



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

**Estudo e aplicação da sonda fluorescente 4-dimetilamino- β -nitroestireno para
caracterização de sítios de ligação em albumina**

Mestranda: Ana Julia Foganholi Carvalho Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

BAURU

2022

Ana Julia Foganholi Carvalho Fernandes

**Estudo e aplicação da sonda fluorescente 4-dimetilamino- β -nitroestireno para
caracterização de sítios de ligação em albumina**

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 orientação do Prof. Dr. Valdecir Farias
Ximenes.

BAURU

2022

Fernandes, Ana Julia Foganholi Carvalho.

Estudo e aplicação da sonda fluorescente 4-dimetilamino- β -nitroestireno para caracterização de sítios de ligação em albumina / Ana Julia Foganholi Carvalho Fernandes, 2022

81 f. : il.

Orientadora: Valdecir Farias Ximenes

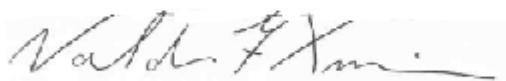
Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista (Unesp). Faculdade de Ciências, Bauru, 2022

1. albumina sérica bovina. 2. solvatocromismo. 3. 4-dimetilamino- β -nitroestireno. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Estudo e aplicação da sonda fluorescente 4-dimetilamino- β -nitroestireno para caracterização de sítios de ligação em albumina.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ANA JULIA FOGANHOLI CARVALHO FERNANDES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS.

Aos 08 dias do mês de julho do ano de 2022, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ANA JULIA FOGANHOLI CARVALHO FERNANDES, intitulada Estudo e aplicação da sonda fluorescente 4-dimetilamino- B -nitroestireno para caracterização de sítios de ligação em albumina. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru , Prof. Dr. NELSON HENRIQUE MORGON (Participação Virtual) do(a) Departamento de Físico Química - Instituto de Química / Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química Faculdade de Ciências / UNESP Câmpus de Bauru. Após a exposição pela mestrandia e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES



Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram para a finalização desse trabalho, ao longo de tantos momentos vividos até essa conclusão.

À minha família, orientador e amigos.

Resumo

As albuminas séricas são proteínas que possuem funções fisiológicas, entre elas, o transporte de fármacos na corrente sanguínea. Essa função é relevante, uma vez que a interação fármaco-BSA pode interferir na biodisponibilidade do fármaco no organismo, afetando a sua ação terapêutica. A albumina de soro bovino (BSA) possui dois principais locais de ligação para fármacos denominados sítio I e sítio II. A determinação do local de ligação de fármacos na albumina pode ser feita pelo uso de sondas fluorescentes. Neste trabalho, tivemos por objetivo estudar a interação do composto fluorescente 4-dimetilamino- β -nitroestireno (DANS) com a BSA e avaliar se suas características solvatocrômicas poderiam ser úteis para caracterizar sítios de ligação e a polaridade no microambiente da proteína. Verificamos que ao se ligar a proteína, o DANS teve a sua fluorescência significativamente aumentada, revelando ser uma sonda fluorescente extrínseca para estudo de proteínas. Este fenômeno propiciou a obtenção da constante de associação do complexo ($3,1 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) e sua estequiometria BSA:DANS (1:1). A associação foi também estudada por *quenching* da fluorescência intrínseca da BSA pela complexação com DANS ($3,9 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$). Através de estudos competitivos com fármacos que se ligam em sítios específicos da BSA, varfarina (sítio I), ibuprofeno (sítio II) e digitoxina (sítio III), verificamos que o DANS não apresenta uma preferência para qualquer um destes sítios. Estudos solvatocrômicos foram realizados e os modelos teóricos de Lippert-Mataga, Bilot-Kawski e McRae foram aplicados para o estabelecer a relação entre as propriedades espectroscópicas do DANS e a polaridade dos solventes. A melhor correlação foi obtida utilizando o modelo de Bilot-Kawski ($r^2 = 0,7565$), no entanto, o modelo de McRae ($r^2 = 0,5740$) foi o mais adequado para a simulação da constante dielétrica no interior da BSA (9,76). Utilizamos também o modelo de multiparamétrico de Kamlet-Taft. A partir deste modelo foi possível encontrar os máximos de absorvância e fluorescência do DANS para prever valores de parâmetros β (índice de basicidade) e π (fator de polarizabilidade) de misturas de solventes.

Palavras-chave: albumina sérica bovina, fluorescência, solvatocromismo, 4-dimetilamino- β -nitroestireno.

ABSTRACT

Serum albumins are proteins that have physiological functions, among them, the transport of drugs in the bloodstream. This function is relevant because the drug-BSA interaction can interfere in the bioavailability of the drug in the body, affecting its therapeutic action. Bovine serum albumin (BSA) has two main binding sites for drugs called site I and site II. Determination of the drug binding site in albumin can be done using fluorescent probes. In this work, the objective is to study the interaction of the fluorescent compound 4-dimethylamino- β -nitrostyrene (DANS) with BSA and to evaluate whether its solvatochromatic characteristics could be useful for the characterization of binding sites and polarity in the protein microenvironment. We found that by binding the protein, DANS had its fluorescence significantly increased, revealing it to be an extrinsic fluorescent probe for protein study. This phenomenon led to obtaining the association constant of the complex ($3,1 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) and its stoichiometry BSA:DANS (1:1). The association was also studied by BSA intrinsic fluorescence cooling by complexation with DANS ($3,9 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$). Through competitive studies with drugs that link to specific BSA, warfarin (site I), ibuprofen (site II) and digitoxin (site III), we found that DANS does not have a preference for any of these sites. Solvatochromic studies were performed and the theoretical models of Lippert-Mataga, Bilot-Kawski and Mcrae were applied to establish the relationship between the spectroscopic properties of DANS and the polarity of solvents. The best correlation was obtained using the Bilot-Kawski model ($r^2 = 0,7565$), however, the McRae model ($r^2 = 0,5740$) was the most suitable for simulating the dielectric constant inside the BSA (9,76). We also used the Kamlet-Taft multiparametric model. From this model, it was possible to find the maximum absorbance and fluorescence of the DANS to predict values of parameters β (basicity index) and π (polarizability factor) of solvent mixtures.

Keywords: bovine serum albumin, fluorescence, solvatochromism, 4-dimethylamino- β -nitrostyrene.

Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura tridimensional da BSA.....	5
Figura 2 – Estrutura dietil- 6-(dimetilamino) naftaleno-2,3-dicarboxilato (DMNDC).....	10
Figura 3 - Variação no comprimento de onda de emissão do DMNDC em diferentes solventes	10
Figura 4 – Estrutura 4-dimetilamino- β -nitroestireno (DANS).....	12
Figura 5 - Espectros de absorção e fluorescência do DANS em diferentes solventes. (A) absorção, (B) fluorescência	13
Figura 6 - Estrutura 4-dimetilamino-4'-nitrostilbeno (DNS)	13
Figura 7 – Espectro de fluorescência de DANS na ausência e presença de BSA. BSA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), DANS ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7, 20°C . $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$	22
Figura 8 - Relação da fluorescência com a concentração molar do ligante / Gráfico de Job'plot para a determinação da estequiometria do complexo DANS + BSA.....	24
Figura 9 – Alteração de fluorescência do DANS pela adição de BSA. DANS ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7, 20°C . $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$	25
Figura 10 - Determinação da constante de associação entre DANS e BSA utilizando a metodologia de Benesi-Hildebrand.....	26
Figura 11 - Supressão da fluorescência da BSA por DANS. BSA ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7, 20°C . $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$	27
Figura 12 – Determinação da constante de associação através do quenching da fluorescência da BSA por DANS. DANS ($0-20 \mu\text{mol L}^{-1}$) BSA ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7, 20°C . 28	
Figura 13 - Determinação da constante de Stern-Volmer para interação BSA:DANS	29
Figura 14 - Supressão da fluorescência da BSA por DANS em diferentes temperaturas (19 e 40°C). ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7. $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$	30
Figura 15 - Determinação da constante de Stern-Volmer através do experimento de Supressão da fluorescência em diferentes temperaturas (19 e 40°C). DANS ($0-20 \mu\text{mol L}^{-1}$) BSA ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7.	30
Figura 16 - Determinação da constante de associação através do experimento de supressão da fluorescência em diferentes temperaturas (19 e 40°C). DANS ($0-20 \mu\text{mol L}^{-1}$) BSA ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7. $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$	31
Figura 17 - Tempo de vida de fluorescência da BSA na presença e ausência de DANS	33
Figura 18 - Espectros da interação entre DANS-BSA e fármacos. A) varfarina; B) ibuprofeno; C) digitoxina, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; D) sem fármaco. DANS ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7, 20°C . $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$	36
Figura 19 - Determinação da constante de associação através da interação ou não entre fármacos. A) varfarina; B) ibuprofeno; C) digitoxina, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; D) sem fármaco, DANS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$	37
Figura 20 - Solvatocromismo no DANS. A) absorbância, B) fluorescência. DANS ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) nos solventes: dioxano, tolueno, acetato de heptila, acetato de hexila, clorofórmio, acetato de etila, THF, diclorometano, heptanol, acetona, acetonitrila, DMF e DMSO. $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$	39
Figura 21 - Espectro fluorescência ampliado, destacando os diferentes comprimentos de onda do tolueno e DMSO	40
Figura 22 – Correlações entre funções de polaridade dos solventes e características espectroscópicas do DANS. A) Lippert Mataga, $\Delta\nu$ versus Δf (ϵ , n); B) Bilot-Kawski, $\Delta\nu$ versus f (ϵ , n); C) Bilot-Kawski, $\nu_A + \nu_F$ versus ϕ (ϵ , n); D) McRae, $\nu F_{\text{máx}}$ versus F_e (ϵ , n); E) McRae, $\nu F_{\text{máx}}$ versus F_c (ϵ , n).	45
Figura 23 - Modelo solvatocrômico de Bilot-Kawski dos solventes	46

Figura 24 - Espectros de A) Absorbância, B) fluorescência do DANS em mistura acetonitrila + dioxano. DANS (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.	47
Figura 25 - Comparação da somatória dos números de onda máximos de absorção e fluorescência obtidos experimentalmente e previstos	48
Figura 26 - Comparação dos valores previstos e tabelados das constantes dielétricas das misturas acetonitrila + dioxano	49
Figura 27 - Espectros de A) Absorbância, B) fluorescência da mistura metanol + tolueno. DANS (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.	51
Figura 28 - Comparação da somatória dos números de onda máximos de absorção e fluorescência obtidos experimentalmente e previstos	52
Figura 29 - Comparação dos valores previstos e tabelados pela literatura da constante dielétrica da mistura metanol + tolueno	53
Figura 30 - Espectros do efeito solvatocrômico do DANS. A) absorbância, B) fluorescência. DANS (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) nos solventes: dioxano, tolueno, acetato de heptila, acetato de hexila, clorofórmio, acetato de etila, THF, diclorometano, heptanol, acetona, acetonitrila, DMF, DMSO e BSA. $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.	55
Figura 31 - Modelo solvatocrômico de McRae dos solventes	56
Figura 32 - Comparação do número de onda máximo de fluorescência obtido experimentalmente e previsto - mistura acetonitrila + dioxano	57
Figura 33 - Comparação dos valores previstos e tabelados pela literatura da constante dielétrica da mistura acetonitrila + dioxano	58
Figura 34 - Comparação do número de onda máximo de fluorescência obtido experimentalmente e previsto – mistura metanol + tolueno.	59
Figura 35 - Comparação dos valores previstos e tabelados pela literatura da constante dielétrica da mistura metanol + tolueno	60
Figura 36 - Espectros de A) absorbância, B) fluorescência da mistura de dioxano + água. DANS (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.	62
Figura 37 - Espectros de A) absorbância, B) fluorescência da mistura de etanol + água. DANS (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.	65
Figura 38 – DANS como sonda solvatocrômica e sua aplicação no modelo Kamlet-Taft para previsão de máximos de absorbância e fluorescência em mistura de solventes. Eixo x representa os máximos de absorbância e fluorescência experimentais obtidos em misturas etanol/água. Eixo y representa os valores previstos obtidos pela aplicação das Equações 23 e 24.	66
Figura 39 - Relação de v_a versus α, β e π para a mistura dioxano + água	67
Figura 40 - Relação de v_f versus α, β e π para a mistura dioxano + água	68
Figura 41 - Comparação dos valores de α, β e π previstos e reportados – absorbância	71
Figura 42 - Comparação dos valores de α, β e π reportados e previstos – fluorescência	72

Lista de tabelas

Tabela 1 - Frações molares de acetonitrila com dioxano	20
Tabela 2 - Frações molares de metanol com tolueno	20
Tabela 3 - Frações molares de dioxano com água	21
Tabela 4 - Frações molares de etanol com água	21
Tabela 5 - Fluorescência do complexo BSA:DANS em função da fração molar de DANS	23
Tabela 6 - Constante de Stern-Volmer (K_{sv}) entre DANS e BSA obtido através do experimento de quenching em diferentes temperaturas	31
Tabela 7 - Constante de associação (K_a) entre DANS e BSA obtido através do experimento de quenching em diferentes temperaturas	32
Tabela 8 - Tempo de vida de fluorescência (τ) da BSA	33
Tabela 9 - Parâmetros termodinâmicos de ligação entre DANS e BSA	34
Tabela 10 - Constantes de associações (K_a) obtidas no experimento de competição com fármacos e constante de associação obtida sem a presença do fármaco. DANS ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), fármaco ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão fosfato, pH 7	38
Tabela 11 - Medições espectroscópicas de DANS em diferentes solventes	40
Tabela 12 - Funções de polaridade dos solventes	44
Tabela 13 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes - acetonitrila + dioxano: Experimental versus Previsto	48
Tabela 14 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes - acetonitrila + dioxano para o cálculo da constante dielétrica	49
Tabela 15 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes metanol + tolueno ..	51
Tabela 16 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes - metanol + tolueno para o cálculo da constante dielétrica	53
Tabela 17 - Medidas espectroscópicas da BSA no ambiente DANS para o cálculo da constante dielétrica	54
Tabela 18 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes - acetonitrila + dioxano	57
Tabela 19 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes - acetonitrila + dioxano para o cálculo da constante dielétrica	58
Tabela 20 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes - metanol + tolueno 59	
Tabela 21 - Comparação dos valores previstos e tabelados pela literatura da constante dielétrica da mistura metanol + tolueno	60
Tabela 22 - Medidas espectroscópicas da BSA no ambiente DANS para o cálculo da constante dielétrica	61
Tabela 23 - Parâmetros solvatocrômicos da mistura dioxano + água	63
Tabela 24 - Parâmetros solvatocrômicos da mistura etanol + água	65
Tabela 25 - Equações de reta da relação de fluorescência e α, β, π	68
Tabela 26 - Equações da reta da relação de absorbância e α, β, π	69
Tabela 27 - Comparação dos valores de α, β e π reportados e previstos para a mistura etanol + água através das equações da mistura dioxano + água – absorbância	69
Tabela 28 - Comparação dos valores de α, β e π reportados e previstos para a mistura etanol + água através das equações da mistura dioxano + água – fluorescência	70

Lista de abreviaturas

BSA - albumina sérica bovina

DANS - 4-dimetilamino- β -nitroestireno

DMF - dimetilformamida

DMSO - dimetilsulfóxido

Ka – constante de associação

Ksv – constante de Stern-Volmer

THF - tetraidrofurano

Sumário

1	INTRODUÇÃO	4
1.1	Albumina sérica	4
1.2	Aplicação de sondas fluorescentes na caracterização de sítios de ligação na BSA	7
1.3	Solvatocromismo	8
1.4	O composto 4-dimetilamino- β -nitroestireno (DANS)	12
2	OBJETIVOS	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	Materiais	15
3.1.1	Reagentes	15
3.1.2	Equipamentos	15
3.2	Preparo de soluções	15
3.2.1	Solução tampão fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline - PBS</i>) pH = 7,0	15
3.2.2	Albumina do soro bovino (BSA) 0,001 mol L ⁻¹	16
3.2.3	4-dimetilamino- β -nitroestireno (DANS) 0,01 mol L ⁻¹	16
3.2.4	Varfarina 0,01 mol L ⁻¹	16
3.2.5	Ibuprofeno 0,01 mol L ⁻¹	16
3.2.6	Digitoxina 0,01 mol L ⁻¹	16
3.3	Métodos	17
3.3.1	Aumento da fluorescência do DANS a partir da adição de BSA, e determinação da constante de associação (K _a)	17
3.3.2	Determinação da estequiometria de reação através do método Job's plot	17
3.3.3	Ensaio de supressão de fluorescência (<i>quenching</i>), determinação da constante de Stern-Volmer (K _{sv}) e da constante de associação (K _a)	17
3.3.4	Ensaio de supressão de fluorescência em diferentes temperaturas e determinação de parâmetros termodinâmicos	18
3.3.5	Tempo de vida	18
3.3.6	Ensaio de competição entre fármaco e sonda fluorescente para estudo de preferência por sítios de ligação	18
3.3.7	Estudos solvatocrômicos - solventes	19
3.3.8	Estudos solvatocrômicos – misturas de solventes	19
3.3.8.1	Mistura de solventes – acetonitrila com dioxano	20
3.3.8.2	Mistura de solventes – metanol com tolueno	20
3.3.8.3	Mistura de solventes – dioxano com água	21
3.3.8.4	Mistura de solventes – etanol com água	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
4.1	Interação entre BSA e DANS	22

4.2 – Determinação da estequiometria de complexação a partir do método Job's plot..	23
4.3 – Determinação da constante de associação (K _a) entre DANS e BSA.....	24
4.4 – Determinação da constante de associação (K _a) e constante de Stern-Volmer (K _{sv}) entre DANS e BSA pela supressão de fluorescência da proteína.....	26
4.5 - Supressão de fluorescência da BSA pela adição de DANS e determinação da constante de associação (K _a) e constante de Stern-Volmer (K _{sv}) em diferentes temperaturas.....	29
4.6 – Estudo de tempo de vida da BSA na presença de DANS.....	32
4.7 - Análise termodinâmica da interação entre DANS e BSA.....	33
4.8 – Estudo dos sítios de ligação na BSA pelo ligante DANS	35
4.9 – Estudos solvatocrômicos do 4-dimetilamino- β -nitroestireno (DANS).....	38
4.9.1 – Relações matemáticas utilizadas em modelos solvatocrômicos.....	41
4.9.1.1 – Solvatocromismo no DANS e sua aplicação para previsão de constante dielétrica em mistura de solventes – Bilot-Kawski.....	46
4.9.1.1.1 – Utilização de dados da mistura acetonitrila + dioxano	46
4.9.1.1.2 – Utilização de dados da mistura metanol + tolueno.....	50
4.9.1.1.3 – Aplicação da equação geral dos solventes – Bilot-Kawski para estimativa da constante dielétrica no interior da BSA	53
4.9.1.2 – Aplicação do modelo matemático McRae a partir dos resultados obtidos para os solventes.....	56
4.9.1.2.1 – Utilização de dados da mistura acetonitrila + dioxano	56
4.9.1.2.2 – Utilização de dados da mistura metanol + tolueno.....	58
4.9.1.2.3 – Aplicação da equação geral dos solventes – McRae para estimativa da ϵ da BSA	61
4.9.1.3 – Relação matemática multiparamétrica – Kamlet-Taft	61
4.9.1.3.1 – Utilização de dados da mistura etanol + água	64
4.9.1.3.2 – Modelo solvatocrômico Kamlet-Taft – correlacionando α , β e π isoladamente	66
5 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 – Albumina sérica

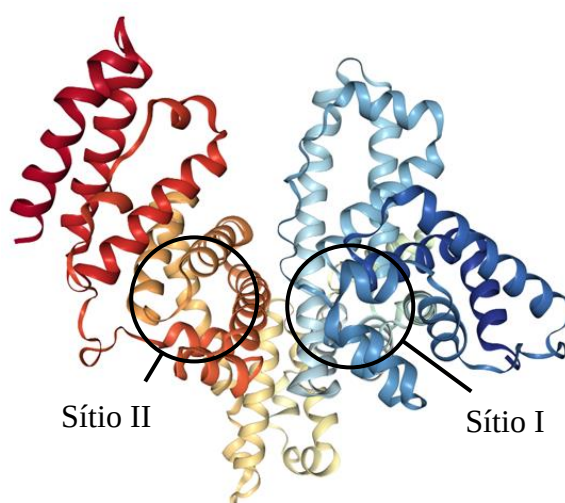
As albuminas séricas são as proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo, apresentando concentração de cerca de 35-50 mg/mL (Singh e Mitra, 2019). As albuminas séricas possuem diversas funções fisiológicas, como a regulação da pressão osmótica coloidal e a absorção e o transporte de diversos compostos endógenos e exógenos para diferentes tecidos (Bolattin *et al.*, 2016; Nan *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020).

Tanto a albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*, BSA) quanto a albumina sérica humana (*human serum albumin*, HSA) são um tipo de proteína globular e não glicosilada. Entre elas existe uma homologia de sequência de 76%, a BSA com peso molecular de 66,5 kDa e 583 aminoácidos se assemelham à HSA, que possui peso de 66,7 kDa e 585 aminoácidos possuem ainda os mesmos domínios homólogos I, II e III com formato elipsoidal semelhante e também contém o mesmo número de 17 ligações dissulfeto (Singh e Mitra, 2019).

Com base na grande semelhança na estrutura e no comportamento de ligação existente entre BSA e HSA, optou-se em utilizar a albumina sérica bovina (BSA) neste estudo como modelo na entre ligação proteína-ligante devido à sua abundância, baixo custo, e ainda por sua homologia estrutural com a albumina sérica humana (Kumari *et al.*, 2014).

Os principais sítios de ligação da BSA consistem em domínios homólogos I, II e III, e cada domínio está subdividido em dois subdomínios chamados de A e B (Figura 1). O transporte dos compostos endógenos e exógenos ocorre nos dois principais sítios de ligação da proteína que estão localizados nos subdomínios IIA e IIIA e são de natureza hidrofóbica. O primeiro sítio de ligação na HSA denominado de sítio I está localizado no subdomínio IIA, enquanto que o segundo sítio denominado de sítio II está localizado no subdomínio IIIA da proteína (Bolattin *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019).

Figura 1 - Estrutura tridimensional da BSA



Fonte: Protein Data Bank (ID: 3V03)

A BSA possui resíduos de triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) responsáveis pela sua fluorescência, no entanto os resíduos de triptofano são os principais contribuintes (Haque e Prabhu, 2014). Sendo eles, Trp-213 localizado no subdomínio IIA e Trp-134 no subdomínio IA, responsáveis pela sua fluorescência intrínseca (Nan *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016). Sua fluorescência no ambiente ao redor do resíduo Trp é muito sensível as mudanças, o que a torna uma boa candidata ao uso como sondas fluorescentes endógenas para estudar as interações de ligação da proteína com a droga (Nan *et al.*, 2019).

Os candidatos a ligantes à HSA normalmente compartilham a propriedade geral de serem compostos hidrofóbicos com características aniônicas e apresentam uma grande variedade de ligantes endógenos, como ácidos graxos não esterificados, bilirrubina, hemina e tiroxina se ligando em diversos sítios de ligação. Desta maneira, a solubilidade desses compostos no plasma é aumentada a partir da ligação com HSA, sendo essas umas das principais funções desta proteína (Olson e Christ, 1996; Singh e Mitra, 2019).

O sítio I é composto por várias regiões anexas e sobrepostas a ele e é capaz de atrair diferentes ligantes por ser um sítio grande. O sítio I é o principal responsável pelo reconhecimento da albumina em ligar uma variedade grande e diversificada de ligantes. A principal característica de um ligante da albumina é ter alta hidrofobicidade, pois os principais sítios de ligação são compostos por resíduos hidrofóbicos, assim pode-se esperar que a partir do ligante a proteína é estabilizada em grande parte por interações hidrofóbicas e em menor concentração, estabilizada por estruturais. Outro fator que

contribui para a albumina ter uma boa afinidade ao ligante é a sua flexibilidade, embora tenha uma única forma geral, ela também é uma molécula dinâmica (Fielding, Rutherford e Fletcher, 2005; Kratz e Elsadek, 2012). O sítio I, está associado a ligantes como varfarina, fenilbutazona, piroxicam, entre outros, é o local de ligação preferencialmente de moléculas não polares heterocíclicas volumosas, normalmente com uma carga negativa centralmente deslocalizada (Abboud, Charcosset e Greige-Gerges, 2017; De, Kaur e Datta, 2013).

Já o sítio II é um local que não é tão abrangente nos ligantes e é um sítio de menor volume, normalmente com uma estequiometria de 1:1 na proporção proteína-ligante. Apresenta maior afinidade com ligantes que apresentam uma carga negativa localizada no carbono de um composto aromático que contém grupos de ácido carboxílico (Fielding, Rutherford e Fletcher, 2005; Graciani e Ximenes, 2013; Olson e Christ, 1996). Este sítio é conhecido pela ligação de benzodiazepínicos, possuindo alta afinidade pelo diazepam, ibuprofeno e naproxeno (Abboud, Charcosset e Greige-Gerges, 2017; De, Kaur e Datta, 2013).

Apesar de existirem preferências em determinados sítios, estudos mostram que as propriedades estruturais dos ligantes, mencionadas anteriormente, não são um fator determinante do local de ligação na HSA, como é o caso de fármacos como a aspirina e bilirrubina, que são relatados por se ligarem aos locais I e II com afinidades diferentes, dependente do local de ligação (De, Kaur e Datta, 2013). É justamente essa afinidade de ligação à albumina sérica que afeta como essas drogas serão distribuídas no organismo (Ghuman *et al.*, 2005).

É desejável que haja um certo grau de ligação do fármaco à albumina para solubilização de compostos ou ainda para sua correta distribuição no organismo quando ligados à albumina. Dessa forma, dependendo do grau de ligação entre o fármaco e a albumina pode-se comprometer a eficácia de determinada droga, por exemplo, se o medicamento está 95% ligado à proteína e 5% está livre no organismo, isso significa que 5% do medicamento está ativo no sistema e causando efeitos farmacológicos. Esse comportamento pode exigir doses maiores para atingir a concentração efetiva da ação do medicamento, podendo afetar a distribuição nos locais de ação, deixando-a mais lenta, e ainda não serem eliminadas com eficiência pelo organismo (Ghuman *et al.*, 2005; Sherman e Sherman, 2014).

Nesse contexto, é importante determinar o local preferencial de ligação à albumina de um fármaco desconhecido afim de compreender sua afinidade, uma vez que

somente a forma livre do composto possui efeito terapêutico, portanto a afinidade de um fármaco ligado à proteína, influencia na sua distribuição no organismo, na taxa de metabolismo e excreção. Por exemplo, estudos mostram que alguns compostos possuem forte capacidade competitiva de ligação à albumina, como quercetina, rutina e baicalina, as quais podem alterar resultados farmacocinéticos e farmacodinâmicos potencialmente negativos ou positivos de algumas drogas (Liu *et al.*, 2015; Shahid e Chawla, 2017). Caso seja administrado dois medicamentos no organismo, haverá competição entre os fármacos (se os dois ligarem no mesmo sítio da albumina) e os medicamentos com maior afinidade deslocarão o outro, causando aumento da concentração de medicamentos livres (Rahman, Rahman e Rahman, 2005).

Portanto, destaca-se a importância de verificar o local de ligação do fármaco na albumina sérica. Uma maneira de se estudar o local de ligação de um novo composto na albumina é a partir da utilização de sondas fluorescentes.

1.2 – Aplicação de sondas fluorescentes na caracterização de sítios de ligação na BSA

Sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a caracterização de locais de ligação na BSA, pois apresentam variação na intensidade de fluorescência e/ou no comprimento de onda máximo de emissão quando estão associadas a proteína. Desta maneira, uma vez que uma sonda fluorescente esteja ligada ao sítio específico da albumina, a adição de um composto seguido da diminuição da intensidade de fluorescência, indica que a sonda foi deslocada de seu sítio de ligação, ou seja, o composto se ligou à proteína no sítio em que se encontrava a sonda (Bi *et al.*, 2012; Fielding, Rutherford e Fletcher, 2005; Rahman, Rahman e Rahman, 2005).

Existem sondas específicas para cada sítio de ligação da albumina previamente conhecidas na literatura, em geral essas sondas fluorescentes são moléculas pequenas, como por exemplo a varfarina, dansil-L-asparagina e dansilamida são sondas específicas para sítio I, enquanto que para o sítio II são conhecidos, compostos como dansilprolina e dansilglicina (Ni, Su e Kokot, 2006).

A berbamina é um composto natural, constituinte ativo de medicamentos fitoterápicos e possui atividade anti-hipertensão, anti-arrítmica, anti-inflamatória e imunossupressora. Estudos interação da berbamina com a BSA foram capazes de

determinar constante de associação de $2,577 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, e a partir de estudos de competição com fármacos determinado o sítio preferencial de ligação na BSA, sítio I. Para isso estudou-se a ligação competitiva da berbamina com a varfarina (local de ligação localizado no sítio I), a varfarina possui uma fluorescência fraca em 380 nm e com a adição de BSA houve um aumento na intensidade da fluorescência, já quando adiciona-se a berbamina ao complexo BSA-varfarina resulta em uma diminuição na intensidade da fluorescência e em um desvio para o vermelho do comprimento de onda máximo de emissão de 381 nm para 386 nm. A diminuição da intensidade de fluorescência da varfarina ligada à proteína reflete uma redução na capacidade de ligação à varfarina no local primário de ligação da BSA (Cheng *et al.*, 2009).

A constante de associação da ligação entre proteína e ligante pode ser reduzida quando houver a coexistência de segundo ligante em solução por exemplo, havendo competição entre eles. Podemos ter dois tipos de interação, a competitiva e não competitiva. A interação competitiva sugere que quando um segundo ligante (L_2) seja adicionado a um complexo existente de L_1 -BSA e L_2 desloca o L_1 , formando o complexo L_2 -BSA, desse modo haverá uma grande diferença nas K_a dos dois ligantes. Caso essa diferença na K_a não exista, podemos supor que L_2 não conseguiu deslocar o L_1 nessa interação competitiva pelo local de ligação (Bi *et al.*, 2012).

Esses compostos são exemplos de sondas que ao se ligarem a proteína apresentam um aumento de intensidade de fluorescência, evidenciando a interação entre sonda-proteína. Dessa maneira, uma vez que elas estão ligadas em um sítio específico da proteína, é possível, por meio de estudos de competição, identificar o local de ligação de novos compostos na proteína, baseado nas alterações de fluorescência das sondas.

1.3 – Solvatocromismo

Sondas fluorescentes solvatocrômicas possuem comportamento espectroscópico dependente das propriedades físico-químicas do ambiente circundante, ou seja, apresentam sensibilidade a mudanças no microambiente molecular, como as interações e mudanças conformacionais de proteínas (Giordano *et al.*, 2012; Vázquez, Blanco e Imperiali, 2005).

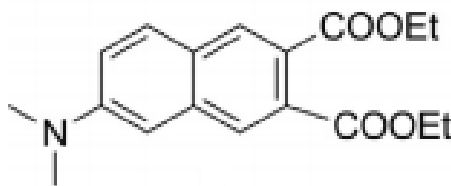
Solvatocromismo é a propriedade de um cromóforo de alterar a absorção e/ou fluorescência em função do meio, podendo haver alteração de forma, posição e

intensidade de bandas causado pela alteração de polaridade do meio. Observa-se um solvatocromismo positivo se a emissão e/ou absorção sofrem um deslocamento para comprimentos de onda maiores, denominado – deslocamento batocrômico, ou ainda, para o vermelho; já se temos um solvatocromismo negativo, significa que os espectros de emissão e/ou absorção sofreram um deslocamento para comprimentos de onda menores, denominado – deslocamento hipsocrômico ou, para o azul. Esses efeitos observados diante da alteração da polaridade do meio refletem no deslocamento de Stokes, se trata da diferença entre os máximos dos espectros de absorção e emissão (Giordano *et al.*, 2012; Lakowicz, 2006).

A emissão de fluorescência ocorre em comprimentos de onda maiores se comparados aquele onde foram excitados. Esta perda de energia é ocasionando por processos dinâmicos que ocorrem após a absorção de luz. Após um fluoróforo ser excitado as moléculas polares do solvente podem provocar a estabilização do mesmo, ou seja, os dipolos do solvente podem reorientar-se em torno do fluoróforo reduzindo a energia estado excitado, o que tem como resultado emissões em comprimentos de onda maiores. Esse efeito se potencializa à medida que a polaridade do solvente aumenta, resultando em emissões em comprimentos de onda ainda maiores. Este efeito que os solventes polares exercem sobre os compostos fluorescentes pode também ser entendido considerando que no estado excitado as moléculas apresentam maior momento de dipolo de comparado ao estado fundamental. Assim, solventes mais polares exerceram maior efeito de estabilização no estado excitado do que no fundamental, justificando assim maiores deslocamentos para o vermelho (Lakowicz, 2006)a.

Um fator que pode aumentar a sensibilidade do fluoróforo ao efeito da polaridade do solventes é o fenômeno da transferência de carga intramolecular (ICT, *intramolecular charge transfer*) que ocorre em moléculas que apresentem um grupo doador de elétrons e um grupo que seja aceitador de elétrons, conectados por um sistema conjugado, como o exemplo do composto dietil- 6-(dimetilamino) naftaleno-2,3-dicarboxilato, DMNDC, (Figura 2) que apresenta a propriedade de ICT (Mallick, Pal e Koner, 2016). Compostos que apresentam ICT terão aumento ainda maior no momento de dipolo do estado excitado, conseqüentemente serão ainda mais estabilizado pelos solventes e apresentarão deslocamentos de Stokes ainda maiores e dependentes da polaridade dos solventes.

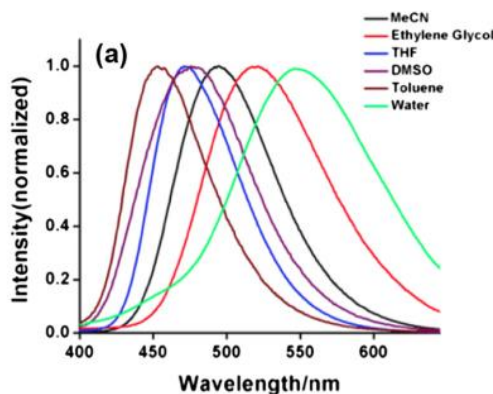
Figura 2 – Estrutura dietil- 6-(dimetilamino) naftaleno-2,3-dicarboxilato (DMNDC)



Fonte: Elaborado pelo autor.

O DMNDC apresenta deslocamento no máximo de emissão para o vermelho (Figura 3), de acordo com o aumento da polaridade dos solventes, além da variação do tempo de vida de fluorescência com a mudança da polaridade do meio (Mallick, Pal e Koner, 2016).

Figura 3 - Variação no comprimento de onda de emissão do DMNDC em diferentes solventes



Obtido de MALLICK; PAL; KONER, 2016.

O DMNDC também foi testado utilizando albumina do soro bovino (BSA). Ao ligar-se a BSA, a intensidade de fluorescência do DMNDC teve um aumento, assim como uma variação hipsocrômica no seu espectro de fluorescência (de 547 nm para 483 nm), indicando que a sonda se encontra dentro da cavidade da proteína. Além disso, a partir da interação com a BSA e pelas mudanças observadas nos máximos de emissão, é possível medir a polaridade do ambiente das bolsas hidrofóbicas pelo valor do deslocamento de Stokes de 8752 cm^{-1} comparando com os de THF e acetato de etila, pode-se estimar. O

valor da constante de associação (K_a) também foi calculado, e obtido o valor de $5,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, considerado um alto valor de K_a . (Mallick, Pal e Koner, 2016).

Em geral, compostos que apresentam a transferência de carga intramolecular geram um momento de dipolo alto na molécula, tanto no estado fundamental quanto no excitado, resultando em um aumento no deslocamento de Stokes e é observado um forte solvatocromismo (Mallick, Pal e Koner, 2016; Muniz-Miranda, Pedone e Muniz-Miranda, 2018).

Um outro fluoróforo sensível à micropolaridade muito conhecido, que também apresenta um grande aumento no momento de dipolo molecular após excitação é o 2-propionil-6-dimetilaminonaftaleno (Prodan), possui o fenômeno ICT, com grupos dimetilamino (doador de elétrons) e propionil (aceitador de elétrons) (Giordano *et al.*, 2012; Vázquez, Blanco e Imperiali, 2005).

Essas mudanças espectrais resultam em uma variedade de interações que podem ser interpretadas por modelos matemáticos solvatocrômicos. Normalmente, essas mudanças são interpretadas pelos efeitos gerais do solvente, no qual relaciona as mudanças espectrais de absorção e emissão com as constantes dielétricas (ϵ) e índice de refração (n) dependentes dos diferentes solventes. Esses efeitos são chamados de gerais pois não dependem de propriedades específicas dos solventes como a capacidade de formação de ligações de hidrogênio, ligações de Van der Waals e interações iônicas (Lakowicz, 2006; Zúñiga-Núñez *et al.*, 2018).

Entre os modelos matemáticos solvatocrômicos que interpretam os efeitos gerais dos solventes, os mais conhecidos são os de Lippert-Mataga, Bilot-Kawski e McRae (Kawski e Bojarski, 2011; McRae, 1957; Ramos e Techert, 2003, 2010; Thipperudrappa *et al.*, 2017).

Embora em geral os efeitos gerais dos solventes tenham um peso significativo nos efeitos solvatocrômicos observado, dizer que os efeitos observados nos espectros de fluorescência e absorção são de responsabilidade apenas da polaridade dos solventes e do ambiente em que o cromóforo esteja inserido, nem sempre é verdadeiro, pois deve-se levar em consideração fatores como interações sonda-sonda, interações sonda-solvente e mudanças conformacionais na sonda, o qual esses efeitos podem estar agindo simultaneamente e afetando o fluoróforo (Lakowicz, 2006).

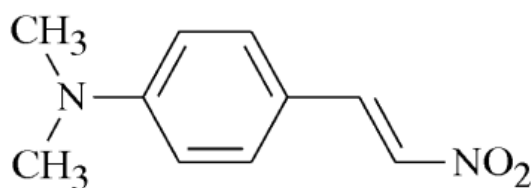
Desse modo, podemos investigar esses múltiplos efeitos através do modelo matemático de Kamlet-Taft que traz uma equação multi-paramétrica que considera fatores como o índice de acidez e basicidade dos solventes, e assim, descreve o efeito da

polaridade do solvente mais a fundo, e levam em consideração a existência de ligação de hidrogênio ao fluoróforo (Lewkowicz *et al.*, 2019; Taft *et al.*, 1985; Zúñiga-Núñez *et al.*, 2018).

1.4 – O composto 4-dimetilamino- β -nitroestireno (DANS)

No contexto de sondas fluorescentes com características ICT se destaca o DANS que apresenta uma estrutura planar e conjugação entre os grupos amina (doador) e nitro (aceitador), como mostra a Figura 4. Esse composto foi utilizado em estudos fotofísicos apresentando deslocamento no comprimento de onda máximo de emissão com a variação da polaridade do solvente (Figura 5) (Nandi, Ghosh e Palit, 2016).

Figura 4 – Estrutura 4-dimetilamino- β -nitroestireno (DANS)

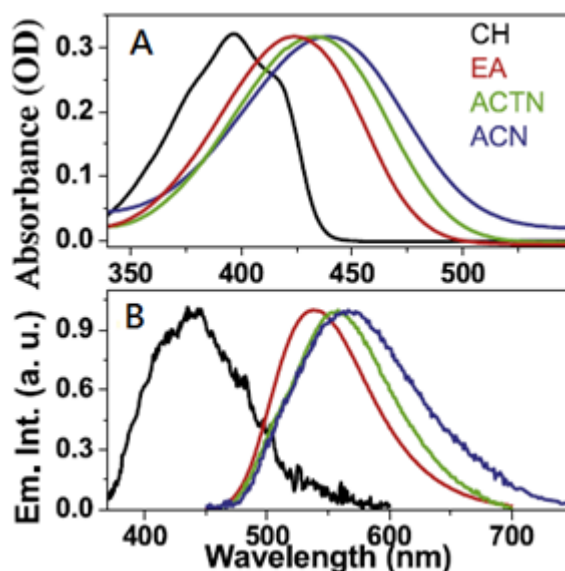


Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar de apresentar essa propriedade de variação da intensidade de fluorescência com o meio, o DANS foi pouco estudado e nunca aplicado em estudos envolvendo proteínas. Assim, considerando suas propriedades solvatocrômicas de acordo com a Figura 5, podemos observar que conforme a polaridade dos solventes aumentam, os espectros de absorção (Figura 5 A) e emissão (Figura 5 B) se deslocam para comprimentos de onda maiores, confirmadas pela teoria solvatocrômica, apresentada no item 1.3. Desse modo, pode-se supor que o DANS também possa ter a sua fluorescência intrínseca alterada quando ligada a albumina.

De acordo com os resultados obtidos em (Nandi, Ghosh e Palit, 2016), após a excitação da molécula de DANS a transferência de carga ocorre do grupo doador para o aceitador ocasionando um grande aumento no momento dipolar do estado excitado.

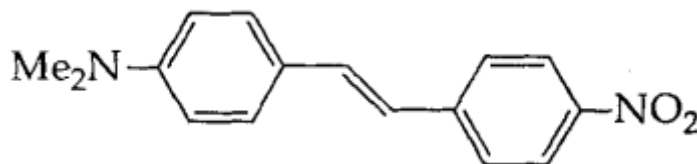
Figura 5 - Espectros de absorção e fluorescência do DANS em diferentes solventes.
(A) absorção, (B) fluorescência



Adaptado de NANDI, GHOSH, PALIT, 2016.

Assim como o DANS, o 4-Dimetilamino-4'-nitrostilbeno (DNS) (Figura 6) é um composto que apresenta estrutura e propriedades semelhantes, e também apresenta ICT. O DNS possui um conjunto de estudos maior destacando as suas propriedades fotofísicas (Farztdinov e Ernsting, 2002; Kobayashi, Degenkolb e Rentzepis, 1979; Muniz-Miranda, Pedone e Muniz-Miranda, 2018; Oberlé *et al.*, 2000; Transient, Spectra e Solvents, 1995; Wielgus, Bartkowiak e Samoc, 2012).

Figura 6 - Estrutura 4-dimetilamino-4'-nitrostilbeno (DNS)



Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com a Figura 6 é possível perceber a presença do grupo amino doador e o grupo nitro aceitador de elétrons, conectados por um sistema conjugado, ao qual caracteriza a transferência de carga intramolecular. A presença desse fenômeno pode ainda aumentar a sensibilidade da molécula à polaridade dos solventes, fazendo com que

a diferença de energia do estado excitado e fundamental seja ainda maior, e como resultado os espectros se apresentam em comprimentos de onda maiores e de menor energia (Muniz-Miranda, Pedone e Muniz-Miranda, 2018; Oberlé *et al.*, 2000). Dessa maneira, pelo DNS apresentar propriedades tão semelhantes e muito estudadas durante os anos, espera-se um comportamento semelhante para o DANS, e assim como o DANS, o DNS não foi aplicado em estudos envolvendo proteínas.

2 OBJETIVOS

Estudar a interação do 4-dimetilamino- β -nitroestireno (DANS) com a proteína albumina sérica bovina e avaliar se há um sítio preferencial de ligação na proteína, assim como estudar o comportamento solvatocrômico do mesmo ao se ligar a proteína.

Estudar o comportamento solvatocrômico do DANS em diferentes solventes e utilizar os modelos Lippert-Mataga, Bilot-Kawski, McRae e Kamlet-Taft para sua interpretação, assim verificar se a sonda fluorescente poderia ser utilizada para mensurar constante dielétrica de solventes, misturas de solventes e no microambiente da albumina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais

3.1.1 - Reagentes

Os reagentes utilizados nesse experimento, como a albumina soro bovina (código Sigma 7030), 4-dimetilamino- β -nitroestireno (DANS), fosfato de sódio monobásico, fosfato dibásico. Os solventes dioxano ($C_4H_8O_2$), tolueno (C_7H_8), acetato de heptila ($C_9H_{18}O_2$), acetato de hexila ($C_8H_{16}O_2$), clorofórmio ($CHCl_3$), acetato de etila ($C_4H_8O_2$), tetraidrofurano (THF - C_4H_8O), diclorometano (CH_2Cl_2), heptanol ($C_7H_{16}O$), acetona (C_3H_6O), acetonitrila (C_2H_3N), dimetilsulfóxido (DMSO - $(CH_3)_2SO$), dimetilformamida (DMF - C_3H_7N) foram obtidos pela Sigma-Aldrich.

3.1.2 - Equipamentos

Para a execução destes experimentos, foram utilizados a balança analítica AG245 (Mettler Toledo, Ohio, EUA), medidor de pH (Analyser modelo 300 Digital - São Paulo, Brasil), espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Shelton, CT, USA), espectrofotômetro UV-Vis Lambda 35 (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) e refratômetro ABBE – Biobrix.

3.2 - Preparo de soluções

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

3.2.1 - Solução tampão fosfato (*Phosphate Buffered Saline - PBS*) pH = 7,0

Para o preparo da solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0, inicialmente foram preparadas duas soluções: fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, foram pesados então 1,49 g de NaH_2PO_4 em 0,250 L de água e fosfato dibásico (Na_2HPO_4) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, 3,55 g de Na_2HPO_4 em 0,500 L de água. Adicionou 0,250 L da solução de fosfato de sódio monobásico em um béquer, e o pH da solução foi ajustado em 7, a partir da adição da solução de fosfato dibásico, com o auxílio do medidor de pH.

3.2.2 - Albumina do soro bovino (BSA) 0,001 mol L⁻¹

Para o preparo de 500 μ L da solução estoque de BSA 0,001 mol L⁻¹, foram pesados 0,033 g de BSA e diluído em solução tampão fosfato. A partir dessa solução foram feitas as diluições necessárias ao longo do trabalho. A solução foi mantida em geladeira.

3.2.3 - 4-dimetilamino- β -nitroestireno (DANS) 0,01 mol L⁻¹

No preparo da solução de DANS 0,01 μ mol L⁻¹, foram pesados 0,00192 g de DANS e diluído em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), e agitado para total dissolução. A partir dessa solução foram feitas as diluições necessárias ao longo do trabalho. A solução foi mantida em geladeira.

3.2.4 - Varfarina 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo de 1 mL da solução, foram pesados 0,00309 g de varfarina e diluído em etanol. A solução foi mantida em geladeira.

3.2.5 - Ibuprofeno 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo de 1 mL da solução, foram pesados 0,00206 g de ibuprofeno e diluído em etanol. A solução foi mantida em geladeira.

3.2.6 - Digitoxina 0,01 mol L⁻¹

Para o preparo de 1 mL da solução, foram pesados 0,00766 g de digitoxina e diluído em etanol. A solução foi mantida em geladeira.

3.3 - Métodos

3.3.1 - Aumento da fluorescência do DANS a partir da adição de BSA, e determinação da constante de associação (K_a)

Utilizando o espectrofluorímetro, foram obtidos os espectros de fluorescência do DANS com a adição de BSA, a partir do comprimento de excitação da sonda em 450 nm, e comprimento de emissão de 500 a 600 nm. Para isso, em meio tampão fosfato, foi mantido fixa a concentração de DANS ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e titulado BSA em alíquotas equivalentes a $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, até atingir a saturação. Posteriormente foi feito o cálculo da constante de associação entre DANS e BSA, a partir dos espectros de fluorescência obtidos.

3.3.2 - Determinação da estequiometria de reação através do método Job's plot

Para a execução do método, manteve-se constante a soma das concentrações do ligante (C_{DANS}) com a proteína (C_{BSA}), enquanto a proporção ligante-proteína é sistematicamente variada. As concentrações do DANS e BSA variaram de $1\text{-}10 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato e então foram obtidos espectros de fluorescência para as amostras em cada proporção de ligante-proteína. Para isso o espectrofluorímetro foi ajustado para um comprimento de excitação de 450 nm, e comprimento de emissão de 500 a 600 nm, a fotomultiplicadora em 800.

3.3.3 - Ensaio de supressão de fluorescência (*quenching*), determinação da constante de Stern-Volmer (K_{sv}) e da constante de associação (K_a)

Os espectros de supressão de fluorescência foram obtidos utilizando comprimento de excitação em 295 nm e comprimento de emissão de 310 a 410 nm. A concentração de BSA foi mantida fixa em $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a concentração de DANS variou em $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ até $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato. A partir dos espectros de fluorescência obtidos, foi possível calcular a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) e ainda a constante de associação (K_a) entre o DANS e a BSA.

3.3.4 - Ensaio de supressão de fluorescência em diferentes temperaturas e determinação de parâmetros termodinâmicos

Para a obtenção dos espectros a partir da supressão de fluorescência da BSA pela adição de DANS, ajustou o espectrofluorímetro no comprimento de excitação de 295 nm e comprimento de emissão em 310 a 410 nm e as aberturas de fenda em 10 nm. Foram feitos três ensaios em temperaturas diferentes, 19°C, 28°C e 40°C, mantendo fixa a concentração de BSA em $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e adicionando DANS a $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($2,5 - 20 \mu\text{mol L}^{-1}$) e a partir dos espectros foi possível calcular a variação de entalpia (ΔH), a variação de entropia (ΔS) e a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) presente na formação do complexo.

3.3.5 - Tempo de vida

O experimento de tempo de vida foi realizado analisando uma concentração de BSA $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, e posteriormente analisado essa mesma amostra com adição de DANS $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato.

3.3.6 - Ensaios de competição entre fármaco e sonda fluorescente para estudo de preferência por sítios de ligação

Os espectros da ligação entre DANS + fármaco + BSA foram obtidos através do espectrofluorímetro em comprimento de excitação de 450 nm, e comprimento de emissão de 500 a 600 nm, a fotomultiplicadora em 800. Foram utilizados três fármacos que se ligam em sítios diferentes, varfarina, ibuprofeno e digitoxina em concentrações fixas de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, e a cada um dos fármacos adicionado uma concentração fixa de DANS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, e titulados concentrações de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA, e obtido um conjunto de espectros para cada fármaco. Foram calculados os valores das constantes de associação (K_a) do DANS na presença de cada fármaco analisado e observado possíveis alterações que indicassem competição por algum sítio de ligação da BSA.

3.3.7 - Estudos solvatocrômicos - solventes

Para a obtenção dos espectros de solvatocromismo do DANS, foi utilizado o espectrofluorímetro em comprimento de excitação de 450 nm, e comprimento de emissão de 480 a 650 nm, fotomultiplicadora em 800 e filtro em determinados solventes. Os espectros de absorção foram adquiridos pelo espectrofotômetro UV-vis entre os comprimentos de excitação 350 a 550 nm. A concentração de DANS foi fixada em 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e adicionada em todos os solventes utilizados, sendo estes: dioxano, tolueno, acetato de heptila, acetato de hexila, clorofórmio, acetato de etila, tetraidrofurano (THF), diclorometano, heptanol, acetona, acetonitrila, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF). O índice de refração (n) de cada amostra (DANS + solvente) foi medido pelo refratômetro ABBE – Biobrix para posteriores cálculos.

A partir dos máximos de absorção e fluorescência de seus respectivos espectros, foram utilizados modelos solvatocrômicos que correlacionassem estes às funções de polaridade de solventes, são eles: Lippert-Mataga, Bilot-Kawski, McRae e Kamlet-Taft. Esses modelos serão descritos na seção 4.9.1.

3.3.8 - Estudos solvatocrômicos – misturas de solventes

Foram gerados espectros a partir de misturas de solventes para aplicação de modelos solvatocrômicos, com a utilização do espectrofluorímetro em comprimento de excitação de 450 nm, e comprimento de emissão de 480 a 650 nm, fotomultiplicadora em 800, e espectros de absorção pelo espectrofotômetro UV-vis entre os comprimentos de excitação 350 a 550 nm.

3.3.8.1 - Mistura de solventes – acetonitrila com dioxano

Para o preparo das amostras foi utilizado frações molares de acetonitrila em solução com dioxano, de acordo com o descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Frações molares de acetonitrila com dioxano

Amostra	X _{acetonitrila}
1	0,000
2	0,288
3	0,410
4	0,619
5	0,791
6	0,903
7	1,000

Em todas as amostras foram adicionadas concentrações fixas de DANS 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, feita a leitura dos espectros, a medida do índice de refração correspondente de cada fração molar e a constante dielétrica das frações molares (Kolling, 1986) para aplicação nos modelos solvatocrômicos na seção 4.9.1.

3.3.8.2 - Mistura de solventes – metanol com tolueno

A Tabela 2, apresenta as frações molares de metanol em solução com tolueno. Em todas as amostras foram adicionadas concentrações fixas de DANS 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, feita a leitura dos espectros, a medida do índice de refração correspondente de cada fração molar e conhecendo previamente as constantes dielétricas de cada amostra (Reis et.al., 2009) para aplicação nos modelos solvatocrômicos, descritos na seção 4.9.1.

Tabela 2 - Frações molares de metanol com tolueno

Amostra	X _{metanol}
1	0,0
2	0,2
3	0,4
4	0,6
5	0,8
6	1,0

3.3.8.3 - *Mistura de solventes – dioxano com água*

A mistura de dioxano e água foi feita por volume/volume de cada solvente. A Tabela 3 mostra a relação dos volumes (Critchfield, Gibson, Hall, 1953), apresenta valores de α , β e π , que são utilizados na aplicação do modelo solvatocrômico de Kamlet-Taft, no qual é descrito no item 4.9.2.

Tabela 3 - Frações molares de dioxano com água

Amostra	% dioxano
1	70
2	50
3	40
4	20
5	10

Em todas as amostras foram adicionadas concentrações fixas de DANS 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e obtido espectros de fluorescência e absorbância.

3.3.8.4 - *Mistura de solventes – etanol com água*

De acordo com o descrito na Tabela 4, a mistura de etanol e água foi preparada por volume/volume de cada solvente, e (Habibi-Yangjeh, 2004), apresenta valores de α , β e π , que são utilizados na aplicação do modelo solvatocrômico de Kamlet-Taft, no qual é descrito no item 4.9.2.

Tabela 4 - Frações molares de etanol com água

Amostra	% etanol
1	100
2	80
3	60
4	40
5	20
6	10

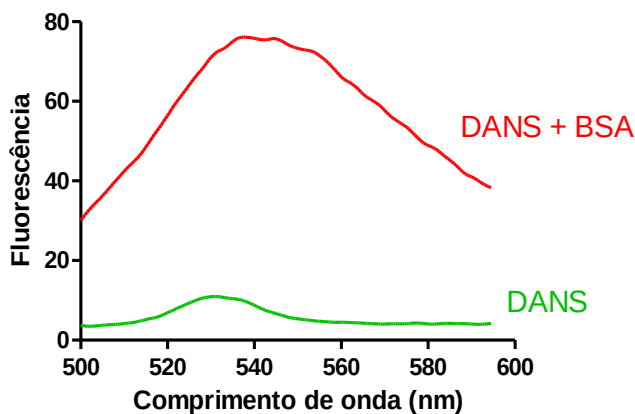
Em todas as amostras foram adicionadas concentrações fixas de DANS 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e obtido espectros de fluorescência e absorbância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 - Interação entre BSA e DANS

Diante das propriedades solvatocrômicas descritas para o DANS (Nandi, Ghosh e Palit, 2016) e de não haver estudos que mostrem interações com proteínas, buscou-se verificar a interação entre o mesmo e a proteína BSA. Medindo a fluorescência intrínseca do DANS em meio aquoso e na presença de BSA, verificou um aumento de fluorescência significativo na presença da proteína (Figura 7).

Figura 7 – Espectro de fluorescência de DANS na ausência e presença de BSA. BSA ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), DANS ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7, 20°C . $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.



De acordo com (Bi *et al.*, 2012) quando há um aumento da fluorescência da sonda ao se adicionar proteína é indicativo da interação entre ambas, e acompanhado do deslocamento do máximo de emissão para comprimentos de onda maiores. Uma vez determinado que houve a formação de complexo DANS-BSA, buscou-se determinar a estequiometria de complexação e a constante de ligação (K_a).

4.2 – Determinação da estequiometria de complexação a partir do método Job's plot

O método de Job's plot de variação contínua é utilizado para determinar a estequiometria de complexos por meio da variação das frações molares dos componentes e mantendo a soma da concentração molar do complexo (P e L) constante (Ingham, 1975). Assim, supondo que o DANS se ligue a proteína, podemos supor que o equilíbrio BSA-DANS possa ser representado pela Equação 1, onde, P é a proteína e L é o ligante.

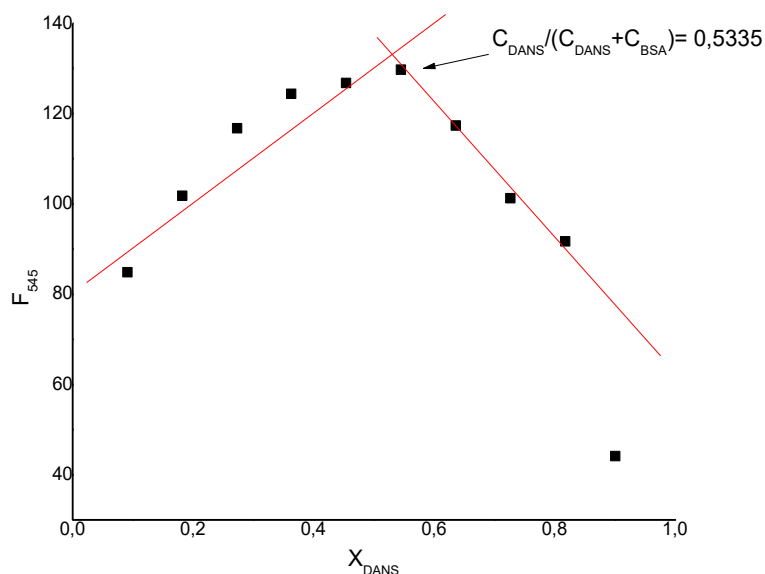


A fluorescência de cada amostra de solução foi medida no comprimento de onda máximo do DANS, em 545 nm e plotada em função da fração molar de DANS ($C_{\text{DANS}}/(C_{\text{DANS}}+C_{\text{BSA}})$). Os valores obtidos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Fluorescência do complexo BSA:DANS em função da fração molar de DANS

[DANS] ($\mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$)	[BSA] ($\mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$)	X_{DANS}	$F_{545 \text{ nm}}$
1	10	0,091	60,64
2	9	0,182	82,78
3	8	0,273	101,42
4	7	0,364	111,14
5	6	0,454	107,06
6	5	0,545	99,93
7	4	0,636	88,32
8	3	0,727	78,96
9	2	0,818	62,03
10	1	0,901	45,16

Figura 8 - Relação da fluorescência com a concentração molar do ligante / Gráfico de Job'plot para a determinação da estequiometria do complexo DANS + BSA.



A partir da relação da fluorescência com a concentração molar do DANS na Figura 8, duas retas foram traçadas e onde elas se interceptam é observado um valor máximo de fluorescência para a fração molar de DANS (eixo x) igual a 0.53. Este valor é aplicado na Equação 2 e obtém-se o valor da concentração do ligante (C_L) em relação a proteína (C_P).

$$X = \frac{C_L}{C_L + C_P}$$

Equação 2

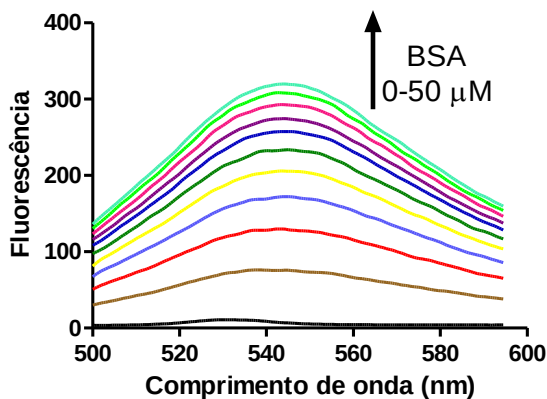
Nesse método supõe-se que apenas um complexo é formado, ou seja, a concentração de espécies intermediárias é desprezível (Ingham, 1975), assim consideramos que $(C_P + C_L)$ é igual a 1, o valor de fração molar para máxima fluorescência (0.53) indica uma estequiometria de aproximadamente 1:1 (DANS:BSA).

4.3 – Determinação da constante de associação (K_a) entre DANS e BSA

Como apresentado na seção anterior, o significativo aumento de fluorescência do DANS pela adição de BSA sugere a formação de um complexo como apresentado no equilíbrio apresentado na Equação 1. A formação desse complexo [DANS + BSA] vem

acompanhada da alteração na intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de BSA em solução (Figura 9).

Figura 9 – Alteração de fluorescência do DANS pela adição de BSA. DANS ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7, 20 °C. $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.



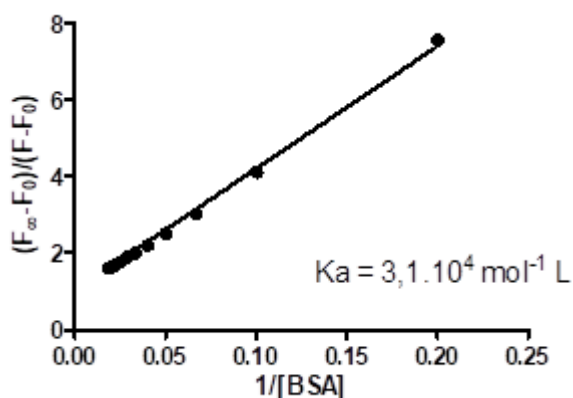
Podemos observar que para o DANS a intensidade de fluorescência foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de proteína, ou seja, conforme aumentou-se a concentração de BSA em solução, a intensidade de fluorescência também aumentou, até atingir saturação. A partir das medidas de intensidade de fluorescência no máximo das bandas, a constante de associação (K_a) pode ser determinada utilizando a Equação 3 proposta por Benesi-Hildebrand.

$$\frac{F_{\infty} - F_0}{F - F_0} = 1 + \frac{1}{K_a} \cdot \frac{1}{L} \quad \text{Equação 3}$$

Nesta equação F_{∞} , F_0 e F são, respectivamente, a fluorescência em uma concentração de BSA em saturação, a fluorescência na ausência de proteína e a fluorescência em uma concentração intermediária de proteína e L representa a concentração de proteína adicionada (Bi *et al.*, 2012) (Hildebrand e Benesi, 1949; Patel, Kishor e Datta, 2015). Ajustando os dados experimentais (Figura 9) à equação 3, obteve-se por regressão linear (Figura 10) a constante de associação entre DANS e BSA ($3,1 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$). É importante salientar que este modelo se aplica a complexos (1:1), que é o caso aqui estudado como demonstrado pelo método de Job's plot. O valor de K_a obtido através desse experimento está de acordo com valores encontrados para a interação de

diferentes ligantes com albumina. Em (Cheng *et al.*, 2009), para ligação entre BSA e berbamina, o valor de K_a foi de $2,577 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, para a ligação de esculina na BSA, o valor de K_a está em $2,24 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Qureshi *et al.*, 2022).

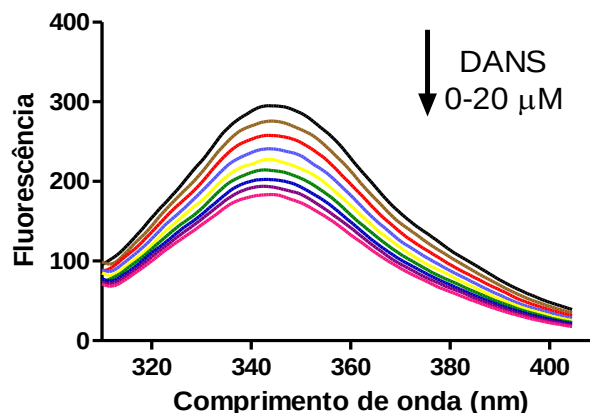
Figura 10 - Determinação da constante de associação entre DANS e BSA utilizando a metodologia de Benesi-Hildebrand.



4.4 – Determinação da constante de associação (K_a) e constante de Stern-Volmer (K_{sv}) entre DANS e BSA pela supressão de fluorescência da proteína

Neste estudo apresentamos outro método para se investigar a interação entre proteína e ligante. Trata-se do fenômeno de supressão (*quenching*) da fluorescência. Nesse método a fluorescência intrínseca da proteína é suprimida pela adição do ligante. Esse fenômeno acontece por diferentes razões como transferência de energia, rearranjos moleculares, formação de complexos no estado fundamental ou *quenching* colisional (Kumari *et al.*, 2014). Além da constante de associação, pode-se obter a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) para o processo de *quenching*. Assim como a constante de associação, a constante de Stern-Volmer é também um indicativo de interação e pode indicar o tipo de interação entre o ligante e a proteína. Desse modo, foi observada uma diminuição na intensidade de fluorescência da BSA quando a concentração de DANS foi aumentada (0 - 20 $\mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$), mantendo a concentração de BSA constante (2,5 $\mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$) (Figura 11), indicando assim, que o DANS atua como supressor da fluorescência da BSA. Os espectros foram obtidos nos comprimentos de onda de emissão da BSA excitado em 295 nm (Behera *et al.*, 2021).

Figura 11 - Supressão da fluorescência da BSA por DANS.
BSA ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7, 20°C . $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.



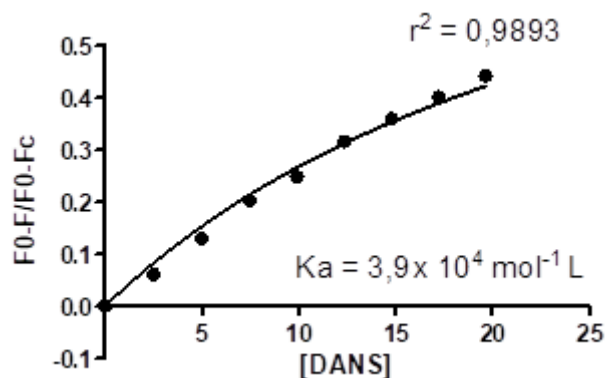
O processo de *quenching* pode ser enquadrado em duas categorias, sendo elas, *quenching* estático ou *quenching* dinâmico e podem ser diferenciados pela dependência de valores nas constantes de ligação em função da temperatura (Bolattin et al., 2016), Estes resultados serão apresentados no item 4.5.

A partir dos espectros obtidos na supressão de fluorescência da BSA, utilizou a Equação 4 para o cálculo da K_a pelo *quenching*, com os valores da concentração de BSA e de DANS adicionados a cada ponto. Nesta equação onde F_0 , F_c , e F são, respectivamente, a fluorescência na ausência de proteína, a fluorescência em uma concentração de BSA em saturação e a fluorescência em uma concentração intermediária de proteína, P é a concentração de proteína e L a concentração do ligante.

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} = \frac{P + L + K_d - \sqrt{(P + L + K_d)^2 - 4 \cdot P \cdot L}}{2 \cdot P} \quad \text{Equação 4}$$

Os gráficos da Figura 12 foram obtidos através da utilização da Equação 4 e a partir dele foi possível determinar K_a por supressão de fluorescência da BSA causada pelo DANS. O valor obtido foi $3,9 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. Podemos compará-lo ao valor obtido utilizando a metodologia do item 4.3, em que a constante de associação foi obtida através do aumento da fluorescência do DANS pela adição de BSA, e observar que os valores se equivalem.

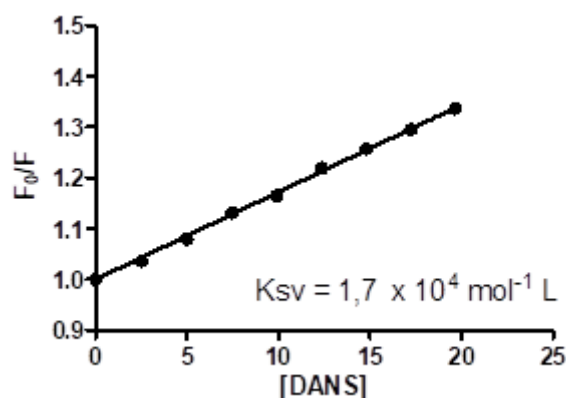
Figura 12 – Determinação da constante de associação através do *quenching* da fluorescência da BSA por DANS. DANS (0-20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) BSA (2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7, 20 °C.



O mecanismo de *quenching* também foi analisado pela Equação 5 (Stern–Volmer). A equação relaciona as intensidades de fluorescência da BSA na ausência e presença do DANS, em F_0 e F , respectivamente, e a concentração de DANS em solução, $[L]$. A Equação 5 resultou no gráfico apresentado na Figura 13 e a partir deste, a obtenção do valor da constante de Stern-Volmer $1,7 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} \cdot [L] \quad \text{Equação 5}$$

Figura 13 - Determinação da constante de Stern-Volmer para interação BSA:DANS



Em a ligação da BSA com varfarina e ibuprofeno temos valores de K_{sv} entre $2,986 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $2,503 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente (NI, Y.; SU, S.; KOKOT, S. 2006).

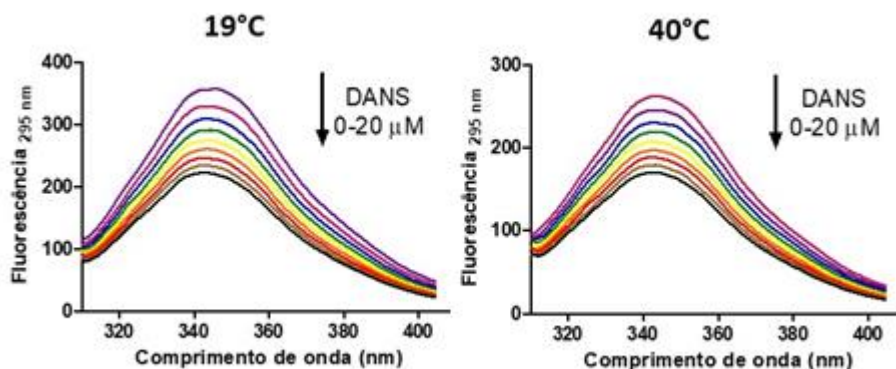
4.5 - Supressão de fluorescência da BSA pela adição de DANS e determinação da constante de associação (K_a) e constante de Stern-Volmer (K_{sv}) em diferentes temperaturas

Neste método é possível determinar o tipo de *quenching* que acontece entre BSA e DANS. O *quenching* estático acontece devido a formação de um complexo no estado fundamental entre o fluoróforo e o supressor, já o *quenching* dinâmico resulta da colisão entre o fluoróforo e supressor.

O *quenching* estático e dinâmico podem ser diferenciados pela dependência aos valores das constantes de associação em função da temperatura. No *quenching* estático os valores das constantes de associação diminuem ao passo que a temperatura aumenta, isso se deve à redução na estabilidade do complexo com o aumento da temperatura. O inverso acontece no *quenching* dinâmico em que as constantes de associação aumentam conforme há o aumento da temperatura, devido ao aumento do número de colisões proveniente de temperaturas mais altas (Bolattin *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2014).

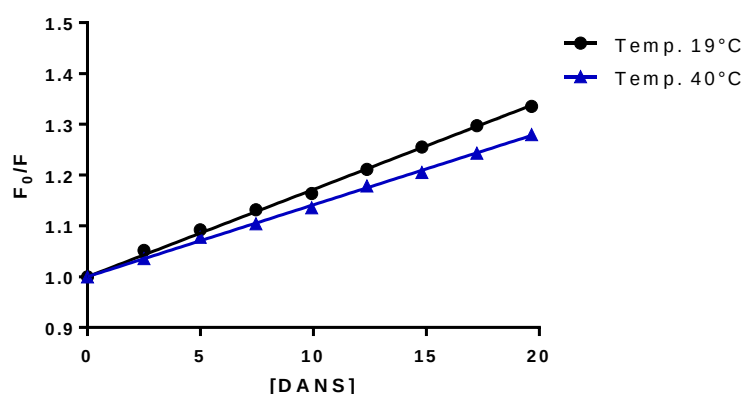
Os dados de fluorescência obtidos através dos espectros (Figura 14) foram submetidos à análise de Stern-Volmer, de acordo com a Equação 5. Pode-se notar ainda, que houve pouca variação na intensidade dos espectros conforme o aumento da temperatura.

Figura 14 - Supressão da fluorescência da BSA por DANS em diferentes temperaturas (19 e 40 °C).
(2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7. $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.



A constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi calculada para determinação de interação e ainda para indicar o tipo de interação entre o ligante e a proteína. Os espectros utilizados para os procedimentos matemáticos, foram os mesmos da Figura 14, e aplicados na Equação 5. A partir dessa aplicação foi obtido o gráfico da Figura 15, em que aparecem as curvas em diferentes temperaturas.

Figura 15 - Determinação da constante de Stern-Volmer através do experimento de Supressão da fluorescência em diferentes temperaturas (19 e 40 °C).
DANS (0-20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) BSA (2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7.



Com o tratamento no gráfico obtém-se os valores das K_{sv} em cada temperatura, elas são apresentadas na Tabela 6 e observa-se que com a variação da temperatura não há nenhuma alteração significativa.

Tabela 6 - Constante de Stern-Volmer (Ksv) entre DANS e BSA obtido através do experimento de *quenching* em diferentes temperaturas

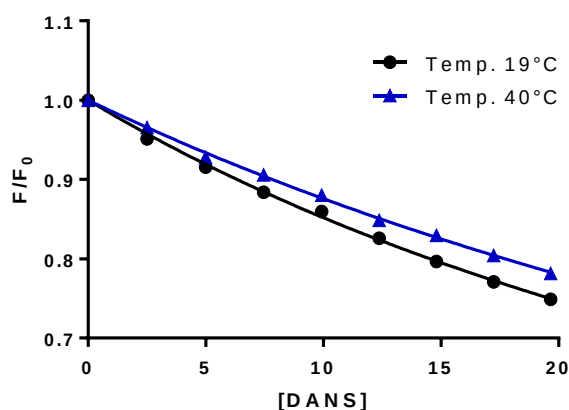
Temperatura (°C)	Ksv (mol ⁻¹ L)
19	1,7 x 10 ⁴
40	1,4 x 10 ⁴

Pode-se notar nos resultados obtidos para as Ksv que há uma diminuição nos valores das constantes de Stern-Volmer conforme há o aumento da temperatura. Essa característica mostra que é possível que esteja havendo a redução na estabilidade do complexo com o aumento da temperatura, ocasionando a formação de um complexo no estado fundamental entre a BSA e o DANS, portanto, um *quenching* estático.

Na sequência, obteve-se as constantes de associação nas temperaturas estudadas (Figura 14), e utilizando a Equação 6, plotou-se o gráfico que aparece na Figura 16.

$$\frac{F}{F_0} = 1 - \varphi \frac{[(K_d + P + L) - \sqrt{(K_d + P + L)^2 - 4 \cdot P \cdot L}]}{2 \cdot P} \quad \text{Equação 6}$$

Figura 16 - Determinação da constante de associação através do experimento de supressão da fluorescência em diferentes temperaturas (19 e 40 °C). DANS (0-20 μmol L⁻¹) BSA (2,5 μmol L⁻¹) em tampão fosfato, pH 7. λ_{ex} = 295 nm.



Os resultados das constantes de associação aparecem na Tabela 7, e através deles observamos que os valores das K_a praticamente não se alteram. Os r^2 mostram que os coeficientes de correlação linear entre os pontos estão próximos a 1,00, apresentado boas correlações.

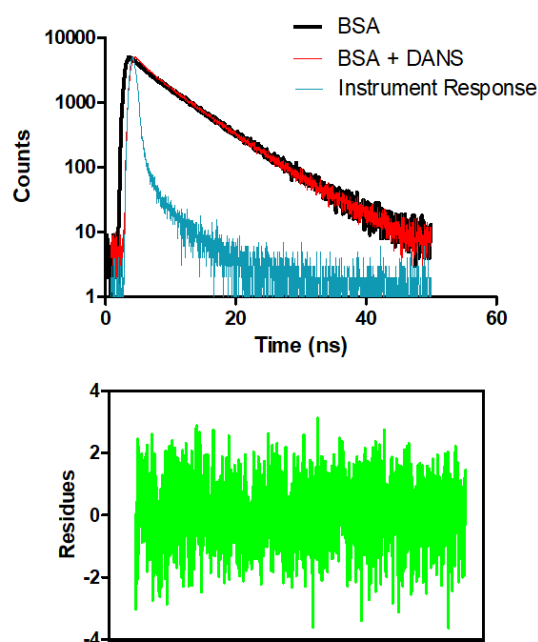
Tabela 7 - Constante de associação (K_a) entre DANS e BSA obtido através do experimento de *quenching* em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	K_a (mol ⁻¹ L)	r^2
19	$2,2 \times 10^4$	0,9981
40	$1,6 \times 10^4$	0,9985

As constantes de associação nas diferentes temperaturas serão utilizadas para cálculo dos parâmetros termodinâmicos na secção 4.7.

4.6 – Estudo de tempo de vida da BSA na presença de DANS

O método de medição do tempo de vida da fluorescência é largamente utilizado para determinar o mecanismo de *quenching* entre o fluoróforo e o supressor (Kumari *et al.*, 2014), assim, podemos obter a confirmação do tipo de supressão obtido no item 4.5. Nesse estudo foi analisado o tempo de vida da proteína em uma concentração de 5 μ M, complexada ou não com DANS a 10 μ M (Figura 17), a fim de garantir excesso do ligante (Behera *et al.*, 2021). Os resultados na Tabela 8 mostram que houve uma diminuição pequena no tempo de vida da BSA excitada causado pela adição de DANS.

Figura 17 - Tempo de vida de fluorescência da BSA na presença e ausência de DANS**Tabela 8** - Tempo de vida de fluorescência (τ) da BSA

	τ_1	τ_2	f_1	f_2	$\tau_m (ns)$	X^2
BSA 5 μM	2,69	6,57	0,1144	0,8856	6,13	1,036
BSA 5 μM + DANS 10 μM	2,24	6,36	0,1197	0,8803	5,87	1,035

Esta diminuição no tempo de vida poderia sugerir um fenômeno de quenching dinâmico, o que não é consistente com a formação de complexo. No entanto, o efeito oposto observado pelo aumento de temperatura, assim como a clara visualização de complexação causada pelo aumento de fluorescência do próprio DANS, não deixam dúvidas da complexação. Portanto, acreditamos que esta pequena diminuição no tempo de vida não seja significativa para não aceitarmos o fenômeno de quenching como estático.

4.7 - Análise termodinâmica da interação entre DANS e BSA

A interação de proteínas e ligantes pode envolver diferentes tipos de forças moleculares. Entre BSA e DANS pode estar acontecendo, por exemplo, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e de Van der Waals. Dessa forma, os parâmetros termodinâmicos de variação da entalpia (ΔH°) (Equação 7), variação de energia livre de

Gibbs (ΔG°) (Equação 8) e variação de entropia (ΔS°) (Equação 9) do sistema são parâmetros capazes de determinar o tipo de interação existente.

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H^\circ}{R} \cdot \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \quad \text{Equação 7}$$

$$\Delta G^\circ = -R \cdot T \cdot \ln K \quad \text{Equação 8}$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \cdot \Delta S^\circ \quad \text{Equação 9}$$

A partir das equações descritas acima foram calculados ΔH° , ΔG° e ΔS° , respectivamente, utilizando os valores das constantes de associação obtidas na

Tabela 7 e suas respectivas temperaturas. Os valores obtidos para esses parâmetros termodinâmicos são mostrados na Tabela 9, com valores ΔH° e $\Delta G^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ \approx 0$.

Tabela 9 - Parâmetros termodinâmicos de ligação entre DANS e BSA.

T (°C)	ΔH° (Kj mol ⁻¹)	ΔG° (Kj mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹)
19 e 40	-12,3	-24,3	0,04

Com base nos valores obtidos é possível propor quais forças estariam envolvidas na interação entre DANS e BSA. Normalmente, a variação de entalpia e de entropia positivos indicam o envolvimento de interações de força hidrofóbica. Ao contrário, se esses valores diminuem (negativos), refletem as ligações de hidrogênio e as forças de van der Waals. Se ΔH° for negativo e ΔS° positivo sugere-se que há o envolvimento da força eletrostática na interação. Esse último caso se enquadra bem dentro dos resultados obtidos na interação do DANS com a BSA. Já o valor negativo de ΔG° , indica envolvimento de interação espontânea (Bolattin *et al.*, 2016; Wani *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2006).

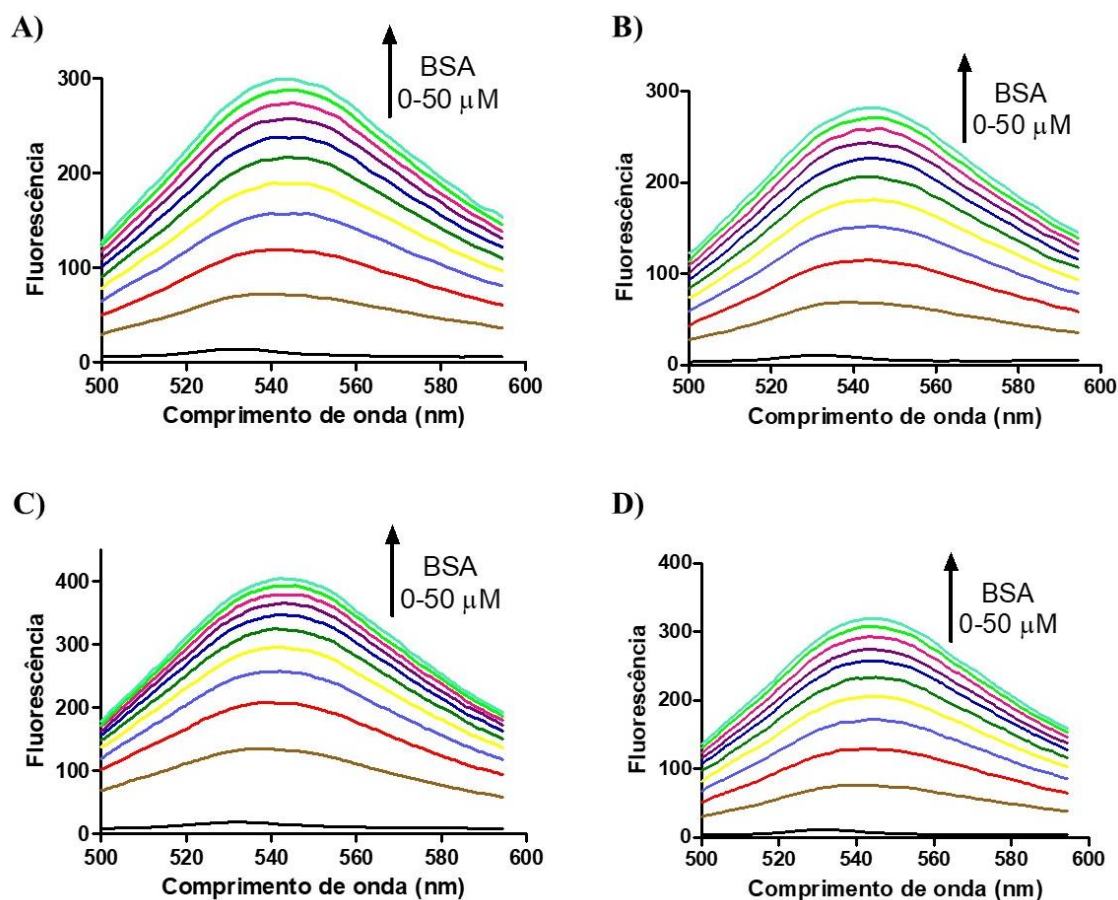
4.8 – Estudo dos sítios de ligação na BSA pelo ligante DANS

O uso de sondas fluorescentes na elucidação dos sítios de ligação de fármacos na albumina é muito difundido na literatura (Graciani e Ximenes, 2013; Kumari *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Ni, Su e Kokot, 2006; Shahid e Chawla, 2017; Sudlow, Birkett e Wade, 1975). Estas sondas se caracterizam por apresentar variação na intensidade de fluorescência e/ou no comprimento de onda máximo de emissão quando estão associadas a proteína. Assim, uma vez que uma sonda fluorescente esteja ligada ao sítio específico da BSA, a adição de um composto seguido da diminuição da intensidade de fluorescência, indicará que a sonda foi deslocada de seu sítio de ligação, ou seja, o composto se ligou à proteína no sítio em que se encontrava a sonda (Rahman, Rahman e Rahman, 2005; Sudlow, Birkett e Wade, 1975).

Segundo Sudlow, as principais regiões de ligação dos ligantes na albumina são os sítios I, II e III (Sudlow, Birkett e Wade, 1975), e são conhecidos, por exemplo, alguns fármacos específicos para cada sítio: sítio I – fenilbutazona e varfarina, sítio II – ibuprofeno e naproxeno e sítio III – digitoxina (De, Kaur e Datta, 2013).

A Figura 7 mostra os espectros do DANS obtidos com a titulação de BSA na ausência e presença dos fármacos varfarina, ibuprofeno e digitoxina, respectivamente. Na Figura 18 pode-se observar que a ligação entre a sonda e a proteína ocorreu mesmo na presença dos fármacos, pois a intensidade dos espectros aumentou à medida que a proteína foi adicionada. Nos gráficos A e B (Figura 18) a intensidade de fluorescência se mantém praticamente a mesma, já no gráfico C (digitoxina) a intensidade aumenta em relação à varfarina e ibuprofeno (A e B, respectivamente), e no gráfico D apresenta-se a intensidade de fluorescência sem a presença de fármaco, ou seja, apenas na presença de proteína e sonda para efeito de comparação.

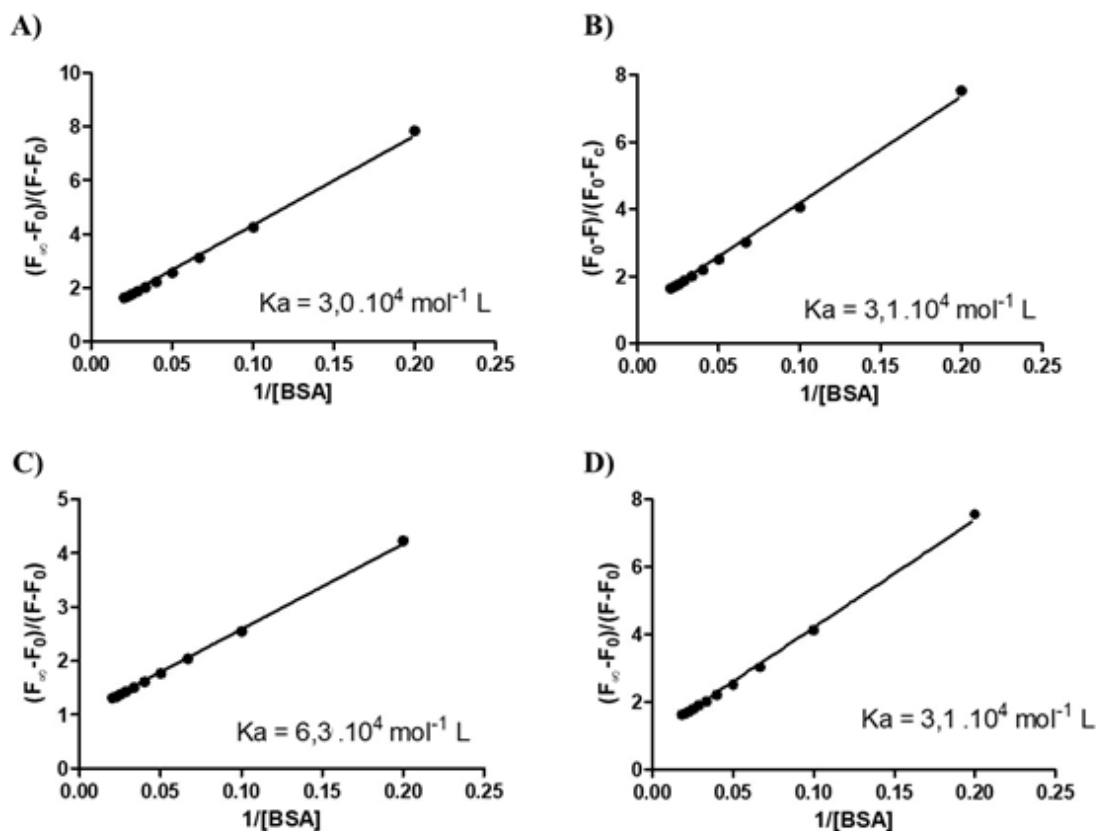
Figura 18 - Espectros da interação entre DANS-BSA e fármacos. A) varfarina; B) ibuprofeno; C) digitoxina, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; D) sem fármaco. DANS ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato, pH 7, 20°C . $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.



Para a determinação da constante de ligação entre DANS e BSA na ausência ou presença dos fármacos pelo aumento da intensidade de fluorescência nos espectros da Figura 18, aplicou-se a Equação 3 para o cálculo da K_a entre eles pelos gráficos (Figura 19) que apresentam as curvas que relacionam a equação utilizada.

A partir dos espectros não foi possível determinar se houve competição entre fármaco e sonda por um sítio de ligação, pois os espectros da sonda não apresentaram diminuição na intensidade de fluorescência quando adicionado o fármaco, como era de se esperar, caso o fármaco conseguisse deslocar a sonda do seu sítio de ligação. Por exemplo, se na Figura 18, observando o gráfico A, a intensidade da fluorescência tivesse diminuído ao adicionar a varfarina ao DANS, significaria que o fármaco possivelmente teria deslocado a sonda que estaria ligada ao sítio I, o que não acontece.

Figura 19 - Determinação da constante de associação através da interação ou não entre fármacos. A) varfarina; B) ibuprofeno; C) digitoxina, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; D) sem fármaco, DANS $5 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Os valores obtidos para as constantes de associação são mostrados na Tabela 10. Podemos observar que as K_a praticamente não se alteram novamente, mantendo um valor aproximado de $3,0 \times 10^4 \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$ para varfarina e ibuprofeno, fármacos de sítio I e II, respectivamente e para a amostra sem fármaco, confirmando os resultados esperados a partir dos gráficos da Figura 18, no qual não houve alteração na intensidade de fluorescência, como era esperado.

Já para a digitoxina (sítio III), houve um aumento na constante para $6 \times 10^4 \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$, mas que está ainda na mesma ordem de grandeza, sem que possamos verificar uma possível preferência para esse sítio. Esse aumento na constante de associação, suporta o que foi discutido a cima, em que o espectro da digitoxina (Figura 18, gráfico C) apresentam um aumento na intensidade de fluorescência, condizendo então com o leve aumento na sua constante de associação.

Tabela 10 - Constantes de associações (K_a) obtidas no experimento de competição com fármacos e constante de associação obtida sem a presença do fármaco. DANS ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), fármaco ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão fosfato, pH 7.

Fármaco	$K_a (\times 10^4) \text{ mol}^{-1} \text{ L}$
Varfarina	$3,1 \pm 0,1$
Ibuprofeno	$3,2 \pm 0,1$
Digitoxina	$6,4 \pm 0,2$
Sem fármaco	$3,4 \pm 0,1$

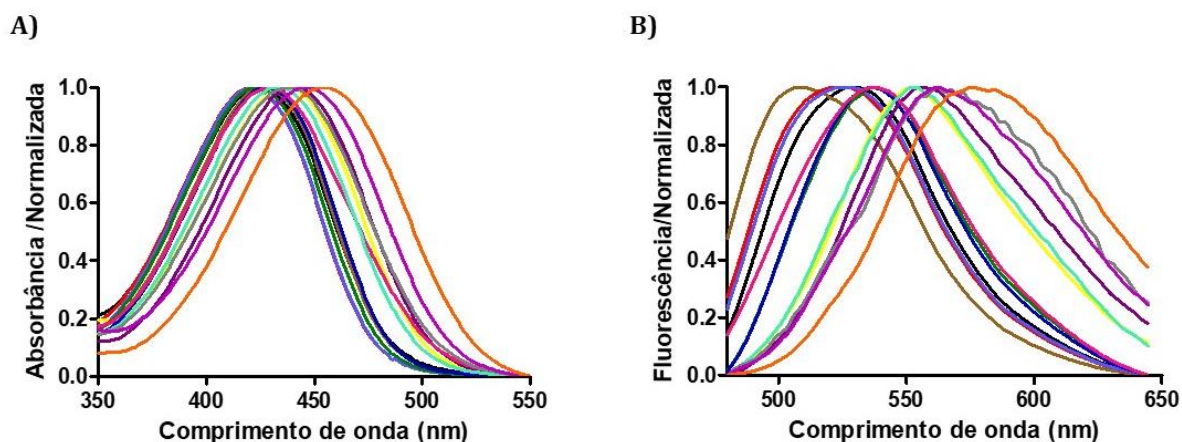
Portanto, com base nos resultados dos espectros e das constantes de associação para cada fármaco de ligação específica em diferentes sítios de ligação na BSA (I, II ou III) e comparando o valor obtido para a constante de associação da sonda + proteína, verifica-se um valor muito próximo nessa comparação. Dessa forma, podemos dizer que o DANS não apresenta preferência de ligação por nenhum sítio específico da BSA.

4.9 – Estudos solvatocrômicos do 4-dimetilamino- β -nitroestireno (DANS)

O efeito solvatocrômico se baseia na alteração de cor e/ou fluorescência de uma substância dependendo da polaridade do meio, havendo ainda alteração nos comprimentos de onda e intensidade de absorção e emissão. A variação nos comprimentos de onda dos espectros pode ser classificada em batocrômico, que é o deslocamento para comprimento de ondas maiores (ou para o vermelho) e hipsocrômico, classificado como deslocamento para comprimento de ondas menores (ou para o azul) (Lakowicz, 2006; Matiadis *et al.*, 2021).

Desse modo, foram obtidos espectros de fluorescência e absorbância para o DANS ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) em diferentes solventes e estudado os efeitos solvatocrômicos da sonda. Os resultados dos espectros de fluorescência e absorbância são apresentados na Figura 20, e mostram um deslocamento no comprimento de onda máximo do DANS em função do solvente utilizado, evidenciando sua característica solvatocrômica. Os solventes utilizados no estudo foram dioxano, tolueno, acetato de heptila, acetato de hexila, clorofórmio, acetato de etila, THF, diclorometano, heptanol, acetona, acetonitrila, DMF e DMSO. Estes foram selecionados de acordo com as diferentes polaridades dos mesmos e divididos em apolares, polares próticos e polares apróticos.

Figura 20 - Solvatocromismo no DANS. A) absorbância, B) fluorescência. DANS (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) nos solventes: dioxano, tolueno, acetato de heptila, acetato de hexila, clorofórmio, acetato de etila, THF, diclorometano, heptanol, acetona, acetonitrila, DMF e DMSO. $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.



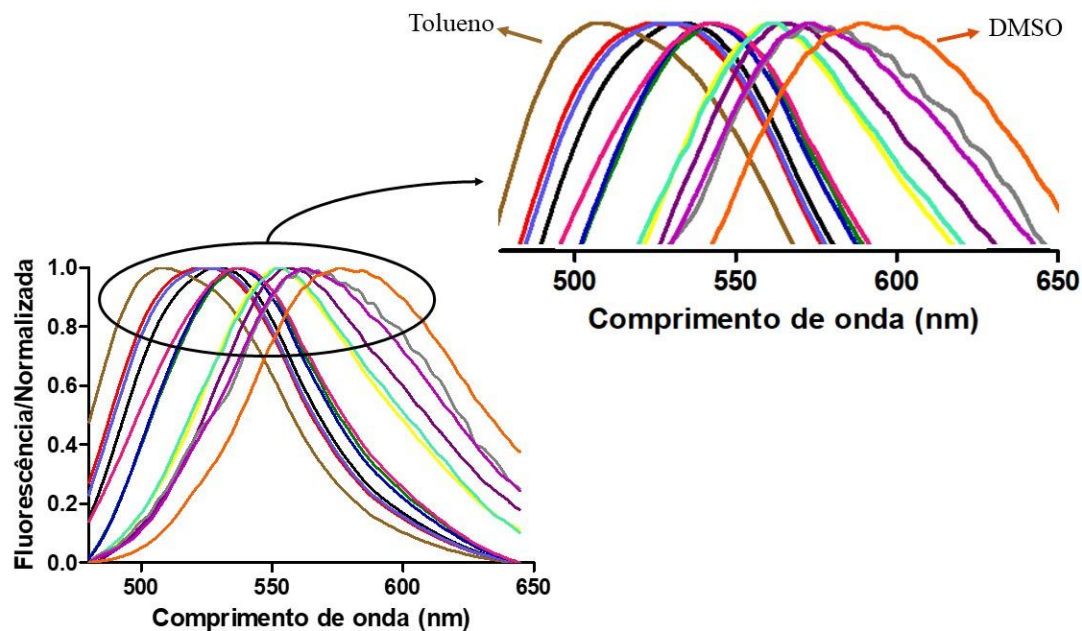
A partir dos espectros gerados em função da fluorescência e absorbância foram obtidos os valores dos comprimentos de onda máximo (nm) do DANS em cada solvente esses máximos convertidos em números de onda (cm^{-1}) de acordo com a Equação 10.

$$x_{\text{cm}^{-1}} = \frac{10^7}{x_{\text{nm}}} \quad \text{Equação 10}$$

Os dados espectroscópicos obtidos são apresentados na Tabela 11, em que temos o comprimento de onda máximo (λ), número de ondas ($\bar{\nu}$), deslocamento de Stokes ($\Delta\bar{\nu}$) e a somatória $\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ dos máximos de absorbância e fluorescência.

Tabela 11 - Medições espectroscópicas de DANS em diferentes solventes

Solventes	λ_a (nm)	$\bar{\nu}_a$ (cm ⁻¹)	λ_f (nm)	$\bar{\nu}_f$ (cm ⁻¹)	$\Delta\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ (cm ⁻¹)
Dioxano	424	23585	528	18939	4646	42524
Tolueno	426	23474	507	19724	3750	43198
Acetato de heptila	421	23753	524	19084	4669	42837
Acetato de hexila	421	23753	526	19011	4742	42764
Clorofórmio	437	22883	552	18116	4767	40999
Acetato de etila	422	23697	537	18622	5075	42319
Tetraidrofurano	428	23364	537	18622	4743	41986
Diclorometano	441	22676	557	17953	4722	40629
Heptanol	430	23256	537	18605	4651	41860
Acetona	433	23095	553	18083	5012	41178
Acetonitrila	438	22831	573	17452	5379	40283
Dimetilformamida	446	22422	563	17762	4660	40184
Dimetilsulfóxido	454	22026	579	17271	4755	39298
Albumina sérica bovina	456	21929	546	18281	3648	40211

Figura 21 - Espectro fluorescência ampliado, destacando os diferentes comprimentos de onda do tolueno e DMSO

Podemos perceber as diferenças numéricas (Tabela 11) entre os máximos de absorção e fluorescência dos solventes. Na Figura 21, fica evidente essa diferença entre os máximos de emissão do tolueno em 507 nm e dimetilsulfóxido (DMSO) em 579 nm

que emite em comprimentos de onda maiores, com deslocamento batocrômico, devido ao aumento da polaridade dos solventes. O tolueno é um solvente apolar, que apresenta baixa constante dielétrica e interage fracamente com o soluto (DANS), já o DMSO é um solvente polar aprótico que tem com alta constante dielétrica. Esta característica dos solventes mais polares em provocarem a emissão de fluorescência das moléculas fluorescentes em comprimentos de onda maiores se deve a sua maior capacidade em solvatar as mesmas quando no estado excitado e, conseqüentemente, as estabilizando. Vale lembrar, que o processo de excitação provoca um aumento no momento de dipolo da sonda comparado ao mesmo no estado fundamental. Portanto, o estado excitado é, tipicamente, mais sensível a polaridade do meio.

Em geral o deslocamento de Stokes é maior conforme a polaridade do solvente aumenta, como exemplo, o tolueno apresenta $\overline{\Delta\nu} = 3750 \text{ cm}^{-1}$ e a acetonitrila $\overline{\Delta\nu} = 5379 \text{ cm}^{-1}$. A acetonitrila apresenta maior polaridade por ser um solvente aprótico polar, enquanto que o tolueno é um solvente apolar, com menor polaridade. Segundo (Thipperudrappa *et al.*, 2017) essas características indicam boa resposta à polaridade e ligação de hidrogênio dos solventes, e ainda outro fator que pode aumentar essa sensibilidade do DANS em relação aos solventes é o fenômeno de ICT - *intramolecular charge transfer*, que é a transferência de carga interna na molécula, esse fenômeno acontece quando a molécula apresenta um grupo doador e um grupo receptor de elétrons, conectados por um sistema conjugado que proporciona a “movimentação” entre os elétrons. (Lakowicz, 2006; Mallick, Pal e Koner, 2016)

4.9.1 – Relações matemáticas utilizadas em modelos solvatocrômicos

Os máximos de absorção e fluorescência do DANS obtidos nos diferentes solventes foram correlacionados com as funções de polarizabilidade do solvente, que por sua vez são funções de suas constantes dielétricas e índices de refrações. Na teoria dos efeitos gerais do solvente, o fluoróforo é considerado um dipolo em um meio contínuo de constante dielétrica uniforme. Este modelo não considera interações intermoleculares entre soluto e solvente como ligações de hidrogênio, interações iônicas, entre outras. A estabilização do soluto se dá apenas pelo campo elétrico induzido no solvente pelo soluto (Matiadis *et al.*, 2021).

A equação de Lippert-Mataga (Equação 11) descreve essas propriedades relacionando o deslocamento de Stokes ($V_A - V_F$) com a função da polaridade do solvente

(Δf) e a variação de momento de dipolo entre estado excitado e fundamental. Na Equação 11, h é a constante de Planck ($= 6.6256 \times 10^{-27}$ ergs), c é a velocidade da luz ($= 2.9979 \times 10^{10}$ cm/s) e a é o raio da cavidade do fluoróforo, V_A e V_F são os números de onda (cm^{-1}) da absorção e emissão, respectivamente. A Equação 12, é chamado de função de polarizabilidade do solvente, que descreve as mudanças espectrais devido à reorientação das moléculas de solvente, ε e n são a constante dielétrica e índice de refração, respectivamente (Ghanadzadeh Gilani *et al.*, 2019; Lakowicz, 2006; Zhang *et al.*, 2021).

$$\overline{V}_A - \overline{V}_F = \frac{2\Delta f}{hca^3} (\mu_e - \mu_g)^2 \quad \text{Equação 11}$$

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad \text{Equação 12}$$

Outras equações que também descrevem o efeito da polaridade do solvente, os fatores de polarizabilidade, os momentos de dipolo no estado excitado e fundamental são as de Bilot-Kawski, que consideram a molécula novamente em uma cavidade esférica. No entanto, Bilot-Kawski propôs dois modelos matemáticos, sendo que uma utiliza diferença dos valores dos comprimentos de onda máximos dos espectros de absorbância e fluorescência (Equação 13) e a outra considera a soma desses valores (Equação 15) (Kawski e Bojarski, 2011). Comparado ao modelo de Lippert-Mataga, que não leva em conta a polarizabilidade do soluto, o modelo de Bilot-Kawski considera o soluto como isotropicamente polarizado, o que explica a sua maior complexidade (Kawski e Bojarski, 2011; Matiadis *et al.*, 2021).

$$\overline{v}_A - \overline{v}_F = \frac{2(\mu_e - \mu_g)^2}{hca^3} \cdot f(\varepsilon, n) + \text{const} \quad \text{Equação 13}$$

$$f(\varepsilon, n) = \left(\frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \cdot \left(\frac{2n^2 + 1}{n^2 + 2} \right) \quad \text{Equação 14}$$

Na Equação 13 e Equação 15 apresentam os mesmos termos entre si, $\overline{\nu}_A$ e $\overline{\nu}_F$, μ_e e μ_g , h , c e a , e são os números de onda (cm^{-1}) da absorção e emissão, a variação de momento de dipolo entre estado excitado e fundamental, h é a constante de Planck ($= 6.6256 \times 10^{-27}$ ergs), c é a velocidade da luz ($= 2.9979 \times 10^{10}$ cm/s) e a é o raio da cavidade do fluoróforo. Outra diferença entre ambas as equações está nos termos f e φ , que são descritos pelas Equação 14 e Equação 16, respectivamente, e nelas se relacionam a constante dielétrica (ϵ) e o índice de refração de cada solvente (n), que apresentam valores tabelados na literatura (Lide, 1995).

$$\overline{\nu}_A + \overline{\nu}_F = - \left(\frac{2(\mu_e - \mu_g)^2}{hca^3} \right) \cdot \varphi(\epsilon, n) + \text{const} \quad \text{Equação 15}$$

$$\varphi(\epsilon, n) = \left[\left(\frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \cdot \left(\frac{2n^2 + 1}{n^2 + 2} \right) + \left(\frac{3(n^4 - 1)}{(n^2 + 2)^2} \right) \right] \quad \text{Equação 16}$$

O modelo de McRae se destaca pela diferença na cavidade onde a molécula do soluto está inserida, seja ela em uma cavidade esférica (Equação 18) ou cilíndrica (Equação 19), de acordo com cada modelo matemático (McRae, 1957). Cabe ressaltar que nos modelos anteriores, Lippert-Mataga e Bilot-Kawski, a cavidade é considerada esférica. (Kawski e Bojarski, 2011; Lakowicz, 2006).

$$\overline{\nu}_F^{\text{máx}} = \overline{\nu}^{\circ}_{\text{máx}} - \frac{2\mu^2}{hca^3} \cdot [F] \quad \text{Equação 17}$$

$$F_e = \frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad \text{Equação 18}$$

$$F_c = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad \text{Equação 19}$$

A Equação 17 relaciona apenas o máximo de emissão dos espectros de fluorescência, portanto, diferente das equações de Lippert-Mataga e Bilot-Kawski que levam em consideração os espectros de absorbância. $\nu_{\text{máx}}$, μ^2/p^3 , h e c , são os números de onda (cm^{-1}) de fluorescência, o fator dipolar, h é a constante de Planck ($= 6.6256 \times 10^{-27}$ ergs) e c é a velocidade da luz ($= 2.9979 \times 10^{10}$ cm/s), respectivamente. Assim, dependendo da forma do dipolo, esférica ou cilíndrica, utiliza-se a Equação 18 ou a Equação 19 em F. De acordo com as equações dos modelos matemáticos utilizados para interpretar resultados solvatocrômicos a Tabela 12 apresenta as funções de polaridade de cada modelo de acordo com cada solvente.

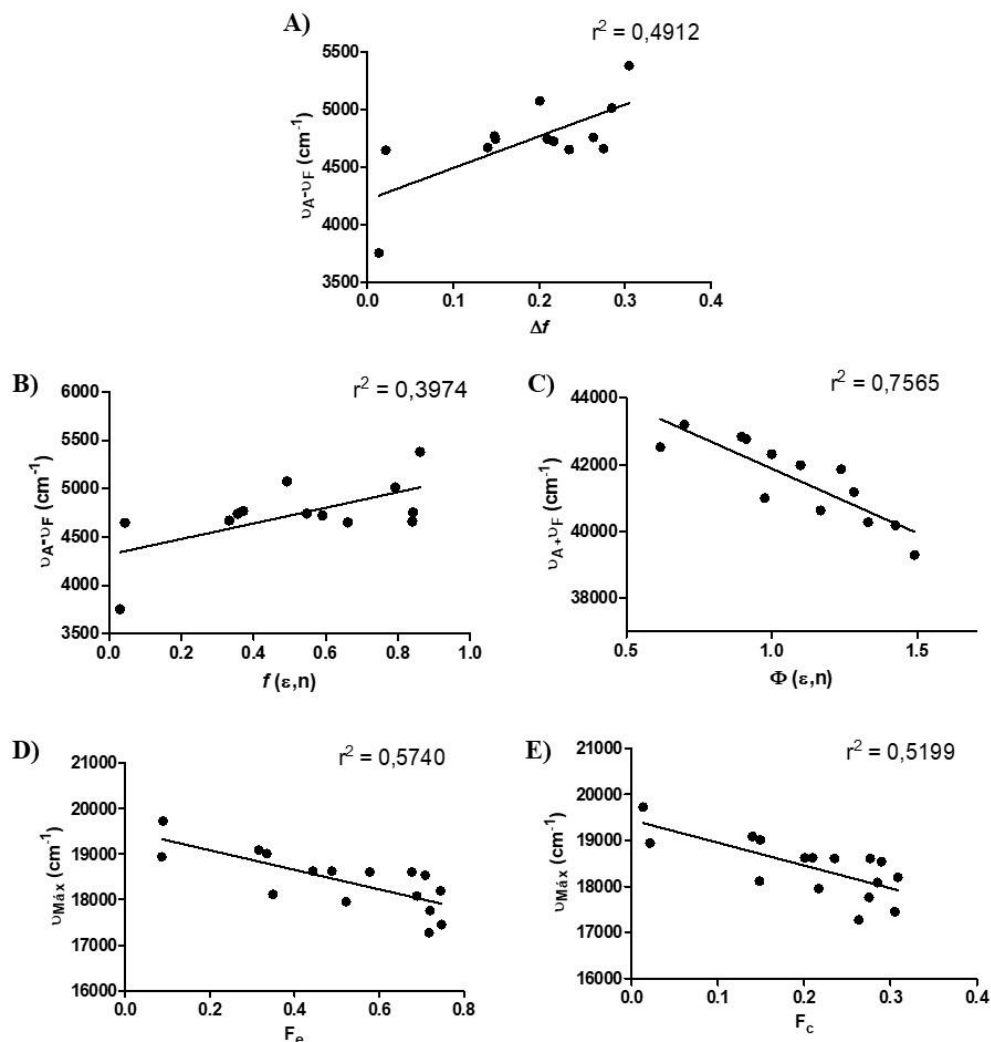
Tabela 12 - Funções de polaridade dos solventes

Solventes	ϵ	n	Δf (ϵ, n)	f (ϵ, n)	ϕ (ϵ, n)	F_e (ϵ, n)	F_c (ϵ, n)
Dioxano	2,22	1,422	0,022	0,044	0,617	0,086	0,021
Tolueno	2,38	1,496	0,013	0,030	0,699	0,089	0,014
Acetato de heptila	4,20	1,415	0,140	0,332	0,896	0,316	0,141
Acetato de hexila	4,42	1,409	0,149	0,356	0,912	0,334	0,145
Clorofórmio	4,81	1,446	0,148	0,371	0,975	0,349	0,149
Acetato de etila	6,08	1,372	0,201	0,493	0,999	0,443	0,201
Tetraidrofurano	7,52	1,405	0,210	0,548	1,098	0,488	0,209
Diclorometano	8,93	1,424	0,217	0,590	1,166	0,522	0,217
Heptanol	11,75	1,425	0,235	0,661	1,237	0,578	0,236
Acetona	21,01	1,359	0,285	0,793	1,281	0,689	0,285
Acetonitrila	36,64	1,344	0,305	0,861	1,330	0,747	0,305
Dimetilformamida	38,25	1,431	0,275	0,839	1,423	0,720	0,276
Dimetilsulfóxido	47,24	1,479	0,263	0,841	1,489	0,718	0,264

Modelo Lippert-Mataga $\Delta f(\epsilon, n)$; modelo Bilot-Kawski $f(\epsilon, n)$ e $\phi(\epsilon, n)$; modelo McRae $F_e(\epsilon, n)$ e $F_c(\epsilon, n)$

Utilizando as propriedades espectroscópicas $\Delta\bar{\nu}$, $\bar{\nu}_A + \bar{\nu}_F$, $\bar{\nu}_{F \text{ máx}}$ foram plotados em função dos parâmetros de polaridade dos solventes, $\Delta f(\epsilon, n)$, $f(\epsilon, n)$, $\phi(\epsilon, n)$, $F_e(\epsilon, n)$ e $F_c(\epsilon, n)$.

Figura 22 – Correlações entre funções de polaridade dos solventes e características espectroscópicas do DANS. A) Lippert Mataga, $\Delta\bar{\nu}$ versus Δf (ϵ , n); B) Bilot-Kawski, $\Delta\bar{\nu}$ versus f (ϵ , n); C) Bilot-Kawski, $\bar{\nu}_A + \bar{\nu}_F$ versus ϕ (ϵ , n); D) McRae, $\bar{\nu}_F^{máx}$ versus F_e (ϵ , n); E) McRae, $\bar{\nu}_F^{máx}$ versus F_c (ϵ , n).

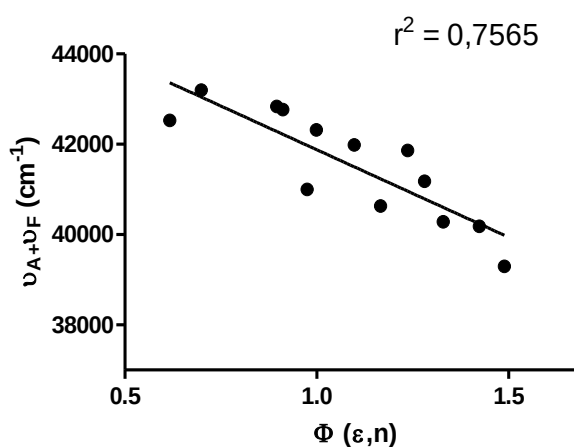


A escolha do melhor modelo matemático para correlacionar as funções de polaridade e os resultados espectroscópicos foi baseada nos coeficientes de correlação linear (r^2) das retas. Dados os r^2 das retas de cada modelo matemático, sendo eles Lippert-Mataga (Δf), Bilot-Kawski (f e ϕ) e McRae ($F_{\text{esférico}}$ e $F_{\text{cilindrico}}$), o coeficiente de correlação linear que mais se aproxima a 1 foi o do modelo ϕ – Bilot-Kawski, $r^2 = 0,7565$. Na sequência, este modelo foi testado no que diz respeito a sua capacidade de prever constantes dielétricas de misturas de solventes com valores de ϵ e n conhecidas.

4.9.1.1 – Solvatocromismo no DANS e sua aplicação para previsão de constante dielétrica em mistura de solventes – Bilot-Kawski

A partir das medidas espectroscópicas de absorvância e fluorescência foi feita a soma dos valores máximos dos números de onda do DANS em cada solvente e gerado os valores utilizados no eixo y. Para os valores do eixo x, foi utilizado a Equação 16 e os valores de ϵ e n de cada solvente, de acordo com a Tabela 11. A correlação gerou a reta apresentada na Figura 23, cuja equação foi obtida por regressão linear (Equação 20).

Figura 23 - Modelo solvatocrômico de Bilot-Kawski dos solventes



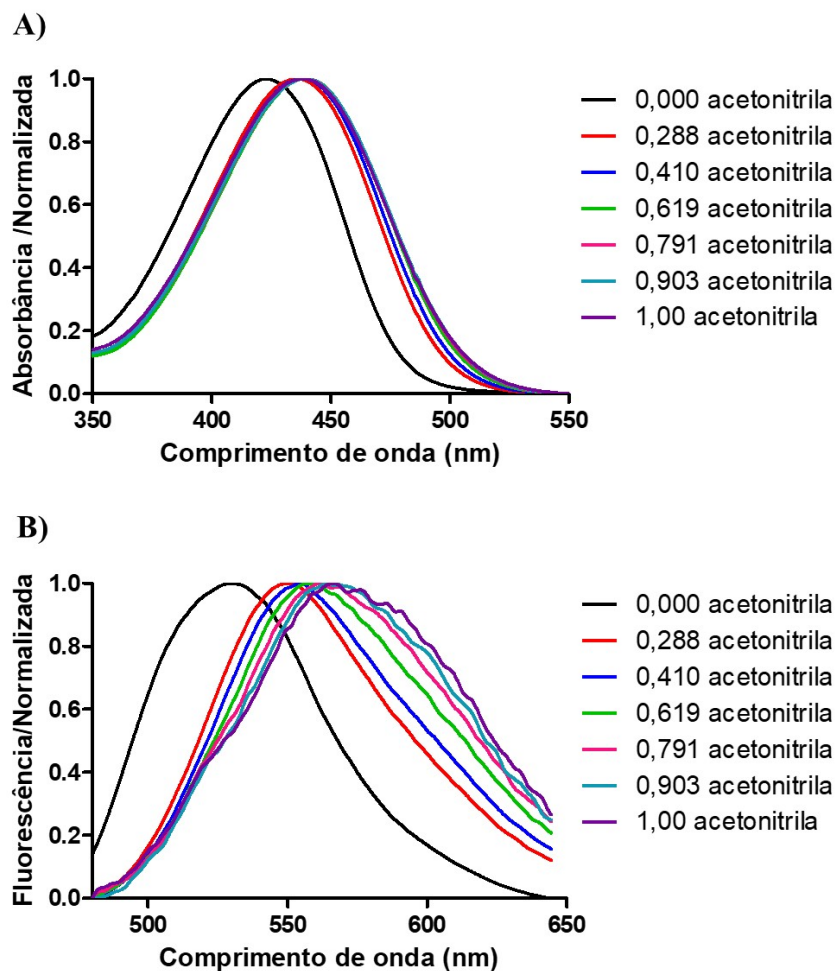
$$\bar{\nu}_A + \bar{\nu}_F = -3874 \cdot \phi + 45750$$

Equação 20

4.9.1.1.1 – Utilização de dados da mistura acetonitrila + dioxano

Para testar a capacidade de previsão da Equação 20, a primeira mistura de solventes escolhida foi a mistura de acetonitrila com dioxano. A partir da leitura dos espectros de absorvância e fluorescência do DANS nas misturas (fração molar de acetonitrila 0,00; 0,28; 0,41; 0,69; 0,79; 0,90; 1,00), fica evidente o efeito solvatocrômico que estas provocam no DANS (Figura 24). Pode-se perceber o efeito solvatocrômico mais presente nos espectros de fluorescência que são mais deslocados para comprimentos de onda maiores, quando comparados com os de absorção que praticamente não há alteração dos comprimentos de onda máximo.

Figura 24 - Espectros de A) Absorbância, B) fluorescência do DANS em mistura acetonitrila + dioxano. DANS ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.



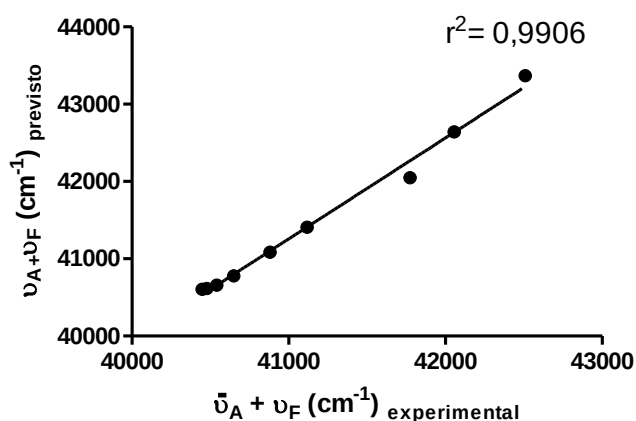
Comparando, por exemplo, os espectros de emissão na fração molar de 0,00 a 0,288 de acetonitrila, observamos que o deslocamento dos espectros de emissão acontece para comprimentos de onda maiores, comprovando novamente que quando aumentamos a polaridade do meio emite-se em comprimentos de onda maiores e de menor energia, e esse comportamento se repete até atingir a fração molar de 1,00 de acetonitrila, representando a maior polaridade da mistura. A partir desses espectros e de seus máximos de absorbância e fluorescência, obteve-se os valores experimentais ($\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$) (Tabela 13). Então, a partir dos valores de ϵ e n para as misturas de solventes (Kolling, 1986), calculou-se os respectivos valores da função de polaridade ϕ (Equação 16) e aplicou-se os mesmos à equação obtida experimentalmente (Equação 20), obtendo-se assim os valores previstos para $\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ (Tabela 13).

Tabela 13 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes - acetonitrila + dioxano: Experimental versus Previsto

Acetonitrila (X _{CH₃CN})	n	ε	φ	$\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ previsto (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ experimental (cm ⁻¹)
0,000	1,422	2,21	0,61	43369,17	42508,65
0,078	1,418	3,35	0,80	42643,24	42056,16
0,153	1,415	4,88	0,96	42048,03	41774,43
0,288	1,408	8,03	1,12	41409,17	41117,63
0,410	1,400	11,27	1,20	41083,98	40881,62
0,619	1,385	18,01	1,28	40777,19	40648,44
0,719	1,369	24,85	1,31	40658,27	40541,07
0,903	1,356	30,52	1,33	40616,54	40478,29
1,000	1,344	36,01	1,33	40605,19	40446,91

A ótima correlação entre $(\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f)$ experimental e previsto (Figura 25) mostra a potencialidade da Equação 20 em prever valores desconhecidos da somatória de comprimento de onda de absorbância e fluorescência de misturas de solventes.

Figura 25 - Comparação da somatória dos números de onda máximos de absorção e fluorescência obtidos experimentalmente e previstos



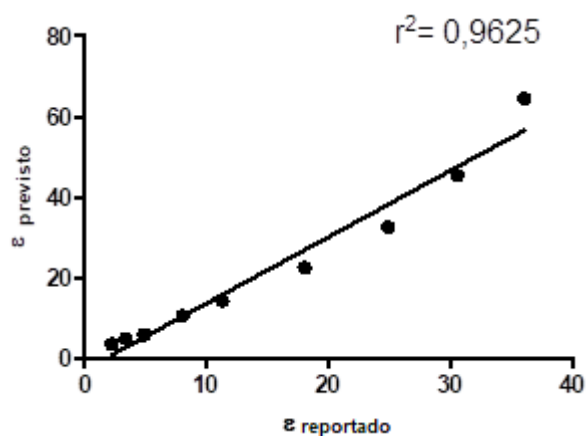
O próximo passo foi aplicar os valores experimentais de $\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ para as misturas na equação 20, obter o valor de ϕ e, a partir de medidas de índice de refração das misturas, aplicar a equação 16, obtendo-se assim as constantes dielétricas previstas, que foram comparadas com as experimentais de literatura (Tabela 14). Como pode ser visto, uma

boa correlação foi obtida. A Figura 26 mostra a correlação entre os valores reportados (literatura) e previstos pelo uso da equação 20.

Tabela 14 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes - acetonitrila + dioxano para o cálculo da constante dielétrica

Acetonitrila (X _{CH₃CN})	n	ϵ reportado	ϕ	$\overline{\nu}_a + \overline{\nu}_f$ experimental (cm ⁻¹)	ϵ previsto
0,000	1,422	2,21	0,84	42508,65	3,60
0,078	1,418	3,35	0,95	42056,16	4,83
0,153	1,415	4,88	1,03	41774,43	5,90
0,288	1,408	8,03	1,19	41117,63	10,58
0,410	1,400	11,27	1,26	40881,62	14,29
0,619	1,385	18,01	1,32	40648,44	22,41
0,719	1,369	24,85	1,35	40541,07	32,6
0,903	1,356	30,52	1,36	40478,29	45,44
1,000	1,344	36,01	1,37	40446,91	64,49

Figura 26 - Comparação dos valores previstos e tabelados das constantes dielétricas das misturas acetonitrila + dioxano



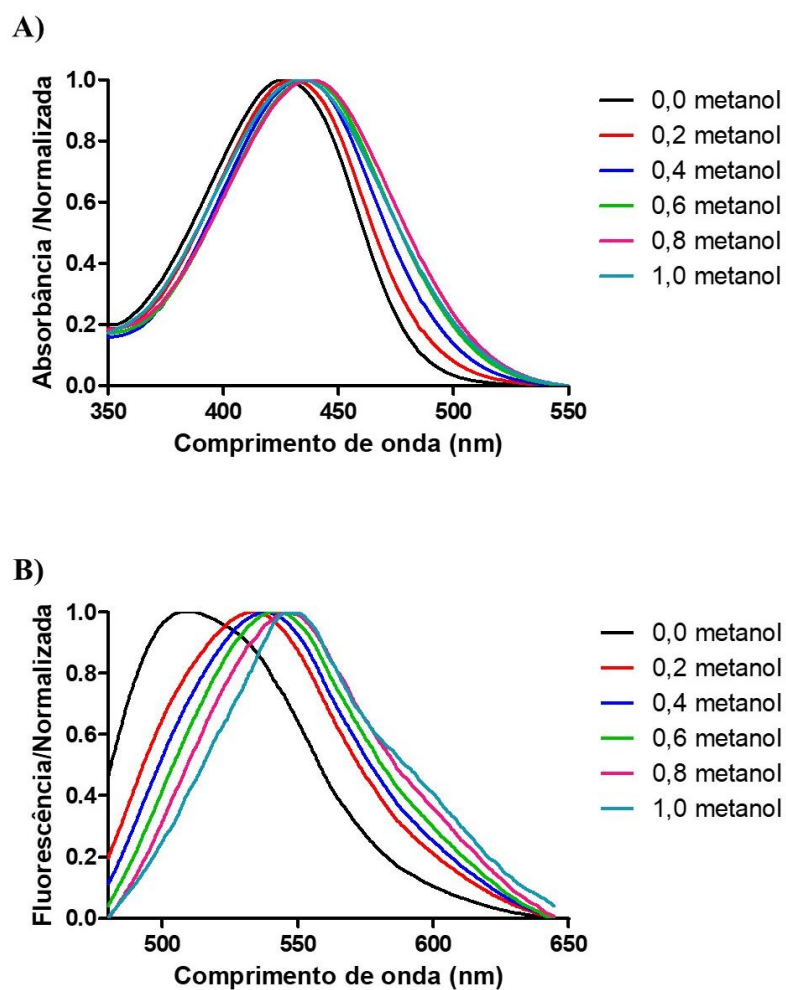
O coeficiente de correlação linear mostra uma boa correlação entre os valores tabelados na literatura e os previstos para a constante dielétrica da mistura de acetonitrila + dioxano através da equação geral dos solventes.

Na sequência, uma mistura de solventes de metanol + tolueno foi testada a fim de comprovar a capacidade do modelo em prever a constante dielétrica de misturas, ou seja, observar se os valores de $\epsilon_{\text{previsto}}$ também apresentam uma boa correlação linear com o $\epsilon_{\text{reportado}}$.

4.9.1.1.2 – Utilização de dados da mistura metanol + tolueno

A segunda mistura analisada foi a de metanol com tolueno (fração molar de metanol 0,00; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0) e foram obtidos espectros de absorbância e fluorescência do DANS nas misturas (Figura 27). Novamente é possível observar uma diferença maior no deslocamento dos espectros para a fluorescência (Figura 27, A) comparado a absorbância (Figura 27, B) em solventes mais polares, como é o caso do metanol.

Figura 27 - Espectros de A) Absorbância, B) fluorescência da mistura metanol + tolueno. DANS ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.



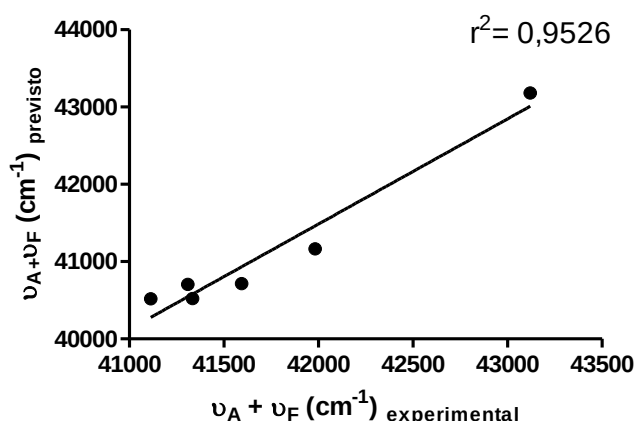
A partir desses dados (Figura 27), foi construída a Tabela 15 com os valores dos parâmetros espectroscópicos obtidos através dos espectros.

Tabela 15 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes metanol + tolueno

Metanol ($X_{\text{CH}_3\text{OH}}$)	n	ϵ reportado	ϕ	$\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ previsto (cm^{-1})	$\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ experimental (cm^{-1})
0	1,4985	2,2	0,68	43181,91	43120,54
0,2	1,489	7,82	0,97	41164,89	41982,41
0,4	1,47	12,86	1,07	40714,59	41594,35
0,6	1,441	19,21	1,14	40522,62	41333,48
0,8	1,399	25,96	1,19	40518,06	41112,59
1	1,3305	31,89	1,15	40706,13	41309,62

Os valores de ϕ foram calculados através da Equação 16 a partir de ϵ e n tabelados (Reis et.al., 2009) e pela Equação 20 calculado a soma de $\bar{v}_a + \bar{v}_f$ previsto pela equação geral dos solventes para a mistura de metanol + tolueno, a partir do valor de ϕ obtido anteriormente. Para verificação da correlação entre o valor de $\bar{v}_a + \bar{v}_f$ experimental e previsto foi plotado um gráfico (Figura 28) e analisado o coeficiente de correlação linear da reta.

Figura 28 - Comparação da somatória dos números de onda máximos de absorção e fluorescência obtidos experimentalmente e previstos



O r^2 obtido (Figura 28) apresentou um bom resultado, mostrando uma boa correlação de dados experimentais e calculados, possibilitando novamente que os valores de constantes dielétrica fossem previstos para essa mistura.

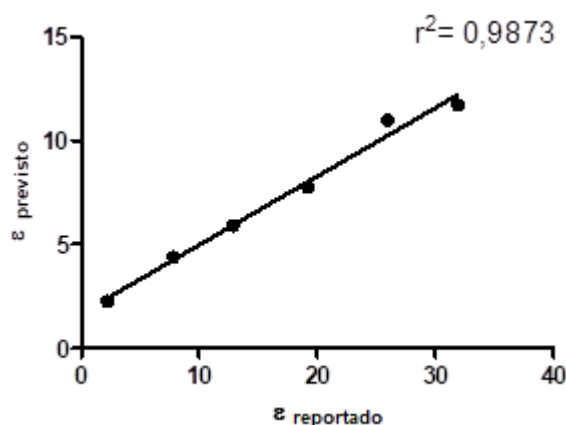
E então, foram calculados valores de ϕ através da equação geral do solvente (Equação 20) a partir dos valores de $\bar{v}_a + \bar{v}_f$ experimentais, e com os dados gerados para ϕ foi utilizada a Equação 16 para o cálculo da constante dielétrica das frações molares de cada mistura de metanol + tolueno. Esses resultados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes - metanol + tolueno para o cálculo da constante dielétrica

Metanol ($X_{\text{CH}_3\text{OH}}$)	n	ε reportado	ϕ	$\overline{\nu_a} + \overline{\nu_f}$ experimental (cm^{-1})	ε previsto
0	1,4985	2,2	0,68	43120,54	2,27
0,2	1,489	7,82	0,97	41982,41	4,40
0,4	1,47	12,86	1,07	41594,35	5,91
0,6	1,441	19,21	1,14	41333,48	7,77
0,8	1,399	25,96	1,19	41112,59	10,99
1	1,3305	31,89	1,15	41309,62	11,73

Para comparação dos valores de $\varepsilon_{\text{reportado}}$ e $\varepsilon_{\text{previsto}}$ foi plotado o gráfico abaixo (Figura 29) e verificação o r^2 dessa correlação.

Figura 29 - Comparação dos valores previstos e tabelados pela literatura da constante dielétrica da mistura metanol + tolueno



Novamente a equação geral dos solventes mostrou que possui boa correlação para que possa estimar valores de constante dielétrica através dela.

4.9.1.1.3 – Aplicação da equação geral dos solventes – Bilot-Kawski para estimativa da constante dielétrica no interior da BSA

Considerando os bons resultados onde se pode prever as constantes dielétricas de misturas de solventes a partir das equações geradas pelas medidas em solventes puros dos máximos de absorvância e fluorescência do DANS, propôs-se a aplicação desse mesmo método para o cálculo da constante dielétrica da BSA no ambiente da sonda - DANS. Utilizando a equação geral dos solventes (Equação 20) foi calculado ϕ a partir do

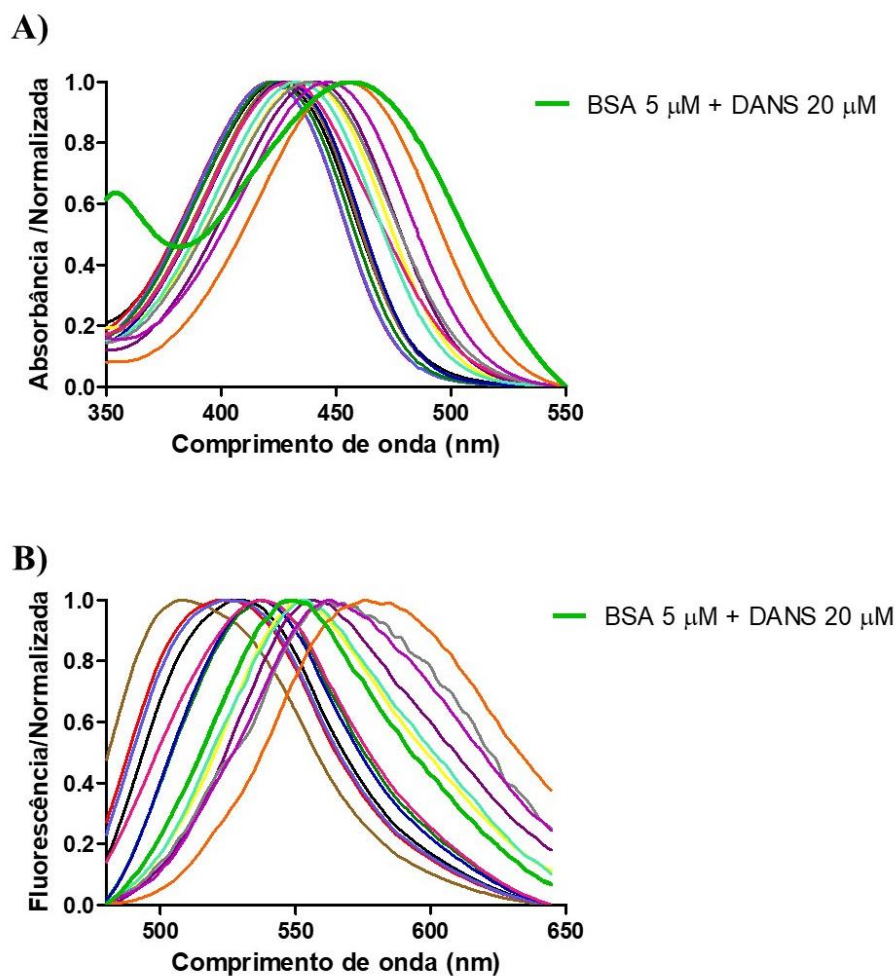
valor de $\overline{\nu}_a + \overline{\nu}_f$ e utilizando novamente o modelo ϕ – Bilot-Kawski (Equação 16) foi calculado ϵ , com os valores prévios de ϕ e n (medido no refratômetro) o valor da constante dielétrica é apresentado na Tabela 17.

Tabela 17 - Medidas espectroscópicas do DANS no ambiente da BSA para o cálculo da constante dielétrica

	n	ϕ	$\overline{\nu}_a + \overline{\nu}_f$ (cm⁻¹)	ϵ
Albumina sérica bovina	1,3360	1,43	40211	-239,54

Analisando o valor da constante dielétrica obtida para a BSA de -239,54 observa-se que o valor não é possível de ocorrer. Esse resultado obtido pode estar ligado ao fato da BSA apresentar espectros de absorção com um deslocamento anômalo em comparação aos solventes (Figura 30), gerando dados para aplicação na equação que contribuem para resultados errôneos, ao contrário do que acontece para a fluorescência. Como pode ser observado, enquanto o máximo de fluorescência para o DANS em BSA situa-se em comprimento de onda condizente com ambientes hidrofóbicos (solventes apolares), o mesmo não se pode afirmar do máximo de absorbância, que foi mais deslocado do que o mais polar dos solventes utilizados (Figura 30).

Figura 30 - Espectros do efeito solvatocrômico do DANS. A) absorbância, B) fluorescência. DANS ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) nos solventes: dioxano, tolueno, acetato de heptila, acetato de hexila, clorofórmio, acetato de etila, THF, diclorometano, heptanol, acetona, acetonitrila, DMF, DMSO e BSA. $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.

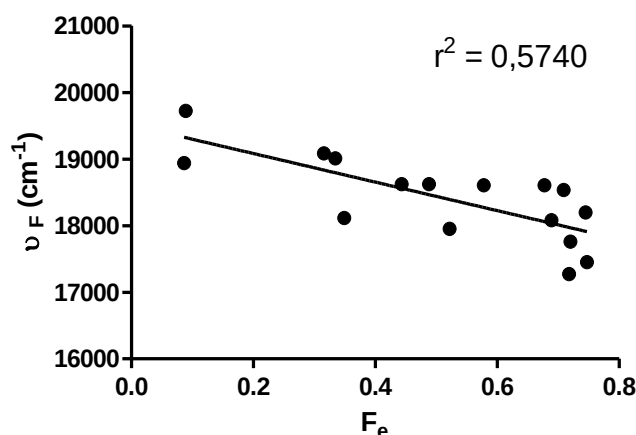


Como não foi possível obter a constante dielétrica da BSA a partir do modelo de Bilot-Kawski utilizando o DANS como sonda solvatocrômica, passamos a utilizar outro modelo matemático para os testes. O modelo escolhido foi o de McRae, por apresentar um $r^2 = 0,5740$, sendo assim, segundo melhor coeficiente de correlação linear dos modelos matemáticos testados (Figura 22), ficando atrás apenas do modelo de Bilot-Kawski, testado primeiramente. O modelo de McRae considera a sonda em uma cavidade esférica. A vantagem neste caso é o fato de que este modelo utiliza apenas a fluorescência, portanto, evitamos a anomalia observada na absorbância.

4.9.1.2 – Aplicação do modelo matemático McRae a partir dos resultados obtidos para os solventes

O gráfico da Figura 31 foi construído com base nos máximos do número de onda de emissão para cada solvente em solução com DANS (Tabela 11) e calculado o fator de polarizabilidade do modelo esférico (F_e) de McRae a partir da Equação 18.

Figura 31 - Modelo solvatocrômico de McRae dos solventes



Então, a partir do gráfico do modelo esférico de McRae para os solventes (Figura 31), a Equação 21 foi gerada a partir de uma regressão linear do mesmo.

$$\nu_F = -2144 \cdot F_e + 19510 \quad \text{Equação 21}$$

A Equação 21 foi validada da mesma forma que a Equação 20. Assim, o teste será feito com a mistura de solventes de acetonitrila + dioxano e metanol + tolueno, para que possamos observar se ela apresenta uma boa correlação utilizando valores desconhecidos.

4.9.1.2.1 – Utilização de dados da mistura acetonitrila + dioxano

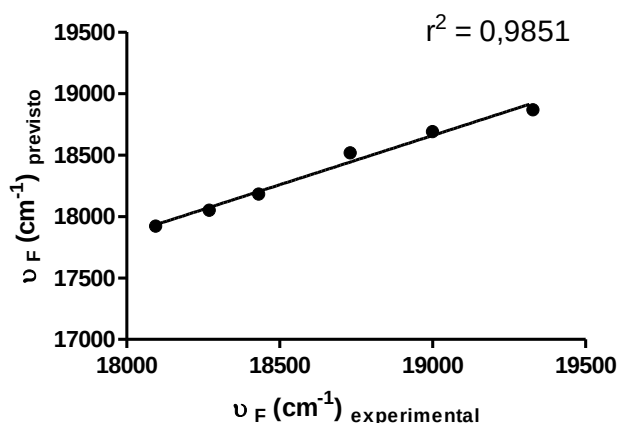
A mistura de acetonitrila + dioxano é a mesma utilizada no item 4.9.1.1.1, portanto, apresenta os mesmos espectros de absorção e emissão (Figura 24). A partir dos espectros são retirados os dados espectroscópicos que aparecem na Tabela 18, como $\overline{\nu_f}$ experimentais, n e ϵ .

Tabela 18 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes - acetonitrila + dioxano

Acetonitrila ($X_{\text{CH}_3\text{CN}}$)	n	ϵ reportado	F_e	$\bar{\nu}_f$ previsto (cm^{-1})	$\bar{\nu}_f$ experimental (cm^{-1})
0,000	1,422	2,21	0,085	19328,22	18867,92
0,078	1,418	3,35	0,238	18999,79	18691,59
0,153	1,415	4,88	0,364	18730,26	18518,53
0,288	1,408	8,03	0,503	18431,53	18181,82
0,410	1,400	11,27	0,579	18269,42	18050,54
0,619	1,385	18,01	0,660	18094,49	17921,15

Para obtenção do $\bar{\nu}_f$ previsto utilizou-se os valores calculados de F_e (Equação 18) e aplicou-se a Equação 21. Para verificação da correlação existente entre esses valores previstos e experimentais de $\bar{\nu}_f$, plotou o gráfico da Figura 32 que mostra um bom coeficiente de correlação linear.

Figura 32 - Comparação do número de onda máximo de fluorescência obtido experimentalmente e previsto - mistura acetonitrila + dioxano



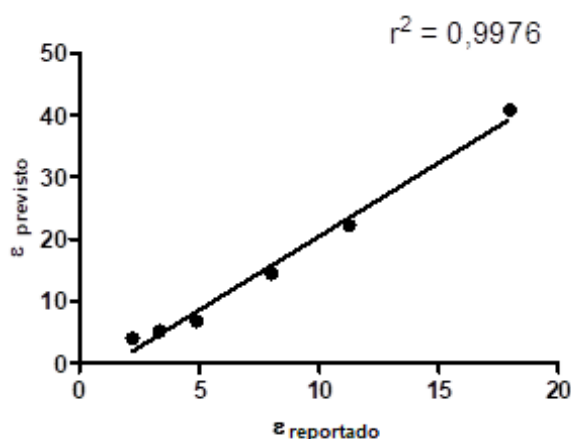
Dessa forma, a partir dos valores experimentais de $\bar{\nu}_f$ e aplicação da Equação 21 calculou-se os valores de F_e previstos. Com estes valores e utilizando a Equação 18 e medindo os índices de refração da mistura, obteve-se as constantes dielétricas previstas para as misturas de solventes, que foram comparadas as experimentais (Tabela 19).

Tabela 19 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes - acetonitrila + dioxano para o cálculo da constante dielétrica

Acetonitrila (X _{CH₃CN})	n	ϵ reportado	F _e previsto	$\bar{\nu}_f$ experimental (cm ⁻¹)	ϵ previsto
0,000	1,422	2,21	0,299	18867,92	4,008
0,078	1,418	3,35	0,382	18691,59	5,194
0,153	1,415	4,88	0,462	18518,53	6,823
0,288	1,408	8,03	0,619	18181,82	14,393
0,410	1,400	11,27	0,681	18050,54	22,193
0,619	1,385	18,01	0,741	17921,15	40,857

Com os valores de ϵ previstos foi gerado um gráfico (Figura 33) para comparação dos valores e verificação da eficácia desse método utilizando a equação de McRae para o cálculo de constantes dielétricas desconhecidas.

Figura 33 - Comparação dos valores previstos e tabelados pela literatura da constante dielétrica da mistura acetonitrila + dioxano



De acordo com o gráfico da Figura 33, o r^2 teve um valor satisfatório dentro do esperado para um coeficiente de correlação linear.

4.9.1.2.2 – Utilização de dados da mistura metanol + tolueno

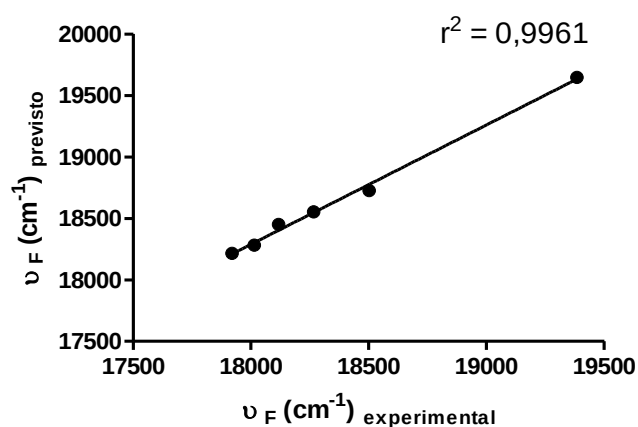
Para novamente testar se a equação apresenta uma correlação boa para estimativa de valores desconhecidos de constante dielétrica através desses métodos matemáticos, utilizou-se a mistura metanol + tolueno, de acordo com o item 4.9.1.1.2. Os espectros da mistura aparecem na Figura 27, a partir deles que a Tabela 20 é construída com os dados espectroscópicos da mistura.

Tabela 20 - Medidas espectroscópicas de DANS na mistura de solventes - metanol + tolueno

Metanol (X _{CH₃OH})	n	ϵ reportado	F _e	$\bar{\nu}_f$ previsto (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}_f$ experimental (cm ⁻¹)
0	1,4985	2,2	0,059	19383,74	19646,37
0,2	1,489	7,82	0,471	18501,19	18726,59
0,4	1,47	12,86	0,580	18266,53	18552,88
0,6	1,441	19,21	0,650	18117,15	18450,18
0,8	1,399	25,96	0,698	18013,64	18281,54
1	1,3305	31,89	0,742	17919,49	18214,94

Os valores obtidos para F_e são calculados a partir da Equação 18, enquanto que os valores calculados para $\bar{\nu}_f$ previsto foram obtidos pela Equação 21. O gráfico da Figura 34 é construído a fim de se determinar o r² dessa relação de $\bar{\nu}_f$ previsto e experimental.

Figura 34 - Comparação do número de onda máximo de fluorescência obtido experimentalmente e previsto – mistura metanol + tolueno



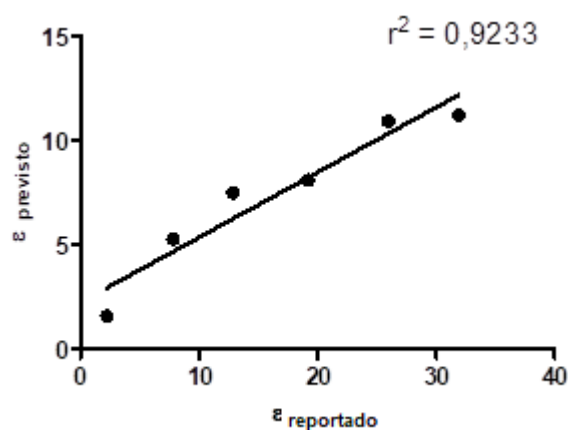
O coeficiente de correlação linear obtido apresenta um valor dentro do esperado, assim, aplica-se esse método matemático para a determinação da constante dielétrica prevista através desse método.

Tabela 21 - Comparação dos valores previstos e tabelados pela literatura da constante dielétrica da mistura metanol + tolueno

Metanol (X_{CH_3OH})	n	ϵ reportado	F_e previsto	$\bar{\nu}_f$ experimental (cm^{-1})	ϵ previsto
0	1,4985	2,2	-0,064	19646,37	1,584
0,2	1,489	7,82	0,365	18726,59	5,299
0,4	1,47	12,86	0,446	18552,88	7,494
0,6	1,441	19,21	0,494	18450,18	8,101
0,8	1,399	25,96	0,573	18281,54	10,931
1	1,3305	31,89	0,604	18214,94	11,216

Na Tabela 21, o valor previsto de F_e foi calculado a partir da Equação 21 e a Equação 18 no cálculo previsto da constante dielétrica dos solventes. Os valores obtidos para ϵ previsto e reportado, foram comparados graficamente novamente (Figura 35).

Figura 35 - Comparação dos valores previstos e tabelados pela literatura da constante dielétrica da mistura metanol + tolueno



Observando o r^2 obtido para o gráfico da Figura 35 vemos que a correlação entre os valores obtidos apresenta um erro baixo. A partir dos resultados obtidos, foi possível a utilização da equação geral dos solventes obtida através do modelo de McRae (Figura 31), para testes de previsibilidade de valores de constantes dielétricas.

4.9.1.2.3 – Aplicação da equação geral dos solventes – McRae para estimativa da ϵ da BSA

Dessa forma, diante dos resultados obtidos através da equação do modelo de McRae, foi utilizado o mesmo método para estimar o valor da constante dielétrica da BSA.

Utilizando a equação geral dos solventes (Equação 21), foi calculado F_e a partir do valor de $\bar{\nu}_f$ (obtido experimentalmente) e utilizado o modelo F_e – McRae (Equação 18) foi calculado ϵ , com os valores prévios de F_e e n (medido no refratômetro), o valor da constante dielétrica é apresentado na Tabela 17.

Tabela 22 - Medidas espectroscópicas da BSA no ambiente DANS para o cálculo da constante dielétrica

	n	F_e	$\bar{\nu}_f$ (cm^{-1})	ϵ
BSA	1,3360	0,573	18281	9,76

O valor estimado para a constante dielétrica no interior da proteína foi de 9,76.

4.9.1.3 – Relação matemática multiparamétrica – Kamlet-Taft

Os modelos matemáticos vistos no item 4.9.1 apresentam limitações, pois levam em consideração apenas fatores inespecíficos, como a polarizabilidade e dipolaridade relacionadas ao solvente (solvente-DANS), não relacionando os fatores específicos dessa interação como possíveis ligações de hidrogênio formadas entre solvente-soluto (Ghanadzadeh Gilani *et al.*, 2019; Kawski e Bojarski, 2011; McRae, 1957; Ramos e Techert, 2003).

Nesse contexto, se destaca o modelo matemático de Kamlet-Taft, que engloba parâmetros de interações inespecíficas e específicas entre solvente-soluto, através de uma equação linear multiparamétrica (Equação 22).

$$X = x_0 + a\alpha + b\beta + s\pi \quad \text{Equação 22}$$

Onde X refere-se a qualquer propriedade físico-química dependente de solvente (fluorescência ou absorbância nesse estudo), X_0 é a propriedade no vácuo, π é o fator de

polarizabilidade do solvente, α é o índice de acidez – a capacidade do solvente de realizar ligação de hidrogênio como doador de hidrogênio, β é um índice de basicidade – capacidade do solvente em realizar ligação de hidrogênio, comoceptor de hidrogênio. Os coeficientes s , a e b descrevem a sensibilidade de cada contribuição individual no processo (Lewkowicz *et al.*, 2019; Taft *et al.*, 1985)

Para realizar este estudo, uma mistura de solventes dioxano/água (Ghasemi e Mandoumi, 2008) foi utilizada, pois para a mesma os parâmetros α , β e π foram reportados (Tabela 23). Os espectros do DANS nestas misturas de solventes são mostrados na Figura 36, gerando os valores de $\bar{\nu}_f$ e $\bar{\nu}_a$ experimentais. Como esperado, observamos que o aumento de polaridade das misturas provocou deslocamentos batocrômicos tanto para a absorbância como para a fluorescência.

Figura 36 - Espectros de A) absorbância, B) fluorescência da mistura de dioxano + água. DANS ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.

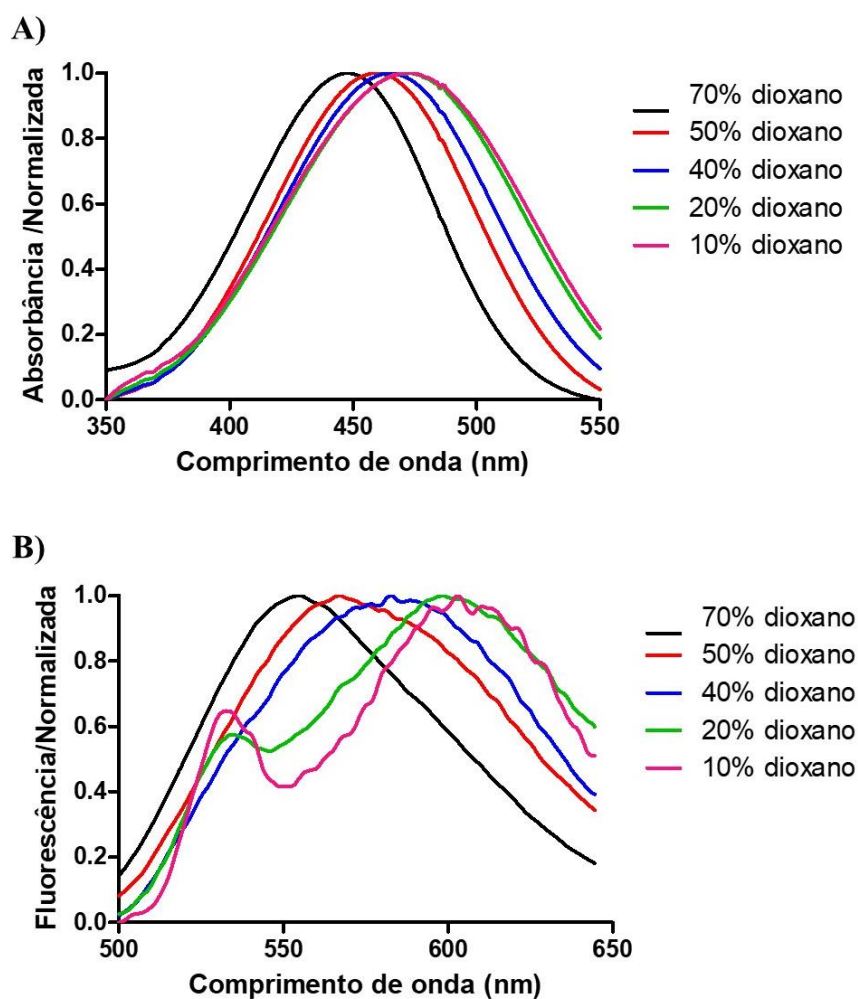


Tabela 23 - Parâmetros solvatocrômicos da mistura dioxano + água

(% dioxano)	α	β	π	$\bar{\nu}_f$ (cm ¹) experimental	$\bar{\nu}_a$ (cm ¹) experimental
100	0	0,37	0,55	18939,39	23584,91
70	0,35	0,40	0,67	18050,54	22371,36
50	0,58	0,42	0,79	17605,63	21739,13
40	0,70	0,43	0,85	17182,13	21505,38
20	0,94	0,45	0,97	16694,49	21141,65
10	1,05	0,46	1,03	16556,29	21231,42

Objetivando obter uma equação única que correlacione os parâmetros α , β e π das misturas de solventes com as propriedades espectroscópicas do DANS (Tabela 23), procedeu-se a regressão linear multiparamétrica, onde os valores de máximos de absorvância e fluorescência (Figura 36) são propostos como resultantes da contribuições dos parâmetros α , β e π dos solventes. Utilizou-se o software Excell para resolução da regressão linear multiparamétrica e obteve-se as Equação 23 e Equação 24. O esquema abaixo, tanto para absorvância como para a fluorescência, exemplifica como o método da regressão linear multiparamétrica procede no software.

Fluorescência

$$\left[\begin{array}{l} 18939,39 = x_0 + a.0,00 + b.0,37 + s.0,55 \\ 18050,54 = x_0 + a.0,35 + b.0,40 + s.0,67 \\ 17605,63 = x_0 + a.0,58 + b.0,42 + s.0,79 \\ 17182,13 = x_0 + a.0,70 + b.0,43 + s.0,85 \\ 16694,49 = x_0 + a.0,94 + b.0,45 + s.0,97 \\ 16556,29 = x_0 + a.1,05 + b.0,46 + s.1,03 \end{array} \right]$$

$$\bar{\nu}_f = (14840,9) - (6375,0) \alpha + (0) \beta + (8120,8) \pi \quad \text{Equação 23}$$

Absorbância

$$\begin{bmatrix} 23584,91 = x_0 + a.0,00 + b.0,37 + s.0,55 \\ 22371,36 = x_0 + a.0,35 + b.0,40 + s.0,67 \\ 21739,13 = x_0 + a.0,58 + b.0,42 + s.0,79 \\ 21505,38 = x_0 + a.0,70 + b.0,43 + s.0,85 \\ 21141,65 = x_0 + a.0,94 + b.0,45 + s.0,97 \\ 21231,42 = x_0 + a.1,05 + b.0,46 + s.1,03 \end{bmatrix}$$

$$\overline{\nu_a} = -(1735380,8) - (415312,8) \alpha + (4723857,3) \beta + (20251,8) \pi \quad \text{Equação 24}$$

Essas equações foram submetidas à validação com os dados espectroscópicos de uma mistura de etanol + água. O objetivo foi tentar prever $\overline{\nu_f}$ e $\overline{\nu_a}$ a partir de valores conhecidos de α , β e π .

4.9.1.3.1 – Utilização de dados da mistura etanol + água

Para isso, dados espectroscópicos da mistura etanol+água foram obtidos experimentalmente (Figura 37) e comparados com aqueles previstos usando as Equações 23 e 24, aplicando os valores de α , β e π para cada fração da mistura de etanol + água como reportado (Tabela 24) (Habibi-Yangjeh, 2004).

A Figura 38 mostra a correlação entre os valores $\overline{\nu_f}$ e $\overline{\nu_a}$ obtidos experimentalmente para a mistura etanol+água e os valores previstos aplicando as Equações 23 e 24. Ao observar os coeficientes de correlação linear obtidos nos gráficos (Figura 38), vemos que os valores são medianos e apresentam um erro considerável. O que inviabilizou o uso das equações 23 e 24 para prever os parâmetros de α , β e π de solventes ou misturas de solventes desconhecidos.

Figura 37 - Espectros de A) absorvância, B) fluorescência da mistura de etanol + água. DANS ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$.

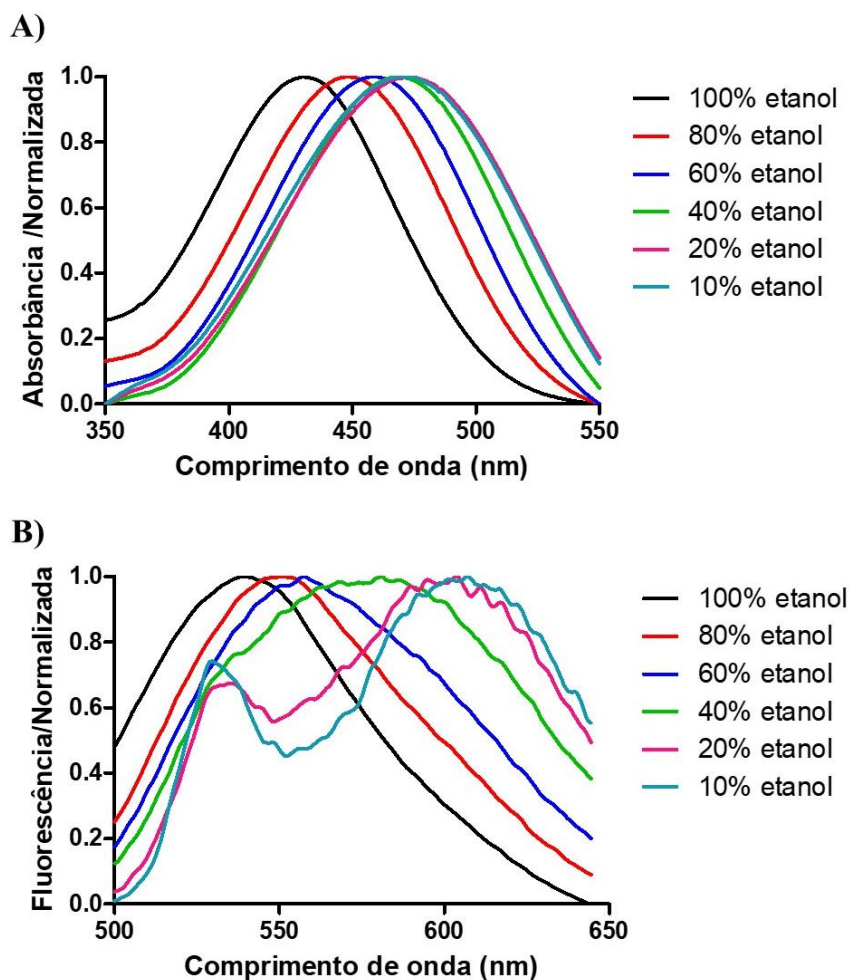
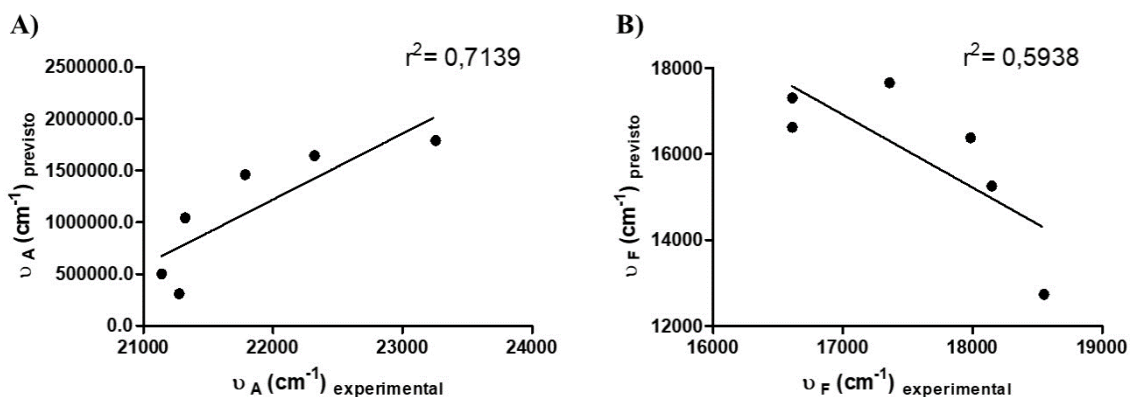


Tabela 24 - Parâmetros solvatocrômicos da mistura etanol + água

(% etanol)	α^*	β^*	π^*	$\bar{\nu}_f (\text{cm}^{-1})$ experimental	$\bar{\nu}_f (\text{cm}^{-1})$ previsto	$\bar{\nu}_a (\text{cm}^{-1})$ experimental	$\bar{\nu}_a (\text{cm}^{-1})$ previsto
100	0,98	0,83	0,51	18552,88	12735,01	23255,81	1788742,63
80	0,89	0,79	0,75	18148,82	15257,75	22321,43	1642026,93
60	0,88	0,75	0,88	17985,61	16377,20	21786,49	1459858,50
40	0,87	0,66	1,03	17361,11	17659,07	21321,96	1041902,24
20	1,04	0,56	1,12	16611,30	17306,20	21141,65	500735,99
10	1,16	0,53	1,13	16611,30	16622,40	21276,60	309385,26

*Valores reportados, (Habibi-Yangjeh, 2004).

Figura 38 – DANS como sonda solvatocrômica e sua aplicação no modelo Kamlet-Taft para previsão de máximos de absorvância e fluorescência em mistura de solventes. Eixo x representa os máximos de absorvância e fluorescência experimentais obtidos em misturas etanol/água. Eixo y representa os valores previstos obtidos pela aplicação das Equações 23 e 24.



4.9.1.3.2 – Modelo solvatocrômico Kamlet-Taft – correlacionando α , β e π isoladamente

Visando avançar na aplicação do DANS como sonda solvatocrômica, o próximo passo foi correlacionar separadamente os valores dos parâmetros α , β e π com os máximos de absorvância e fluorescência do DANS (Figura 39 e Figura 40). Para isso, utilizou-se os valores reportados de α , β , π , e os experimentais $\bar{\nu}_f$ e $\bar{\nu}_a$, para a mistura de dioxano + água (Tabela 23).

Figura 39 - Relação de $\bar{\nu}_a$ versus α , β e π para a mistura dioxano + água

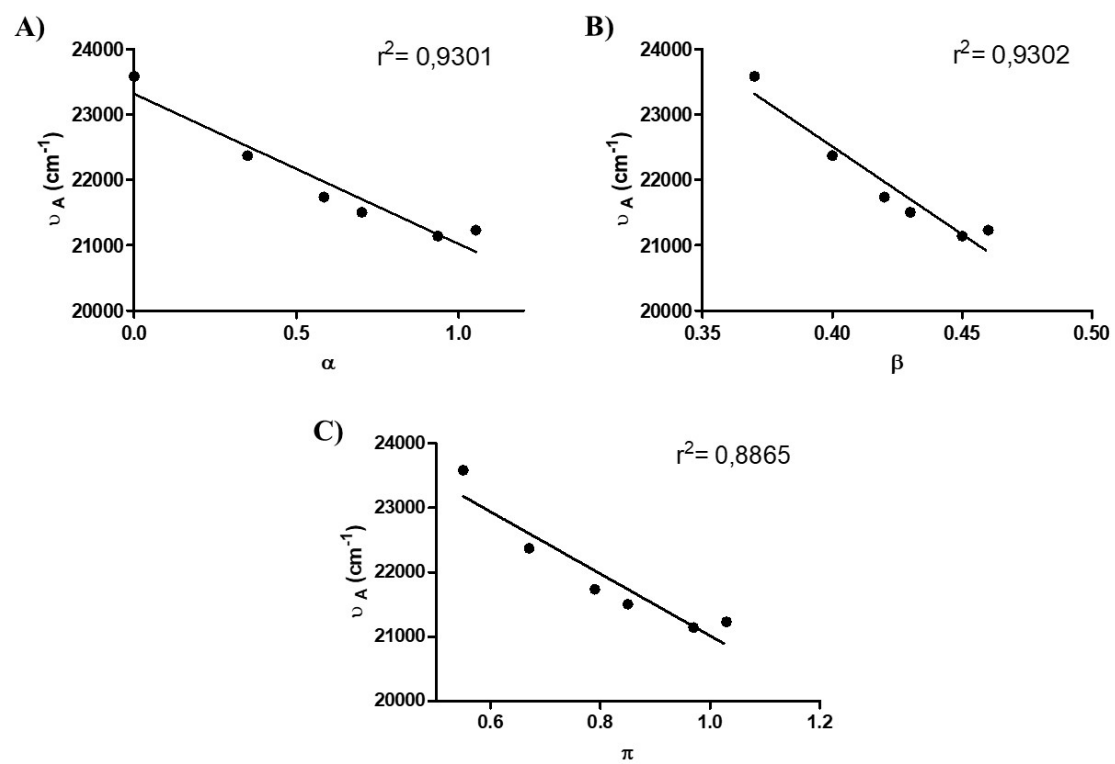
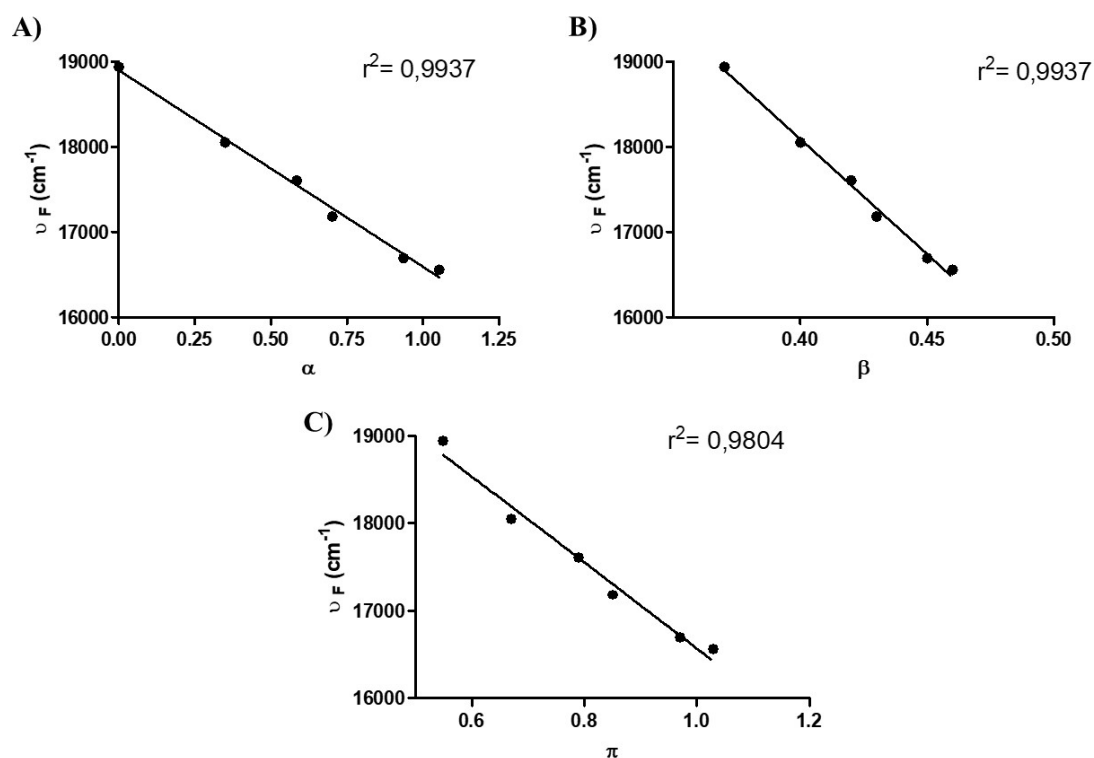


Figura 40 - Relação de $\bar{\nu}_f$ versus α , β e π para a mistura dioxano + água

Cada curva nas Figura 39 e Figura 40 foram tratadas para obtenção das equações de reta que correlacionam individualmente α , β , π e os valores de $\bar{\nu}_f$ e $\bar{\nu}_a$ (Tabela 25 e Tabela 26).

Tabela 25 - Equações de reta da relação de fluorescência e α , β , π

	Dioxano + água (r^2)	Equação da reta
α	0,9937	$\bar{\nu}_f = -2308 \alpha + 18900$
β	0,9937	$\bar{\nu}_f = -27010 \beta + 28900$
π	0,9804	$\bar{\nu}_f = -4918 \pi + 21490$

Tabela 26 - Equações da reta da relação de absorvância e α , β , π

	Dioxano + água (r^2)	Equação da reta
α	0,9301	$\bar{\nu}_a = -2297 \alpha + 23320$
β	0,9302	$\bar{\nu}_a = -26880 \beta + 33260$
π	0,8865	$\bar{\nu}_a = -4810 \pi + 25830$

A partir dos dados da Tabela 24 que apresenta os parâmetros solvatocrômicos da mistura etanol + água, foi aplicado as equações das Tabela 25 e Tabela 26. Nessas equações utilizou os valores já experimentais de $\bar{\nu}_f$ (Tabela 24), e obtivemos os respectivos valores de α , β e π previstos a partir dessas equações. O mesmo acontece para as equações que envolvem a absorvância, a partir de $\bar{\nu}_a$ conhecidos (Tabela 24) calculamos valores estimados de α , β e π , com o objetivo de comparar os valores já reportados pela literatura (Tabela 24) com os obtidos através dessas equações. A Tabela 27 e 28 traz essas comparações.

Tabela 27 - Comparação dos valores de α , β e π reportados e previstos para a mistura etanol + água através das equações da mistura dioxano + água – absorvância

(% etanol)	$\bar{\nu}_a$ (cm ⁻¹)	α^*	α previsto	β^*	β previsto	π^*	π previsto
100	23255,8	0,98	0,03	0,83	0,37	0,51	0,54
80	22321,4	0,89	0,43	0,79	0,41	0,75	0,73
60	21786,5	0,88	0,67	0,75	0,43	0,88	0,84
40	21322	0,87	0,87	0,66	0,44	1,03	0,94
20	21141,6	1,04	0,95	0,56	0,45	1,12	0,97
10	21276,6	1,16	0,89	0,53	0,45	1,13	0,95

*Valores reportados, (Habibi-Yangjeh, 2004).

Tabela 28 – Comparação dos valores de α , β e π reportados e previstos para a mistura etanol + água através das equações da mistura dioxano + água – fluorescência

(% etanol)	$\bar{\nu}_f$ (cm ⁻¹)	α^*	α previsto	β^*	β previsto	π^*	π previsto
100	18552,88	0,98	0,15	0,83	0,38	0,51	0,60
80	18148,82	0,89	0,33	0,79	0,40	0,75	0,68
60	17985,61	0,88	0,40	0,75	0,40	0,88	0,71
40	17361,11	0,87	0,67	0,66	0,43	1,03	0,84
20	16611,30	1,04	0,99	0,56	0,45	1,12	0,99
10	16611,30	1,16	0,99	0,53	0,45	1,13	0,99

*Valores reportados, (Habibi-Yangjeh, 2004).

Esses mesmos resultados foram plotados em gráficos de modo a comparar os parâmetros α , β e π previstos pelas equações (Tabelas 25 e 26) e experimentais (Figura 41 e Figura 42, respectivamente).

Na Figura 41 é apresentado os valores de comparação de α , β e π previstos e reportados com dados da absorbância. O gráfico A apresenta um baixo valor de r^2 , mostrando que nosso modelo foi fraco para prever valores α . Já os r^2 obtidos para os gráficos B e C mostram uma melhor correlação, comprovados pelos valores apresentados na Tabela 27 em que os valores de β e π calculados pela equação não se distanciam tanto dos reportados.

Figura 41 - Comparação dos valores de α , β e π previstos e reportados – absorbância

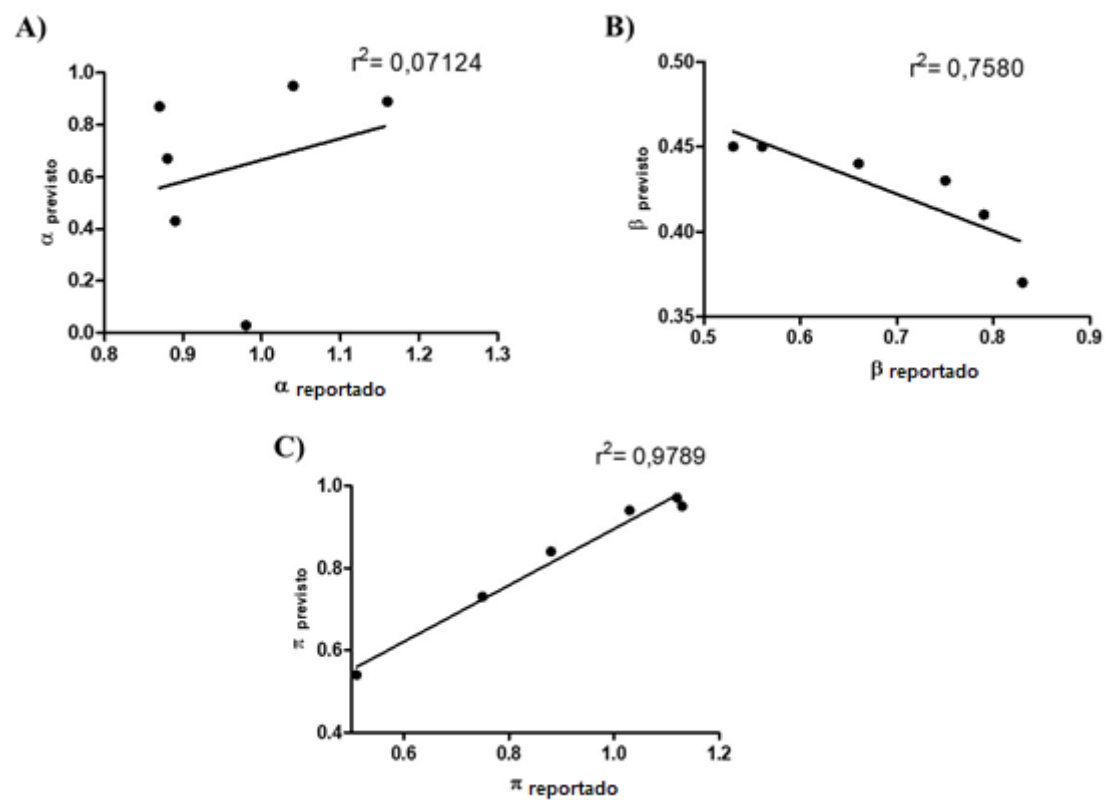
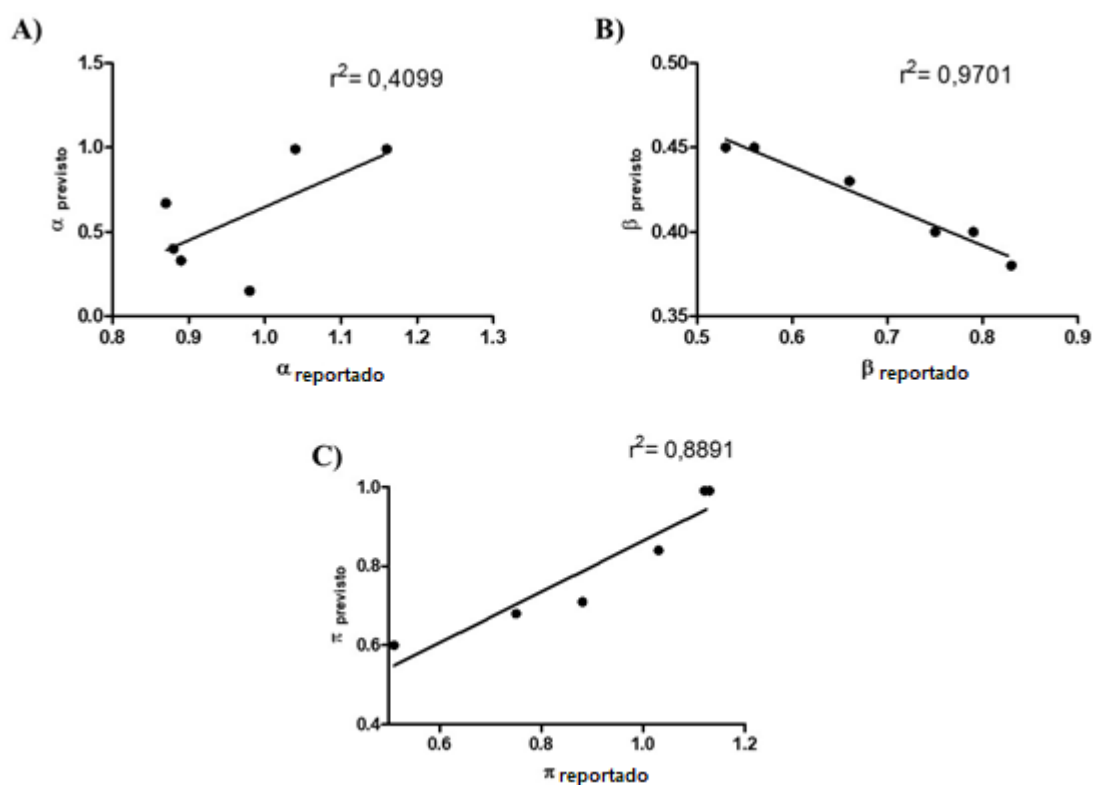


Figura 42 - Comparação dos valores de α , β e π reportados e previstos – fluorescência

O mesmo pode ser observado no gráfico A da Figura 42 baseada em medidas de fluorescência, onde uma baixa correlação foi obtida para o parâmetro α . Já para β e π os coeficientes de correlações foram maiores, mostram a maior capacidade do modelo em prever estes parâmetros solventes.

Baseado nestes resultados concluímos que as melhores correlações foram obtidas usando fluorescência e os parâmetros β e π dos solventes. Este resultado faz sentido, uma vez que o DANS poderia realizar ligações de hidrogênio comoceptor via seu grupo amino, ou seja, efeito relacionado ao parâmetro β . Da mesma forma, a boa correlação com o parâmetro π , que é não específico e relacionado a polarizabilidade dos solventes, ou seja, relacionado a constante dielétrica e índice de refração.

5 CONCLUSÕES

A partir dos estudos realizados, observamos que o DANS se liga à BSA, comprovado pelo aumento da intensidade de fluorescência, pela supressão de fluorescência da BSA pela adição de DANS e ainda pelos valores obtidos para as constantes de associação da sonda-proteína. Com o experimento de quenching em diferentes temperaturas, foi possível determinar o parâmetro termodinâmico de interação espontânea e força eletrostática.

Comparando os valores obtidos para as constantes de associação nos estudos de competição com fármacos, não foi possível identificar sítios preferenciais para ligação da sonda na proteína. Assim, conclui-se que o DANS pode-se ligar em todos os sítios estudados.

O composto fluorescente DANS apresenta propriedades solvatocrômicas comprovadas pelo efeito batocrômico da sonda em diferentes solventes. A partir das correlações entre os fatores de polarizabilidade dos solventes com as propriedades espectrais do DANS, foi possível gerar equações capazes de prever constantes dielétricas de misturas de solventes com razoável qualidade. A partir dessas equações, foi ainda possível estimar a constante dielétrica no interior da BSA.

A aplicação do modelo matemático de Kamlet-Taft, no qual engloba parâmetros de interações inespecíficas e específicas entre solvente-soluto através de uma equação linear multiparamétrica não resultou em resultados satisfatórios. Após separação das variáveis e suas correlações com os dados espectrais do DANS, conseguiu-se uma melhor correlação com os parâmetros β e π .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOUD, R.; CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Interaction of triterpenoids with human serum albumin: A review. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 260–270, 2017.
- BEHERA, S. *et al.* Study of interaction between bovine serum albumin and dolutegravir intermediate: Fluorescence and molecular docking analysis. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 13102–13110, 2021.
- BI, S. *et al.* Investigation of three flavonoids binding to bovine serum albumin using molecular fluorescence technique. **Journal of Luminescence**, v. 132, n. 1, p. 132–140, 2012.
- BOLATTIN, M. B. *et al.* Interaction between carisoprodol and bovine serum albumin and effect of β -cyclodextrin on binding: Insights from molecular docking and spectroscopic techniques. **RSC Advances**, v. 6, n. 68, p. 63463–63471, 2016.
- CHENG, X. X. *et al.* Probing the binding sites and the effect of berbamine on the structure of bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 72, n. 5, p. 922–928, 2009.
- DE, D.; KAUR, H.; DATTA, A. Unusual binding of a potential biomarker with human serum albumin. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 8, n. 4, p. 728–735, 2013.
- FARZTDINOV, V. M.; ERNSTING, N. P. Solvent dependence of structure and electronic properties in the ground and first excited singlet state of 4-dimethylamino-4'-nitrostilbene (DANS) - Semiempirical calculations. **Chemical Physics**, v. 277, n. 3, p. 257–270, 2002.
- FIELDING, L.; RUTHERFORD, S.; FLETCHER, D. Determination of protein-ligand binding affinity by NMR: Observations from serum albumin model systems. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 6, p. 463–470, 2005.
- GHANADZADEH GILANI, A. *et al.* Tautomerism, solvatochromism, preferential solvation, and density functional study of some heteroarylazo dyes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 273, p. 392–407, 2019.
- GHUMAN, J. *et al.* Structural basis of the drug-binding specificity of human serum

- albumin. **Journal of Molecular Biology**, v. 353, n. 1, p. 38–52, 2005.
- GIORDANO, L. *et al.* Highly solvatochromic 7-aryl-3-hydroxychromones. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 3, n. 8, p. 1011–1016, 2012.
- GRACIANI, F. S.; XIMENES, V. F. Investigation of Human Albumin-Induced Circular Dichroism in Dansylglycine. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.
- HABIBI-YANGJEH, A. A model for correlation of various solvatochromic parameters with composition in aqueous and organic binary solvent systems. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 25, n. 8, p. 1165–1170, 2004.
- HAQUE, N.; PRABHU, N. P. Insights into protein-TNS (2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate) interaction using molecular dynamics simulation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1068, n. 1, p. 261–269, 2014.
- HILDEBRAND, J. H.; BENESI, H. A. Interaction of iodine with aromatic hydrocarbons [15]. **Nature**, v. 164, n. 4179, p. 963, 1949.
- INGHAM, K. C. On the application of Job's method of continuous variation to the stoichiometry of protein-ligand complexes. **Analytical Biochemistry**, v. 68, n. 2, p. 660–663, 1975.
- KAWSKI, A.; BOJARSKI, P. Comments on the determination of excited state dipole moment of molecules using the method of solvatochromism. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 82, n. 1, p. 527–528, 2011.
- KOBAYASHI, T.; DEGENKOLB, E. O.; RENTZEPIS, P. M. Lifetime measurements of 4-dimethylamino-4'-nitrostilbene fluorescence by picosecond optical amplification. **Journal of Applied Physics**, v. 50, n. 5, p. 3118–3121, 1979.
- KRATZ, F.; ELSADEK, B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 429–445, 2012.
- KUMARI, M. *et al.* Spectroscopic and docking studies on the interaction between pyrrolidinium based ionic liquid and bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 124, p. 349–356, 2014.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. [s.l.: s.n.].
- LEWKOWICZ, A. *et al.* Solvent dependent spectroscopic properties of fingerprint

reagent - 1,8-Diazafluoren-9-one. **Journal of Molecular Liquids**, v. 285, p. 754–765, 2019.

LIU, B. M. *et al.* Spectroscopic study on flavonoid-drug interactions: Competitive binding for human serum albumin between three flavonoid compounds and ticagrelor, a new antiplatelet drug. **Journal of Luminescence**, v. 168, p. 69–76, 2015.

MALLICK, S.; PAL, K.; KONER, A. L. Probing microenvironment of micelle and albumin using diethyl 6-(dimethylamino)naphthalene-2,3-dicarboxylate: An electroneutral solvatochromic fluorescent probe. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 467, p. 81–89, 2016.

MATIADIS, D. *et al.* Synthesis and (fluoro)solvatochromism of two 3-styryl-2-pyrazoline derivatives bearing benzoic acid moiety: A spectral, crystallographic and computational study. **Journal of Molecular Liquids**, v. 331, p. 115737, 2021.

MCRAE, E. G. Theory of solvent effects on molecular electronic spectra. Frequency shifts. **Journal of Physical Chemistry**, v. 61, n. 5, p. 562–572, 1957.

MUNIZ-MIRANDA, F.; PEDONE, A.; MUNIZ-MIRANDA, M. Spectroscopic and DFT investigation on the photo-chemical properties of a push-pull chromophore: 4-Dimethylamino-4'-nitrostilbene. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 190, p. 33–39, 2018.

NAN, Z. *et al.* Interaction of graphene oxide with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 210, p. 348–354, 2019.

NANDI, A.; GHOSH, R.; PALIT, D. K. Excited state relaxation pathways of 4-dimethylamino- β -nitrostyrene: Effect of solvent polarity and donor-acceptor conjugation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 321, p. 171–179, 2016.

NI, Y.; SU, S.; KOKOT, S. Spectrofluorimetric studies on the binding of salicylic acid to bovine serum albumin using warfarin and ibuprofen as site markers with the aid of parallel factor analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 580, n. 2, p. 206–215, 2006.

OBERLÉ, J. *et al.* Study of the intramolecular charge-transfer (ICT) process in 4-dimethylamino-4'-nitrostilbene by picosecond time-resolved CARS. **Journal of**

Raman Spectroscopy, v. 31, n. 4, p. 311–317, 2000.

OLSON, R. E.; CHRIST, D. D. Chapter 33. Plasma Protein Binding of Drugs. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 31, n. C, p. 327–336, 1996.

PATEL, S.; KISHOR, K.; DATTA, A. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Competitive binding of Chlorin p 6 and Dansyl- L -Proline to Sudlow ' s site II of human serum albumin. v. 138, p. 925–931, 2015.

QURESHI, Mohd Aamir et al. Molecular interactions of esculin with bovine serum albumin and recognition of binding sites with spectroscopy and molecular docking. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, p. 1-15, 2022.

RAHMAN, M. M.; RAHMAN, M. H.; RAHMAN, N. N. Competitive binding of ibuprofen and naproxen to bovine serum albumin : modified form of drug-drug displacement interaction at the binding site. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 18, n. 1, p. 43–47, 2005.

RAMOS, A. S. F.; TECHERT, S. A directly linked pyrene-dimethylaniline derivative as a potential biochemical sensor for the microenvironmental dielectric properties of the active site of enzymes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 5, n. 23, p. 5176–5181, 2003.

SHAHID, M.; CHAWLA, H. M. Dansylated adenine as a molecular probe for exploring hydrophobic pocket of bovine serum albumin (BSA) and its utility for mercury ion recognition. **Journal of Luminescence**, v. 188, n. April, p. 460–464, 2017.

SHERMAN, J.; SHERMAN, J. Chapter One. **Walking on Air**, p. 3–23, 2014.

SINGH, I. R.; MITRA, S. Interaction of chlorpropamide with serum albumin: Effect on advanced glycated end (AGE) product fluorescence. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 206, p. 569–577, 2019.

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.

SUN, X. *et al.* Multispectral and molecular docking investigations on the interaction of primethamine/trimethoprim with BSA/HSA. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 38, n. 3, p. 934–942, 2020.

TAFT, R. W. *et al.* Linear solvation energy relations. **Journal of Solution Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 153–186, 1985.

THIPPERUDRAPPA, J. *et al.* Effect of solvents, solvent mixture and silver nanoparticles on photophysical properties of a ketocyanine dye. **Luminescence**, v. 32, n. 1, p. 51–61, 2017.

TRANSIENT, P.; SPECTRA, R.; SOLVENTS, P. 4-Dimethylamino-4'-nitrostilbene in. v. 26, n. March, p. 841–845, 1995.

VÁZQUEZ, M. E.; BLANCO, J. B.; IMPERIALI, B. Photophysics and biological applications of the environment-sensitive fluorophore 6-N,N-dimethylamino-2,3-naphthalimide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 4, p. 1300–1306, 2005.

WANG, B. L. *et al.* Multi-spectroscopic approaches and molecular simulation research of the intermolecular interaction between the angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACE inhibitor) benazepril and bovine serum albumin (BSA). **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 212, p. 15–24, 2019.

WANG, Q. *et al.* Binding interaction of atorvastatin with bovine serum albumin: Spectroscopic methods and molecular docking. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 156, p. 155–163, 2016.

WANI, T. A. *et al.* Molecular docking and experimental investigation of new indole derivative cyclooxygenase inhibitor to probe its binding mechanism with bovine serum albumin. **Bioorganic Chemistry**, v. 89, n. May, p. 103010, 2019.

WIELGUS, M.; BARTKOWIAK, W.; SAMOC, M. Two-photon solvatochromism. I. Solvent effects on two-photon absorption cross section of 4-dimethylamino-4'-nitrostilbene (DANS). **Chemical Physics Letters**, v. 554, p. 113–116, 2012.

ZHANG, H. X. *et al.* Studies on the interaction of tricyclazole with β -cyclodextrin and human serum albumin by spectroscopy. **Journal of Fluorescence**, v. 16, n. 3, p. 287–294, 2006.

ZHANG, K. *et al.* Rational design of coumarin fluorophore with solvatochromism, AIE and mechanofluorochromic enhancement properties. **Dyes and Pigments**, v. 185, n. PA, p. 108898, 2021.

ZÚÑIGA-NÚÑEZ, D. *et al.* Theoretical rationalisation of the photophysics of a TICT excited state of cinnamoyl-coumarin derivatives in homogeneous and biological membrane models. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 43, p. 27621–27629, 2018.