples e assumir todos esses rotâmeros quando em livre em solução. É por conta disso que não há sinal de ECD da sulfassalazina.

Alinhamento das estruturas da SSZ do docking no DS1 da HSA e BSA

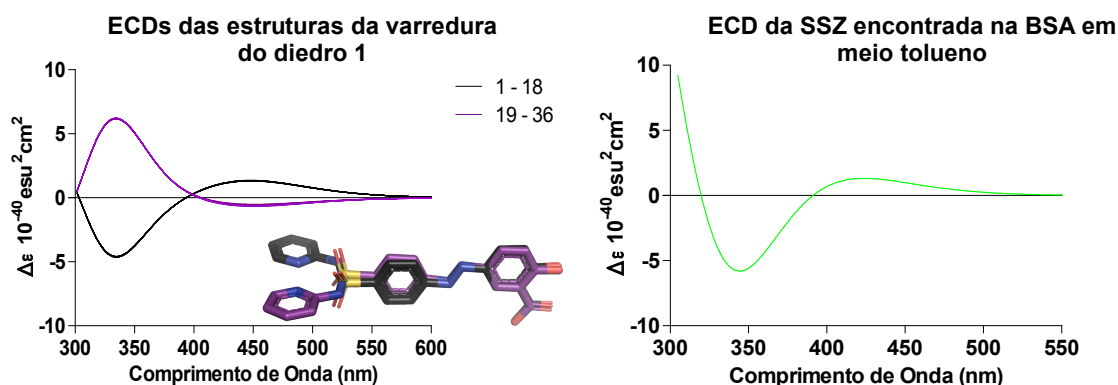
Figura 30- Em preto encontra-se a SSZ alocada na proteína HSA e, em rosa, a SSZ na proteína BSA.



O alinhamento foi realizado no *software* PyMOL através do comando *align*, onde usou-se o modo *one to one* e *outlier rejection* (*cycles*= 5; *cutoff*= 2,0; *mobile state*= -1; *target state*= - 1).

Observa-se que há duas mudanças significantes: o anel piridina e o anel aromático localizado no meio da molécula. Há, portanto, dois diedros diferentes nessas estruturas. Como na varredura não foi possível variar mais de um diedro ao mesmo tempo, não foi encontrado nenhum sinal de ECD igual aquele observado na BSA. No entanto, quando a estrutura da BSA é exposta a constante dielétrica de 2,4 (tolueno), seu sinal se assemelha muito ao sinal de algumas estruturas obtidas no scan do diedro 1, que envolve o anel piridina. Abaixo seguem os espectros para comparação.

Figura 31- Comparação dos sinais de ECDs encontrados na varredura do diedro 1 (à esquerda) com o sinal de ECD da SSZ alocada na BSA e exposta ao solvente tolueno, tratado de forma implícita nesse caso.



Esse resultado evidencia que o sinal experimental de ECD sofre tanta influência do meio quanto sofre da conformação.

ANEXO B

Espectros de absorção da SSZ com titulação da HSA e adição do competidor de sítio + Gráfico Benesi- Hildebrand para determinação de Ka

Ensaio de competição de sítio, através do espectro de absorção, junto do ajuste linear pela equação de Benesi.

Figura 32- Espectro de absorção e ajuste linear do sistema SSZ + HSA com adição de mesalazina (Mesa).

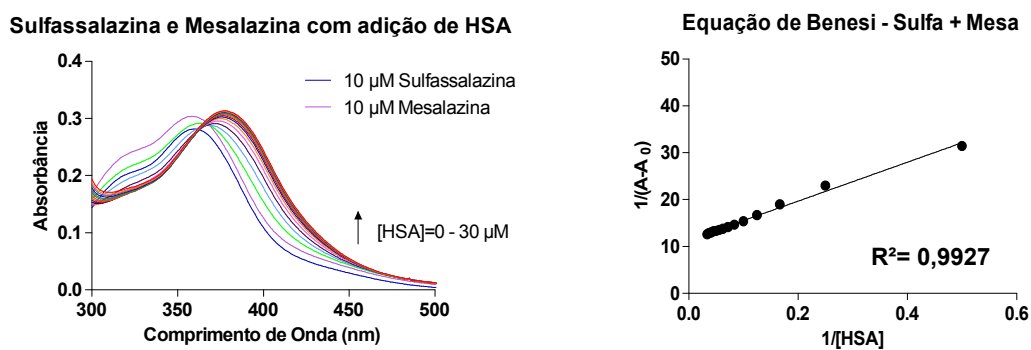


Figura 33- Espectro de absorção e ajuste linear do sistema SSZ + HSA com adição de ibuprofeno (Ibup).

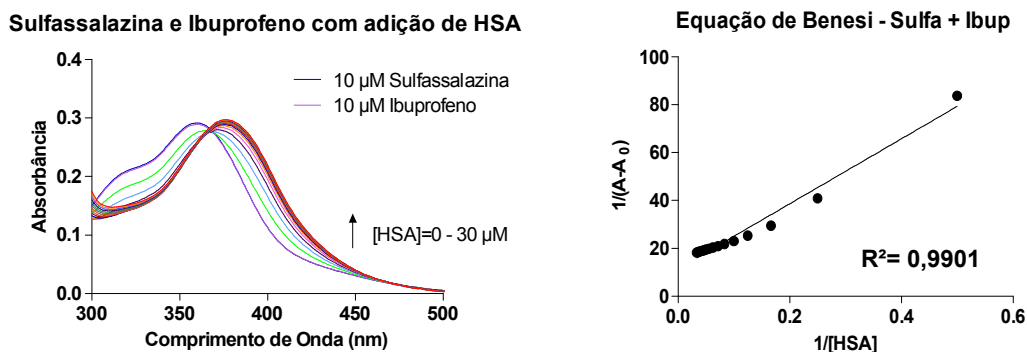


Figura 34- Espectro de absorção e ajuste linear do sistema SSZ + HSA com adição de varfarina (Varf).

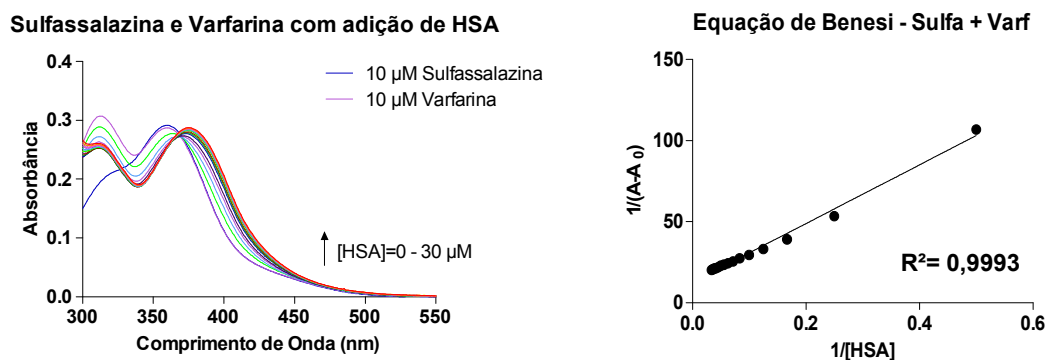


Figura 35- Espectro de absorção e ajuste linear do sistema SSZ + HSA com adição de digitoxina (Digit).

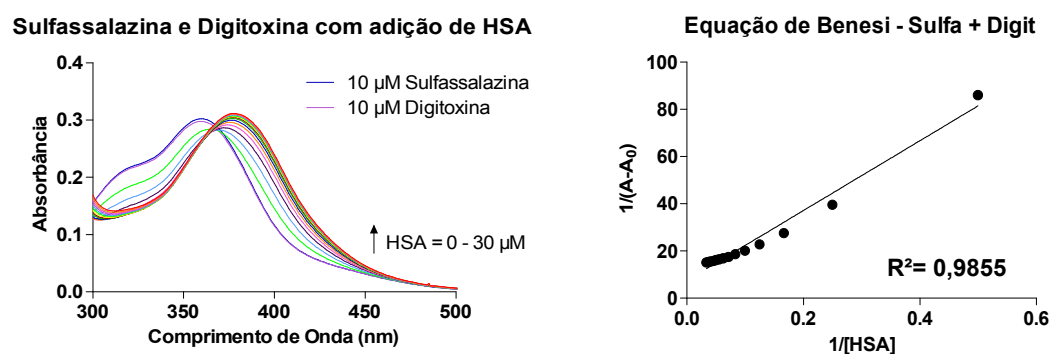
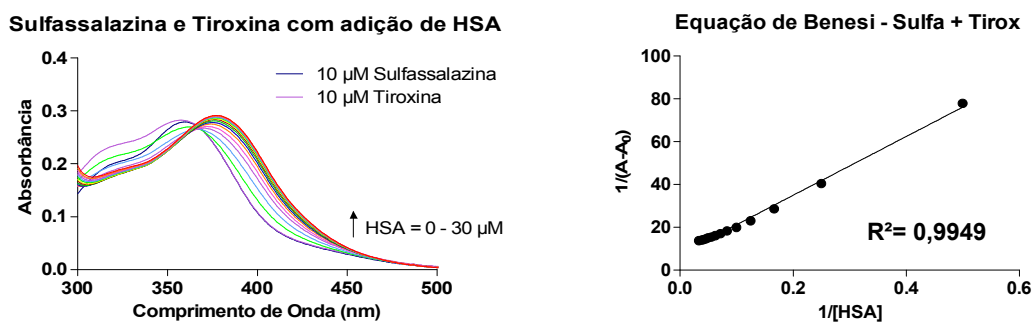


Figura 36- Espectro de absorção e ajuste linear do sistema SSZ + HSA com adição de tiroxina (Tirox).

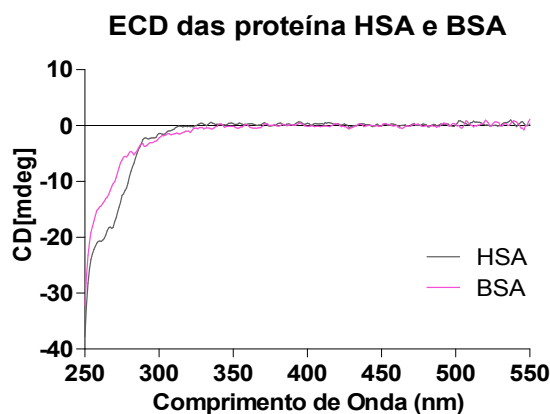


Os valores de R^2 ficaram satisfatoriamente perto de 1 em todos os casos apresentados.

Espectros de ECD das proteínas HSA e BSA

Os espectros de ECD das proteínas HSA e BSA, medidos isoladamente, encontram-se abaixo.

Figura 37- Espectro de ECD das proteínas BSA e HSA medidas à concentração de 30 μM , ambas.



Como observado, nenhuma das duas proteínas possuem sinal de 360 a 500 nm, região em que o fármaco SSZ apresenta ICD quando complexado.