



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Bauru



Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

**Estudo da interação entre a Púrpura de Bromocresol e Albumina de Soro Bovino
através de Técnicas Experimentais e Simulações Computacionais**

Tainá Pereira dos Reis

Tainá Pereira dos Reis

Estudo da interação entre a Púrpura de Bromocresol e Albumina de Soro Bovino
através de Técnicas Experimentais e Simulações Computacionais

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, sob orientação do Prof. Dr.
Aguinaldo Robinson de Souza

Bauru

2021

Reis, Tainá Pereira dos.

Estudo da interação entre a Púrpura de Bromocresol
e a Albumina de Soro Bovino através de Técnicas
Experimentais e Simulações Computacionais / Tainá
Pereira dos Reis, 2021
69 f.:il

Orientador: Aguinaldo Robinson de Souza

Co-orientador: Valdecir Farias Ximenes

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de
Ciências de Bauru, 2021

1. Púrpura de Bromocresol. 2. Albumina de Soro
Bovino. 3. Espectroscopia de UV-Vis. 4. Simulação
Computacional I. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE TAINÁ PEREIRA DOS REIS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 25 dias do mês de agosto do ano de 2021, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de TAINÁ PEREIRA DOS REIS, intitulada **Estudo da Interação entre a Púrpura de Bromocresol e a Albumina do Soro Bovino através de Técnicas Experimentais e Simulações Computacionais**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Química, Faculdade de Ciências / UNESP - Câmpus de Bauru, Prof. Dr. NELSON HENRIQUE MORGON (Participação Virtual) do(a) Departamento de Físico Química - Instituto de Química / Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. DANIEL RINALDO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA

Agradecimentos

– Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado minha filha, Ana Luiza, sendo esta o principal incentivo ao meu crescimento pessoal e profissional e por todas as bênçãos que tem me concedido.

– Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Aguinaldo Robinson de Souza por todo seu suporte, a sua paciência, a sua disponibilidade e dedicação para realização dessa pesquisa de Mestrado. Me sinto muito feliz e grata pela oportunidade de tê-lo como meu orientador nesses últimos quatro anos.

– Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes, pelo apoio pessoal e profissional que sempre demonstrou ânimo para tirar dúvidas nos momentos necessários.

– Agradeço aos meus colegas de laboratório, em especial a Bruna Pastrello por todo suporte e disposição em ensinar a rotina de laboratório.

– Agradeço ao Prof. Dr. Nelson Henrique Morgon, do departamento de físico-química da UNICAMP, que contribuiu com os estudos teóricos e por todo suporte oferecido em minha pesquisa.

– Agradeço a minha mãe, Marina, pelo amor incondicional, suporte financeiro e toda sua dedicação em prol de minha formação acadêmica;

– Agradeço ao meu marido Roberto, por estar sempre ao meu lado, me apoiando, participando de toda minha evolução pessoal e profissional e por todo suporte oferecido para que eu pudesse realizar esse sonho.

– Agradeço aos meus familiares de Belém do Pará, por todo suporte, apoio e torcida para a realização de meus sonhos.

– Agradeço às minhas amigas de Belém Ana, Paula, em especial, a Victória pelos seus conselhos e auxílio em minhas dúvidas sobre a vida acadêmica.

– Agradeço a Andréa Domingues por todo seu suporte e participação de minha evolução profissional e pessoal durante esses anos de Mestrado.

– Agradeço à Capes pelo auxílio financeiro.

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

Resumo

As Albuminas séricas são as proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo. Essas proteínas auxiliam no transporte de drogas e elementos nutritivos pelo corpo humano e também são responsáveis pela disposição e eficácia de medicamentos. Embora existam diversos tipos de albuminas, as mais empregadas em pesquisas são a Albumina do Soro Humano (HSA) e a Albumina de Soro Bovino (BSA). Esta última é muito utilizada devido à sua semelhança estrutural com a HSA, fácil acessibilidade e baixo custo. A medida da concentração de HSA é de extrema importância para a prevenção de síndrome nefrótica e mortalidade em pacientes com patologias renais. Nesse contexto, se destaca o uso do corante Púrpura de Bromocresol (BCP) como teste rápido e seguro para medir os níveis plasmáticos de HSA. O BCP é um corante utilizado como indicador de pH e a alteração de seu espectro de absorção na região do ultravioleta e visível promovida pela BSA pode ser decorrente do fenômeno de solvatocromismo. Neste trabalho, o nosso objetivo foi estudar a interação entre o BCP e BSA via as constantes de associação obtidas por espectroscopia óptica e usar estes resultados em simulação computacional. As simulações computacionais foram baseadas em cálculos *ab initio*, através da metodologia da Teoria do Funcional da Densidade (DFT), para a obtenção da superfície de energia potencial com a variação dos ângulos diedros do BCP e pela Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT) para a determinação dos espectros de absorção e dos orbitais moleculares de maior energia ocupado e de menor energia desocupado. Para tais metodologias, foram utilizados os programas Gaussian16 e GaussView 5.0. Os resultados indicam que a ligação entre BCP e BSA é de caráter eletrostático, e que a partir dos experimentos de competição com fármacos não foi possível determinar um sítio preferencial de ligação do BCP no BSA. Por fim, os resultados experimentais e teóricos comprovaram a existência do solvatocromismo dos espectros de BCP em diferentes solventes.

Palavras chave: Púrpura de Bromocresol, Albumina de Soro Bovino, Espectroscopia de UV-Vis e Simulação Computacional.

Abstract

Serum albumin is the most abundant protein in blood plasma. These proteins assist in the transport of drugs and nutritional elements throughout the human body and are also responsible for the disposition and effectiveness of medicines. Although there are several types of albumin, the most used in research are Human Serum Albumin (HSA) and Bovine Serum Albumin (BSA). The latter is widely used due to its structural similarity to HSA, easy accessibility and low cost. The measurement of the HSA concentration is extremely important for the prevention of nephrotic syndrome and mortality in patients with renal pathologies. In this context, the use of Bromocresol Purple (BCP) dye as a fast and safe test to measure plasma levels of SAH stands out. BCP is a dye used as a pH indicator and the change in its UV-Vis absorption spectrum promoted by BSA may be due to the phenomenon of solvatochromism. In this work, our objective was to study the interaction between BCP and BSA via the association constants obtained by optical spectroscopy and to use these results in computer simulation. The computer simulations were based on ab initio calculations, using the Density Functional Theory (DFT) methodology, to obtain the potential energy surface with the variation of the BCP dihedral angles and by the Time Dependent Density Functional Theory (TD-DFT) for the determination of the absorption spectra of the absorption spectra and the molecular orbitals with the highest occupied energy (HOMO) and the lowest unoccupied energy (LUMO). For such methodologies, the Gaussian16 and GaussView 5.0 programs were used. The results indicate that the connection between BCP and BSA is electrostatic, and that from the competition experiments with drugs it was not possible to determine a preferred BCP binding site in the BSA. Finally, the experimental and theoretical results proved the existence of the solvatochromism of the BCP spectra in different solvents.

Key Words: Bromocresol Purpura, Bovine Serum Albumin, constant of association and solvatochromism.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Representação esquemática da barreira capilar glomerular.	16
Figura 2 – Estrutura Tridimensional da BSA	19
Figura 3 – Representação esquemática do efeito do solvente sobre as transições eletrônicas de solutos em solventes polares.	22
Figura 4 – Estrutura do BCP em solução aquosa entre as duas formas: protonada (pH < 6,0) e não protonada (pH > 6,0).	23
Figura 5 – Espectros de absorção do BCP sem e com a presença de BSA.	24
Figura 6 – Conexão entre experimento, teoria e simulação computacional.	25
Figura 7 – Espectro de absorbância visível de BCP na ausência e presença de BSA. BCP 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; BSA 0-72 $\mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{abs} = 500\text{-}650\text{ nm}$ a 25 °C.	34
Figura 8 – Espectro de diferença entre o BCP e os espectro de BCP com adições de BSA. BCP 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; BSA 0-72 $\mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{abs} = 500\text{-}650\text{ nm}$ a 25 °C.	34
Figura 9 – Dependência do parâmetro α com a concentração de BSA e ajuste polinomial para a determinação do K_d	35
Figura 10 – Espectro de absorção Visível do BCP com a adição de BSA em diferentes temperaturas.	36
Figura 11 – Espectros da interação entre BCP e fármacos com o aumento da BSA.	38
Figura 12 – Médias e Desvio padrão das constantes de ligação (K_a) dos complexos com BCP + BSA na ausência e presença de fármacos competidores pelo sítio de ligação da BSA.	40
Figura 13 – Curvas de calibração do complexo BCP-BSA, na ausência e presença de fármacos	41
Figura 14 – Box-plot dos valores de absorbância medidos nas diferentes concentrações de BSA nos complexos estudados.	41
Figura 15 – Espectro de absorção do complexo BCP + 3-IAA + BSA.	43
Figura 16 – Espectro de absorção UV-Vis do BCP e do complexo BCP-BSA em diferentes valores de pHs.	44
Figura 17 – Espectros de absorção UV-vis do BCP em diferentes solventes.	45
Figura 18 – Conformações de menor energia da forma protonada e desprotonada de BCP.	47
Figura 19 – Espectros teóricos de BCP em diferentes solventes (q=0.)	48
Figura 20 – Espectros teóricos de BCP em diferentes solventes (q=-1)	49
Figura 21 – Espectros teóricos de BCP em diferentes solventes (q=-2)	49
Figura 22 – Espectros experimental e teórico de BCP no solvente Água (q = -2)	50
Figura 23 – Espectros experimental e teórico de BCP no solvente DMF (q = -2)	51

Figura 24 – Visualização da interação entre HSA e a dansil-L-Asparagina no programa Rasmol. (Código PDB: 2xvu).	57
Figura 25 – Complexo de HSA com o aminiácido dansil-L-asparagina (2xvu). O complexo a cima contém cerca de 8083 átomos.	58
Figura 26 – Complexo de HSA com o aminiácido dansil-L-asparagina (2xvu). (a) Valência incompleta e (b) Valência completa após a adição de hidrogênio.	59
Figura 27 – Fluxograma para a automatização do processo de obtenção das coordenadas dos ligantes da HSA no programa PYTHON.	59
Figura 28 – Algoritmos no programa Python para a seleção da cadeia de interesse (Código PDB: 2xvu)	60
Figura 29 – Seleção do ligante, identificação de quais sítios o ligante se liga na HSA e seleção no sítio de interesse (Código PDB: 2xvu)	61
Figura 30 – Identificação das coordenadas de Dansil-L- asparagina que interagem com dois sítios de ligação da HSA.	61
Figura 31 – coordenadas com átomos e coordenadas atômicas da Dansil-L- asparagina em um dos sítios da HSA.	62

Lista de tabelas

Tabela 1 – Determinação das constantes de associação (K_a) em diferentes temperaturas (kelvin).	37
Tabela 2 – Valores médios dos parâmetros termodinâmicos	37
Tabela 3 – Valores médios da constante de afinidade (K_a) obtida no experimento de competição com fármacos. BCP ($12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), fármaco ($12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão PBS no pH 7,4.	39
Tabela 4 – Solventes utilizados nesse estudo classificados em próticos e apróticos. .	45
Tabela 5 – Valores de constante dielétrica (ϵ), do comprimento de onda máximo (λ_{max}) e seus respectivos valores de absorbância (Abs_{max}) correspondente ao BCP em diferentes solventes e BCP ligado à BSA no solvente PBS.	46
Tabela 6 – Distância entre ângulos, entre as ligações e ângulos diedros das duas estruturas de BCP	48
Tabela 7 – Valores experimentais e teóricos da constante dielétrica (ϵ), comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}) e seu respectivo valor de absorbância (Abs_{max}) dos espectros normalizados de BCP com carga $q = -2$ em diferentes solventes.	50
Tabela A.8–Siglas, símbolo do ligante e número de sítios identificados nos complexos da HSA com fármacos e amino-ácidos do site PDB.	58
Tabela A.9–Símbolos dos átomos e coordenadas da molécula de dansil-L-asparagina no sítio 1.	62

Lista de abreviaturas e siglas

HSA	Human Serum Albumin
BSA	Bovine Serum Albumin
BCP	Púrpura de Bromocresol
BCG	Verde de Bromocresol
IRC	Insuficiência Renal crônica
SN	Síndrome Nefrótica
SM	Simulação Computacional
VAR	Varfarina
IBU	Ibuprofeno
DIG	Digitoxina
WID	Mistura com fármacos Varfarina, Ibuprofeno e Digitoxina
DFT	Teoria do funcional da Densidade
TD-DFT	Teoria funcional da densidade dependente do tempo

Sumário

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	Síndrome Nefrótica	16
2.2	Albumina de Soro Bovino	17
2.2.1	Ligação de Drogas à Albumina: Utilização de Métodos Espectroscópicos para Determinação da Interação	21
2.2.2	Lei de Lambert - Beer	21
2.3	Solvatocromismo	22
2.3.1	O corante Púrpura de Bromocresol	23
2.4	Metodologias experimentais e teóricas do ponto de vista da Simulação Computacional	24
3	OBJETIVOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Materiais	28
4.1.1	Reagentes	28
4.1.2	Equipamentos	28
4.1.3	Preparo das soluções	28
4.1.4	Solução fisiológica salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS) no pH = 7,4	29
4.1.5	Albumina sérica bovina (BSA) 0,001 mol L ⁻¹	29
4.1.6	Púrpura de Bromocresol (BCP) 0,01 mol L ⁻¹	29
4.1.7	Acido acético-3-indol (3-IAA) 0,001 mol L ⁻¹	29
4.1.8	Varfarina 0,001 mol L ⁻¹	29
4.1.9	Ibuprofeno 0,001 mol L ⁻¹	29
4.1.10	Digitoxina 0,001 mol L ⁻¹	30
4.2	Estudo da interação entre BCP e BSA	30
4.2.1	Determinação do espectro UV-Vis do BCP a partir da adição de BSA e determinação da constante de associação (K_a)	30
4.2.2	Ensaios de espectro de UV-Vis em diferentes temperaturas e determinação de parâmetros termodinâmicos	30
4.2.3	Ensaios de competição entre fármacos e espectros de UV-Vis da interação entre BCP e BSA para o estudo de preferência por sítios de ligação	31

4.2.4	Obtenção da curva de calibração para o estudo da interação entre BCP com a adição de fármacos e BSA através de espectroscopia UV-Vis	31
4.2.5	Espectros de absorção UV-Vis da interação entre BCP e composto urêmico 3-IAA a partir do aumento de concentração de BSA	31
4.2.6	Estudo do pH no corante BCP	32
4.2.7	Estudo de solvatocromismo: Solventes	32
4.3	Metodologia Computacional	32
4.3.1	Construção da molécula BCP e cálculos da superfície de energia potencial	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1	Interação entre BCP e BSA	33
5.2	Estudo dos espectros de absorbância na região do UV-Vis da interação BCP-BSA e determinação da constante de associação.	33
5.3	Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos	35
5.4	Estudo dos sítios de ligação na BSA pelo ligante BCP	37
5.5	Curvas de Calibração do BCP	40
5.6	Estudo do complexo BCP-BSA na presença do composto urêmico 3-IAA e determinação da constante de associação	42
5.7	Estudo do efeito do pH no corante BCP e na interação entre BCP e BSA	43
5.8	Estudos solvatocrômicos do corante Púrpura de Bromocresol (BCP)	44
5.9	Estudos Teóricos da conformação do BCP e de seus espectros de absorbância em diversos solventes	47
5.9.1	Otimização ab initio da molécula de BCP via DFT	47
5.9.2	Estudo teórico do espectro de absorbância do BCP em diferentes solventes	48
6	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	53
A	APÊNDICE	57
A.1	Automatização do processo de obtenção de coordenadas atômicas no processo de construção de modelos exatos para pré-cálculos de Simulação Computacional	57
A.2	Algoritmos	62

1 Introdução

O corante púrpura de bromocresol (*Bromocresol Purple*, BCP) é um indicador de pH que apresenta características solvatocrômicas e é empregado na clínica médica para avaliação quantitativa da concentração plasmática da proteína albumina sérica humana (*human serum albumin*, HSA). Esta proteína é a mais abundante no plasma sanguíneo e controla várias moléculas e átomos na corrente sanguínea, bem como na manutenção da pressão osmótica do plasma e transporte de substâncias farmacológicas (SUGIO et al., 1999).

A HSA apresenta-se como um monômero com três domínios homólogos na forma de alfa-hélice (I-III) e está envolvida em vários processos complexos como a absorção, a distribuição e a eliminação de fármacos e toxinas (SOUZA et al., 2019). Cada um dos três domínios está subdividido em dois subdomínios A e B. Essa proteína também é conhecida por apresentar três domínios globulares, sendo eles divididos em dois subdomínios os quais são denominados de subdomínios IA, IIA, IB, IIB, IIIA e IIIB (PETERS, 1996). Os principais sítios de ligação para fármacos, referidos como sítio I e sítio II estão localizados nas cavidades hidrofóbicas dos subdomínios IIA e IIIA, respectivamente (PESCITELLI; BARI; BEROVA, 2011).

Em níveis normais, a concentração sérica de HSA em um adulto é $42,0 \pm 3,5$ g/L (PETERS, 1996). Na clínica médica, os valores de concentração superiores a 55 g/L são indicativos de hiperalbuminemia associada a desidratação, enquanto que os níveis de concentração abaixo de 20 g/L está correlacionado à hipoalbuminemia, que podem ser originadas de doenças renais, hepáticas, diabetes e outras (JR, 1995). Nesses pacientes com doenças agudas e crônicas, a concentração de albumina plasmática é inversamente proporcional ao risco de morte. Estudos estimam um aumento do risco de morte entre 24% e 56%, a cada decréscimo de 2,5 g/dL na albuminemia (RUBIN et al., 1997).

Dentre as doenças crônicas já mencionadas, os níveis de concentração sérica e plasmática de HSA necessitam ser regularmente medidos em pacientes com a patologia de Insuficiência Renal Crônica (IRC), uma vez que esses pacientes podem desenvolver quadros de síndrome nefrótica (SN), o que pode ocasionar alguns fatores de risco, bem como a retenção de líquidos, síndrome urêmica e hipertensão. A SN consiste na perda de proteínas na urina devido ao aumento na permeabilidade glomerular e a quebra de sua barreira estrutural e funcional, o que permite o extravasamento de proteínas para o filtrado glomerular, podendo ocasionar a um estado clássico de proteinúria, hipoalbuminemia, uremia, dislipidemia e edema (MORALES; VERONESE; WEBER, 2000).

Além disso, a hipotensão arterial, a síncope e lesão renal aguda também são fatores decorrentes da SN, principalmente em situações de hipovolemia, muitas vezes agravada pelo uso de diuréticos no tratamento de edemas (MORALES; VERONESE; WEBER,

2000). Os pacientes nefróticos também são mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções que podem aumentar a perda da HSA pela urina e no plasma sanguíneo.

Nesse contexto, os métodos iniciais utilizados para medir a albumina incluíam técnicas de fracionamento e o teor de triptofano das globulinas. Estes métodos eram de realização insustentável e não possuíam uma especificidade elevada. Duas técnicas imunoquímicas são consideradas como métodos de referência, mas são dispendiosas e morosas. As técnicas de ligação por corante são os métodos mais frequentemente utilizados para medir a albumina. O verde de bromocresol (BCG) é o método de ligação por corante mais frequentemente utilizado, mas pode subestimar a concentração de albumina, especialmente no limite inferior do intervalo normal. O BCP é, portanto, o corante mais específico utilizado na clínica médica (PINNELL; NORTHAM, 1978).

A ligação entre o BCP e a HSA promove um desvio na banda de máxima absorção dos espectros visível do corante BCP, permitindo que a cor resultante possa ser medida colorimetricamente em presença da proteína. A alta afinidade de ligação da albumina permite que estas participem da reação (BARTHOLOMEW; DELANY, 1966). Essa proteína pode se ligar à uma grande variedade de ânions orgânicos e moléculas complexas de corantes. O sistema de medição se baseia no desvio do pico de absorção máxima do corante BCP quando este se liga à albumina, variando o pico entre 500 a 650 nm, e sendo proporcional à quantidade de albumina na amostra até a concentração de 6,0 g/dL (PETERS, 1996).

Esse deslocamento da absorção máxima do BCP com o aumento de concentração de albumina pode ser decorrente do fenômeno de solvatocromismo. Esta denominação é utilizado para descrever as mudanças na posição e algumas vezes na intensidade de uma banda de absorção nos espectros de UV-Vis acompanhada de uma mudança na polaridade do meio (MACHADO et al., 1997).

A partir disso, na presente dissertação, a Albumina de Soro Bovina (*Bovine Serum Albumin*, BSA) será utilizada como modelo no estudos de ligação proteína-ligante devido à sua abundância, baixo custo e principalmente à sua homologia estrutural com a albumina sérica humana (KUMARI et al., 2014). Dentro desse contexto, destacamos a relevância do estudo da interação entre a proteína BSA e o corante BCP do ponto de vista experimental e de simulação computacional para elucidação do comportamento de ligação desse complexo.

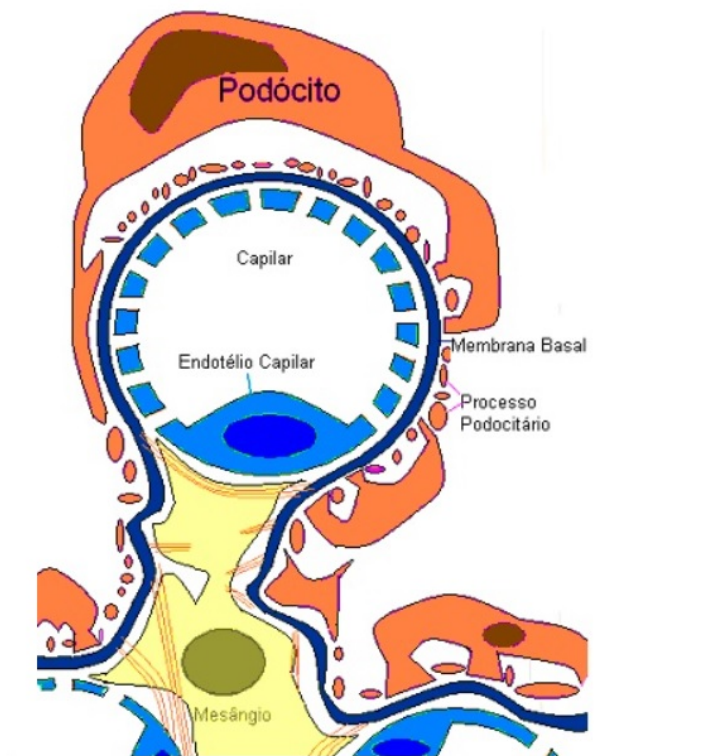
2 Fundamentação Teórica

2.1 Síndrome Nefrótica

A síndrome nefrótica é caracterizada pela presença de proteinúria maciça (presença de proteínas, bem como a albumina, na urina), edema, hipoproteinemia e dislipidemia (PAGNOUX et al., 2008). A síndrome nefrótica pode ocorrer em função de doença sistêmica ou pode ser a manifestação de doença primária renal. Sua ocorrência traduz a presença de glomerulopatia, uma vez que a presença de proteinúria nefrótica é praticamente patognomônica de doença glomerular (raramente doenças túbulo-intersticiais podem cursar com proteinúria de maior monta) (RODRIGUES; TITAN; WORONIK, 2012).

A barreira de filtração glomerular é composta pela célula endotelial do capilar glomerular (a célula que entra em contato direto com o sangue a ser filtrado), pela membrana basal do capilar, pelo podócito (célula epitelial visceral) e suas pedicelas e, mais externamente, pela célula mesangial (RODRIGUES; TITAN; WORONIK, 2012). A Figura 1 apresenta a representação da barreira capilar glomerular.

Figura 1 – Representação esquemática da barreira capilar glomerular.



Fonte: Copiado de (RODRIGUES; TITAN; WORONIK, 2012)

A excreção de proteínas pela urina leva a um aumento na síntese de proteínas pelo fígado na tentativa de compensar a perda. No entanto a compensação não acontece, resultando em hipoalbuminemia em quase todos os casos. Dessa forma, há um aumento importante na produção de proteínas ligadoras de colesterol e dislipidemia (aumento significativo de LDL, VLDL e lipoproteína a, com redução de HDL, que é filtrado e perdido pela urina) (PAGNOUX et al., 2008).

A hipoalbuminemia leva à redução da pressão oncótica dentro dos vasos, permitindo o extravasamento de fluido e retenção de líquido no espaço extravascular, com edema como sua manifestação clínica. Há ainda uma situação de maior retenção de sódio devido ao distúrbio primário renal, com consequente retenção de água e agravamento do edema. Estes mecanismos de formação do edema na síndrome nefrótica também são conhecidos como as teorias do *underfill* (a hipoalbuminemia como fator primário causador de edema) e de *overflow* (a retenção de sódio e água como mecanismos primários). Em geral, tais mecanismos coexistem, com a predominância de um ou outro a depender da doença em questão (PAGNOUX et al., 2008)

Apesar de a albumina ser a principal proteína excretada em quadros nefróticos, também há perda variável de diversas outras proteínas, como imunoglobulinas, complemento, fatores inibidores da coagulação (proteína C, proteína S, antitrombina III), eritropoietina, PTH, proteína ligadora de vitamina D, proteínas carreadoras de metais como ferro, zinco e cobre etc. A perda dessas proteínas está envolvida na gênese de outras complicações do quadro nefrótico, como suscetibilidade a infecções, trombofilia, anemia, desnutrição e, possivelmente, doença óssea. Em pacientes hipertensos, obesos e diabéticos, é sempre importante avaliar a presença de lesão em outros órgãos-alvo (p.ex., se há retinopatia coexistente) (RODRIGUES; TITAN; WORONIK, 2012).

2.2 Albumina de Soro Bovino

A albumina de Soro Bovino é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, contabilizando um total de 50% das proteínas totais do soro bovino (HIRAYAMA et al., 1990). Essa proteína desempenha diversas funções no organismo, como o controle da pressão osmótica, o aumento da solubilidade de diversos íons metálicos, a manutenção do volume plasmático circulante, entre outras (JR, 1995). Uma das principais funções da BSA consiste no transporte de diversos compostos endógenos e exógenos para diferentes tecidos e sua alta capacidade de ligação com moléculas, hormônios, corantes e fármacos (BOLATTIN et al., 2016).

Essa proteína apresenta concentração de cerca de 35-50 mg/mL e sua síntese ocorre no fígado. A concentração de BSA não sofre influência dos níveis séricos, mas depende de uma interação complexa entre a pressão oncótica no fluido extracelular hepático, e dos níveis séricos de hormônios que estimulam esta síntese como, por exemplo, os corticosteróides,

esteróides anabólicos e tiroxina, e a presença de citocinas pró-inflamatórias que inibem esta síntese e o estado nutricional, além da disponibilidade de energia, proteínas e micronutrientes (HIRAYAMA et al., 1990).

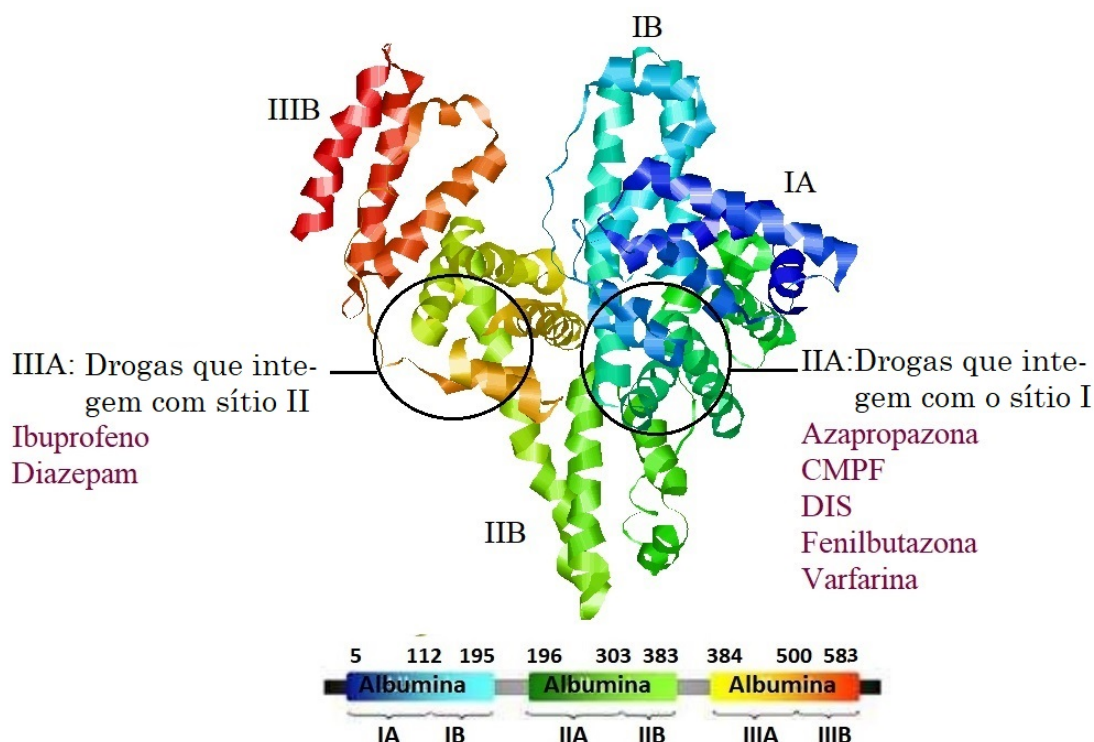
Em termos estruturais, tanto a HSA quanto a BSA são proteínas globulares, não glicosiladas, formadas principalmente por estruturas alfa hélices, unidas por 17 pontes de dissulfeto, que constituem cerca de 67% da estrutura total, folhas beta com cerca de 23% da estrutura total e estruturas randômicas com os 10% correspondente a estrutura total (DE; KAUR; DATTA, 2013).

Entre a BSA e a HSA existe uma semelhança estrutural de 76%, sendo a BSA com peso molecular de 66,5 kDa e 583 aminoácidos e a HSA, com 66,7 kDa e 585 aminoácidos. Devido à estrutura primária de ambas apresentarem grupos de resíduos aromáticos de triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (phe), permitem com que técnicas espectrais, como absorbância, fluorescência, polarização, entre outras forneçam informações da interação proteína-ligante. Enquanto a HSA possui 27 fenilalaninas, 1 triptofano e 18 tirosinas, a BSA possui 30 fenilalaninas, 2 triptofanos e 18 tirosinas. Essa variação quanto ao número de Trp torna a BSA mais sensível a mudanças nos espectros de UV-Vis, o que a torna uma boa candidata ao estudo das interações de ligação da proteína com fármacos (NAN et al., 2019).

O mapeamento de sítios para a identificação de regiões da molécula e resíduos que formam locais de ligação, só foi possível por técnicas específicas como a sequência do DNA, difração de Raios-X, estimativas de energia de fluorescência de distâncias intramoleculares, marcação de afinidade e isolamento de fragmentos funcionais (JR, 1995). FEIXAS et al., 2014, apresentaram e definiram as bases estruturais para o estudo da interação entre as drogas e proteína HSA. Utilizando as técnicas de difração de Raios-X, foram identificados os principais resíduos, na biomolécula, quanto à especificidade da interação e à acomodação flexível do fármaco durante a interação (FEIXAS et al., 2014).

Do ponto de vista farmacológico, uma das principais características de ambas as proteínas consiste no transporte de fármacos, de modo que, essas proteínas exercem influência direta nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos (GHUMAN et al., 2005; WANG et al., 2019). Deve-se considerar que compreender a atividade farmacocinética de um fármaco no organismo engloba estudar sua distribuição, taxa de metabolismo e sua excreção, etc, pois tais fatores são de fundamental interesse no desenvolvimento de novos medicamentos (COLMENAREJO; ALVAREZ-PEDRAGLIO; LAVANDERA, 2001). Na Figura 2 apresentamos a estrutura, com as informações sobre os domínios e subdomínios da BSA depositadas no *Protein Data Bank* (PDB, 2020) sob código 4FS5, visualizados no programa RASMOL (SAYLE; BISSELL, 1992).

Figura 2 – Estrutura Tridimensional da BSA



Fonte: Protein Data Bank (PDB, 2020).

Os principais locais de ligação de fármacos na BSA são denominados de sítio I e sítio II e estão localizados nos subdomínios IIA e IIIA, respectivamente (FANALI et al., 2012; YAMASAKI et al., 1996). O sítio I e o sítio II se diferem ao considerar a sua forma, tamanho e polaridade, as quais determinam a especificidade da ligação nas duas cavidades. O sítio I é uma cavidade predominantemente não-polar e um dos triptofanos está presente neste (Figura 2). Dois agregados polares de resíduos de aminoácidos podem ser identificados neste sítio: uma no extremidade da cavidade (Tyr150, His242, Arg257) e outra na entrada da cavidade (Lys195, Lys199, Arg218, Arg222).

O sítio I é composto com 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 à proteína é estabilizada em grande parte por interações

O sítio II é menor do que o sítio I e foi observado que o acesso a este sítio ocorre somente após o movimento da cadeia lateral induzido pelo ligante, com isso a entrada do sítio é exposta ao solvente. Na cavidade do sítio II existe um único agregado polar localizado próximo à entrada do sítio, composta Arg410, Tyr411, Lys414 e Ser489. A

presença de somente um agregado polar localizado unilateralmente na entrada da cavidade hidrofóbica, determina a especificidade do sítio II. Ligantes de sítio II, como diflunisal, ibuprofeno e sulfato indoxil, estão localizados no centro da cavidade e interagem com a Tyr411 (GHUMAN et al., 2005; RYAN et al., 2011).

A ligação de um fármaco à BSA depende de suas características estruturais, o que o levará a maior ou menor afinidade por um sítio ou outro. Geralmente, moléculas heterocíclicas volumosas com carga negativa localizada na parte central ligam-se preferencialmente ao sítio I, como por exemplo os fármacos varfarina e fenilbutazona (GHUMAN et al., 2005), enquanto que as moléculas aromáticas que possuem em sua estrutura ácidos carboxílicos com a carga negativa, localizada nas extremidades e separada por um centro hidrofóbico, ligam-se preferencialmente ao sítio II da HSA como, por exemplo, o fármaco diazepam (YAMASAKI et al., 1996).

No entanto, apesar de existirem preferências em determinado sítio, estudos mostram que as propriedades estruturais dos ligantes, mencionadas anteriormente, não são um fator determinante do local de ligação na BSA, como é o caso de fármacos como a varfarina e ibuprofeno, que são relatados por se ligarem aos locais I e II, respectivamente, com afinidades diferentes, dependendo do local de ligação (DE; KAUR; DATTA, 2013). É justamente essa afinidade de ligação à albumina sérica que afeta como essas drogas serão distribuídas no organismo (GHUMAN et al., 2005).

Por esse motivo, é necessário 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. Portanto, 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 efeito farmacológico (GHUMAN et al., 2005).

Além disso, é importante determinar o local preferencial de ligação do fármaco desconhecido a albumina 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 e na taxa de metabolismo e excreção (Liu *et al.*, 2015). A caracterização e determinação de um sítio preferencial de ligação à uma proteína pode ser obtidas através de técnicas espectroscópicas como, por exemplo, a espectroscopia de absorbância UV-Vis e fluorescência de emissão, a partir da determinação da constante de afinidade ou associação, dicroísmo circular induzido e pela técnica computacional de docagem molecular.

Nesse contexto, nosso estudo foi baseado nas técnicas experimentais envolvendo a espectroscopia de absorção na região ultravioleta e visível, a fim de determinar a constante de afinidade do corante BCP na BSA e determinar um sítio preferencial para essa ligação a partir do estudo de competição com fármacos que se ligam nos sítios I, II e III.

2.2.1 Ligação de Drogas à Albumina: Utilização de Métodos Espectroscópicos para Determinação da Interação

O estudo da interação entre proteínas e fármacos é muito relevante, seja na elaboração de novos fármacos para amenização e cura de doenças seculares, assim como, para entender possíveis efeitos colaterais de abordagens terapêuticas. Através desses estudos pode-se determinar a afinidade do fármaco pela albumina, seu sítio de ligação, e parâmetros físico-químicos que influenciam sua farmacocinética e farmacodinâmica. Um dos procedimentos mais simples e utilizados para estes estudos são as medidas baseadas em alterações espectrais da albumina (CACITA; NIKOLAOU, 2016).

A Espectroscopia de UV-Vis baseia-se em medidas de absorção da radiação eletromagnética, nas regiões visível entre 400 a 800 nm e ultravioleta do espectro na faixa de 200 a 400 nm. Para tal usa-se um feixe de luz branca incidente sobre uma amostra (espécie molecular) que absorve luz e a radiação resultante emergente será detectável pela cor complementar da radiação absorvida (SKOOG, 2002). Consequentemente, átomos ou moléculas passam de um estado de energia mais baixa (estado fundamental), para o estado de energia maior (estado excitado), de maneira que, a radiação eletromagnética absorvida apresenta energia exatamente igual à diferença de energia entre os estados excitados e fundamental.

Na espectroscopia UV-Vis, as transições ocorrem entre níveis de energia eletrônicos. Quando uma molécula absorve energia, um elétron é promovido de um orbital ocupado para um orbital desocupado de maior energia potencial (HOMO, do inglês Highest Occupied Molecular Orbital) para o mais baixo orbital molecular desocupado (LUMO, do inglês Lowest Unoccupied Molecular Orbital) (PAVIA et al., 2010).

2.2.2 Lei de Lambert - Beer

Esta Lei diz basicamente que quanto maior o número de moléculas capazes de absorver luz de certo comprimento de onda, maior a extensão dessa absorção.

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (2.1)$$

onde

A = Absorbância

I_0 = intensidade da luz incidente na cela da amostra

I = intensidade da luz saindo na cela da amostra

l = comprimento da cela da amostra (cm)

c = concentração molar do soluto

ϵ = absortividade molar

A lei de Lambert-Beer é aplicável a mais de uma espécie absorvente, quando não existe interação entre elas pois as absorbâncias são aditivas (PAVIA et al., 2010). Por

essa razão, as técnicas de absorção óptica e de fluorescência são muito utilizadas no estudo de sondas, como por exemplo os corantes Rosa Bengala e BCP que apresentam o fenômeno de solvatocromismo em seus espectros.

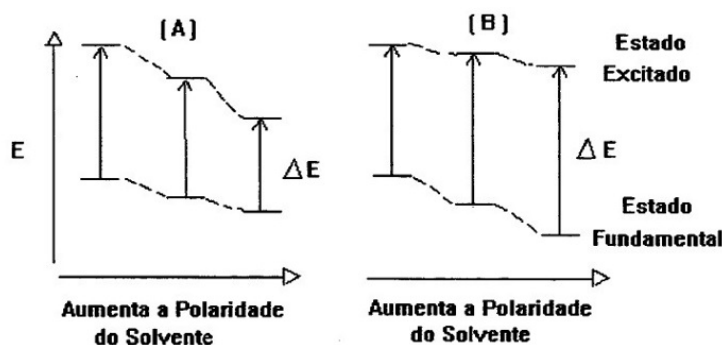
2.3 Solvatocromismo

Os corantes com características solvatocrômicas (solvatocromismo) são compostos onde são observadas mudanças na posição, e algumas vezes na intensidade, de uma banda de absorção nos espectros de UV-Vis resultante de uma mudança na polaridade do meio. O Solvatocromismo é, portanto uma propriedade de um cromóforo que altera sua absorção e/ou fluorescência em função do meio (MACHADO et al., 1997).

Essas mudanças espectrais resultam em uma variedade de interações que podem ser interpretadas por modelos matemáticos que descrevem o fenômeno de solvatocromismo. 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, e não de propriedades específicas como a capacidade de formação de ligações de Hidrogênio, ligações de Van der Waals e ligações iônicas (LAKOWICZ, 2013).

Essas mudanças espectrais que acompanham a variação de solvente são resultantes das forças de interação entre as moléculas do soluto e do solvente, tais como íon-dipolo, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e etc., que por sua vez tendem a alterar a diferença de energia entre os estados fundamental e excitado do cromóforo (MACHADO et al., 1997). Portanto, os efeitos do solvente sobre os espectros de absorção podem ser usados para fornecer informações sobre as interações soluto-solvente. A Figura 3 apresenta o efeito do solvente sobre transições eletrônicas.

Figura 3 – Representação esquemática do efeito do solvente sobre as transições eletrônicas de solutos em solventes polares.



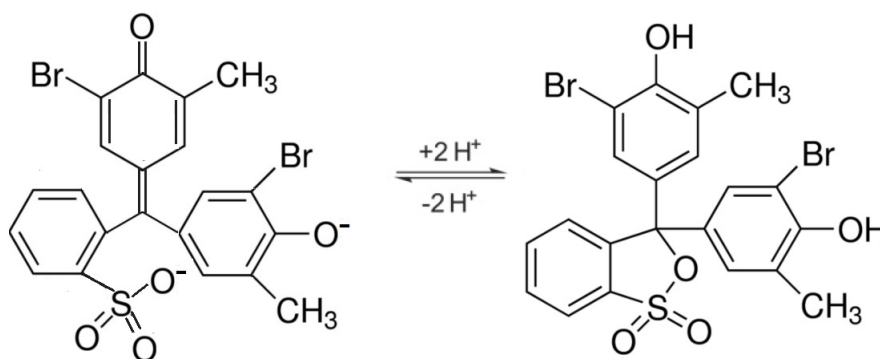
Legenda: Em (A) $\mu_g < \mu_e$, (B) $\mu_g > \mu_e$. onde μ_g e μ_e representam os momentos de dipolo no estado fundamental e excitado do soluto, respectivamente. Fonte: Copiado de (MACHADO et al., 1997)

O solvatocromismo pode ocorrer de forma negativa e positiva. No solvatocromismo positivo, os espectros de absorção se deslocam para o maior comprimento de onda ou para o vermelho (deslocamento batocrômico) e geralmente é acompanhado de um aumento na intensidade de absorção, denominado hipercromismo. Já no solvatocromismo negativo, os espectros de absorção sofrem 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, 2013).

2.3.1 O corante Púrpura de Bromocresol

O púrpura de bromocresol ($C_{21}H_{16}Br_2O_5S$) apresenta duas formas em equilíbrio. A variação no nível de acidez causa uma mudança nas formas de equilíbrio e coloração do BCP. A primeira forma ocorre em soluções aquosas de BCP com pH abaixo de 6,0. A segunda forma ocorre quando a molécula está dissociada, BCP^{2-} , em pH acima de 6,0 (ALDRICH, 2011). Na Figura 4, apresentamos a estrutura do BCP em solução aquosa em suas formas protonada e desprotonada.

Figura 4 – Estrutura do BCP em solução aquosa entre as duas formas: protonada ($pH < 6,0$) e não protonada ($pH > 6,0$).



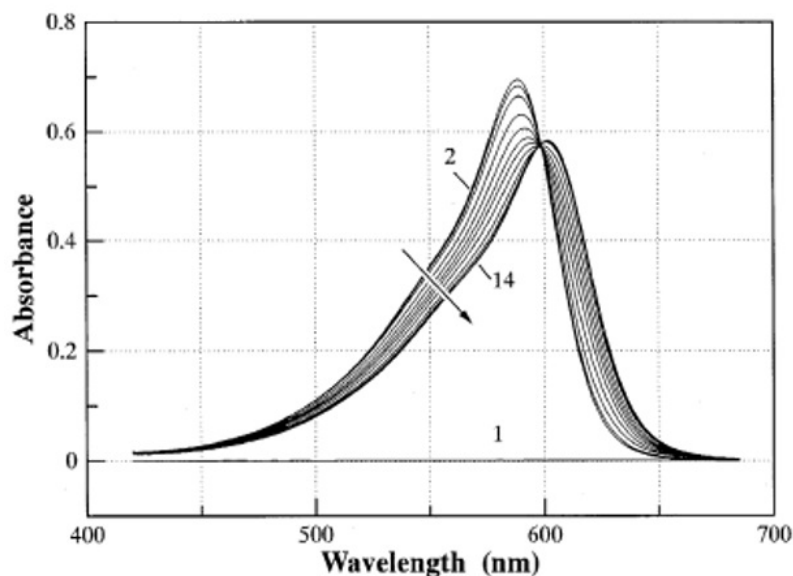
Fonte: (ALDRICH, 2011).

Nas duas formas da molécula, a transferência de um próton do BCP para a água ou vice-versa causa uma mudança de cor na região do visível do espectro eletromagnético: de amarelo (forma protonada) para roxo (forma dissociada). Esta mudança de cor é causada por uma diferença em suas estruturas, como é possível observar na Figura 4 (AKIHISA et al., 1996).

Nesse contexto, estudos preliminares, baseados em artigos científicos de interação entre o corante BCP e a BSA mostraram que existe um deslocamento para o maior comprimento

de onda a medida que a concentração de BSA é aumentada, conforme pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 – Espectros de absorção do BCP sem e com a presença de BSA.



Legenda: Variação da Concentração de BSA no BCP. 1- 40 mM de tampão Tris-HCl no pH 8.8. 2 - 10 μ M de BCP na ausência de BSA. Nos espectros de 3 a 14 são acrescentadas as seguintes concentrações de BSA, nessa ordem: 0,1 mg, 0,2 mg, 0,4 mg, 0,6 mg, 0,8 mg, 1,0 mg, 1,4 mg, 2,0 mg, 4,0 mg, 6,0 mg, 8,0 mg e 10 mg. A seta indica a direção de aumento de concentração de BSA (NAKAMARU; SATO, 1997).

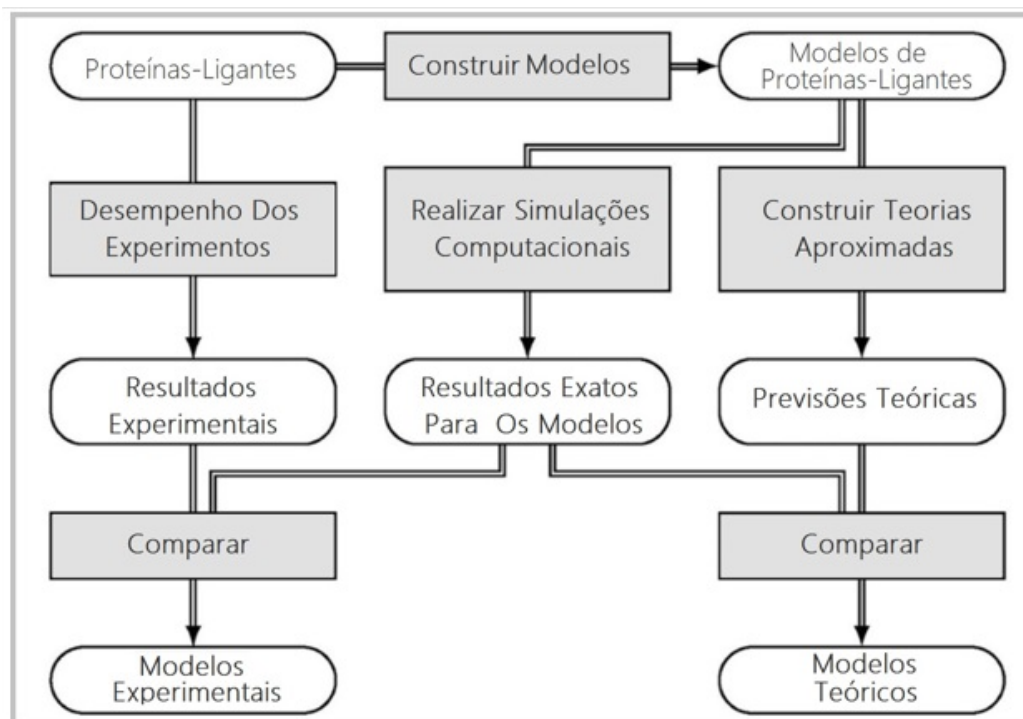
Conforme a Figura 5, notou-se um deslocamento do espectro do BCP na presença da BSA. Isto pode ser resultante do efeito do solvatocromismo devido ao meio mais hidrofóbico do sítio de ligação da BSA. Por esse motivo, é muito relevante o estudo de solvatocromismo.

2.4 Metodologias experimentais e teóricas do ponto de vista da Simulação Computacional

A simulação computacional ou molecular (SM) é baseada nos conceitos de física clássica e quântica e consiste em uma ponte para comparação de estudos experimentais e teóricos. Por isso, a construção de modelos exatos são fundamentais para a obtenção de resultados exatos. A SM está na mesma direção destes outros estudos no sentido de buscar um maior entendimento das interações entre as biomoléculas e os novos fármacos de uma maneira complementar, buscando subsídios teóricos para uma possível comparação entre os resultados experimentais e os teóricos realizando assim testes de modelos e testes

de teorias (BOZA, 2018). Na Figura 6 apresentamos a correlação entre os resultados experimentais, as simulações computacionais e as previsões teóricas.

Figura 6 – Conexão entre experimento, teoria e simulação computacional.



Fonte: Adaptado de (ALLEN, 2017).

Nesse contexto, o estudo de BCP do ponto de vista da simulação computacional é muito importante, destacando-se os cálculos *ab initio*, através da metodologia da Teoria do Funcional de Densidade (do inglês *Density Functional Theory*, DFT), para obtenção da estrutura de menor energia e da superfície de energia potencial com a variação de ângulos diedros do BCP. Outro método teórico muito importante consiste na determinação de espectros de absorção e dos orbitais moleculares HOMO e LUMO através da Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT).

Tanto os métodos semi-empíricos quanto os *ab initio* utilizam aproximações. Estas podem ser, por exemplo, formas simplificadas das equações de primeiros princípios que seriam mais rápidas e fáceis de se resolver, aproximações limitando o tamanho do sistema (como condições de contorno periódicas). Por exemplo, a maioria dos cálculos *ab initio* faz uso da aproximação de Born-Oppenheimer, a qual simplifica significativamente a equação de Schrödinger por considerar que não há deslocamento dos núcleos atômicos durante o cálculo. Em princípio, os métodos *ab initio* eventualmente convergem para a solução exata das equações fundamentais à medida que o número de aproximações é reduzido (SOUZA et al., 2019).

A DFT é uma teoria da mecânica quântica usada em química quântica e física do

estado sólido para resolver, através de métodos aproximativos, a equação de Schrödinger para sistemas de muitos corpos. Isso possibilita, por exemplo, estimativas para energia de ionização e uma análise da teoria de bandas (MARTÍN-RODRÍGUEZ; ARAVENA; RUIZ, 2016).

Com esta teoria, as propriedades de um sistema de muitos elétrons podem ser determinadas usando-se funcionais (funções que recebem como argumento uma outra função) espacialmente dependentes da densidade eletrônica, o que origina o nome Teoria do Funcional da Densidade. Quando aplicamos este conceito nos estudos do BCP, é possível investigar a estrutura de menor energia desse corante, o que permite a obtenção de mais informações sobre a estrutura de BCP utilizada nos procedimentos experimentais.

A DFT tem a sua base teórica no teorema de Runge-Gross (RG), que é um análogo do teorema de Hohenberg-Kohn (HK). O teorema RG prediz que para uma dada função de onda existe um único mapeamento entre o potencial externo e a densidade eletrônica. Da mesma maneira, no teorema HK não existe um princípio de minimização geral na mecânica quântica com a inclusão da dependência com o tempo. A abordagem RG postula que um sistema de um único componente, na presença de um campo escalar dependente do tempo, pode ser descrito por um Hamiltoniano da forma:

$$E_s[n] = \langle \psi_s[n] | T + V_s | \psi_s[n] \rangle \quad (2.2)$$

onde T é o operador energia cinética, V o termo que descreve a interação elétron-elétron. Considerando a equação de Schrödinger como referência, o teorema RG diz que, o potencial externo é determinado pela densidade eletrônica, que pode ser expandido numa série de Taylor. Dois potenciais externos diferem não mais que uma constante e geram diferentes densidades de corrente que correspondem à diferentes densidades eletrônicas.

A TD-DFT (do inglês Time Dependent - Density Functional Theory) do é uma teoria da mecânica quântica para investigar as propriedades e a dinâmica de sistemas de muitos corpos na presença de potenciais dependentes do tempo, como campos elétricos ou magnéticos para extrair recursos como energias de excitação, propriedades de resposta dependentes de frequência e espectros de absorção de UV-Vis.

A TD-DFT tem a sua base teórica no teorema de Hohenberg-Kohn (HK) (GILBERT, 1975) e estes cálculos têm como base o fato de que a função resposta linear possui singularidades nas energias de excitação, exatas, do sistema. A abordagem HK postula que um sistema de um único componente, na presença de um campo escalar dependente do tempo, pode ser descrito por um Hamiltoniano da forma:

$$H(t) = T + V_{ext}(t) + W \quad (2.3)$$

onde T é o operador energia cinética, W o termo que descreve a interação elétron-elétron e $V_{ext}(t)$ é o potencial externo onde está incluído a interação entre os elétrons e o núcleo e a função de onda é descrita pela equação de Schrödinger dependente do tempo.

3 Objetivos

O objetivo geral do presente projeto é a identificação das estruturas responsáveis pelas variações solvatocrômicas no BCP que poderão levar a um maior entendimento dos fatores envolvidos na determinação da concentração de BSA no plasma sanguíneo. Os objetivos específicos são:

- Estudar os espectros de UV-vis do Púrpura de Bromocresol na ausência e presença de BSA.
- Estudar a interação entre o BCP e BSA visando determinar as constantes de associação e dissociação;
- Determinar os sítios preferenciais de BCP na BSA através do estudo de competição de fármacos que ligam nos sítios I, II e III;
- Estudo do efeito do pH nos espectros de absorção do BCP e interação entre o BCP e a BSA;
- Estudar o efeito dos solventes através de espectros de absorção de UV-Vis experimentais e teóricos;

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Nesse trabalho, a albumina de soro bovino (Código Sigma 7030), púrpura de bromocresol, sulfato de quinina e sal para o preparo de solução salina tamponada com fosfato (PBS), acetato de sódio e ácido acético para o para obtenção de solução de tampão acetato e os solventes acetonitrila (C_2H_3N), dimetilsulfóxido (DMSO – $(CH_3)_2SO$), dimetilformamida (DMF – C_3H_7N) e o tetraidrofurano (THF – C_4H_8O), foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os solventes álcool metílico (Metanol – CH_4O), álcool etílico (Etanol – C_2H_6O) foram fornecidos pela J. T Baker Chemical Company.

4.1.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nesse trabalho foram: medidor de pH (Analyser modelo 300 Digital - São Paulo, Brasil); balança analítica AG245 (Mettler Toledo, Ohio, EUA); espectrofotômetro UV-Vis Agilent Cary 8454 (JASCO – Santa Clara, Califórnia, EUA), espectrofotômetro UV mini 1240 (Shimadzu – Barueri, São Paulo, Brasil) e software Wolfram Mathematica para obtenção de gráficos e testes estatísticos.

Para os estudos teóricos foram utilizados os seguintes *softwares*: RASMOL (SAYLE; BISSELL, 1992), para a visualização da proteína BSA, Gaussian 16 (FRISCH et al., 2016) dos computadores do CEPID/ FAPESP *Center for Computational Engineering and Sciences* da Unicamp para os cálculos de otimização de BCP via DFT e obtenção dos espectros teóricos de absorção UV-Vis via TD-DFT, GaussView para obtenção da matriz z de BCP, determinação de distância entre ângulos, distância entre ligações, diedros e os orbitais envolvidos nos cálculos *ab initio* através do Núcleo de Computação Científica (NCC/GridUNESP) para a otimização semi-empírica do BCP.

Também foi utilizado a linguagem de programação em *Python* (Linguagem de Programação de alto nível, orientada e interpretada por *scripts* para a automatização da obtenção das coordenadas atômicas dos ligantes da HSA (Metodologia descrita no apêndice).

4.1.3 Preparo das soluções

Os reagentes utilizados para execução da prática experimental foram de grau espectrocópico (HPLC) e foram utilizados tal como fornecidos, sem purificação adicional. A água foi duplamente deionizada utilizando um sistema de osmose reversa (Quimis Aparelhos

Científicos, São Paulo, Brasil) e um sistema de purificação Milli-Q (Simplicity Millipore, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

4.1.4 Solução fisiológica salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS) no pH = 7,4

Para a obtenção de 200 mL de solução fisiológica salina tamponada com fosfato, foi dissolvido um comprimido em 200 mL de água produzindo uma solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, cloreto de potássio $0,0027 \text{ mol L}^{-1}$ e cloreto de sódio $0,137 \text{ mol L}^{-1}$ no pH 7,4. A aferição do pH foi realizada utilizando um medidor de pH. A solução foi mantida na geladeira.

4.1.5 Albumina sérica bovina (BSA) $0,001 \text{ mol L}^{-1}$

Para o preparo de 500 μL de solução estoque de BSA $0,001 \text{ mol L}^{-1}$, foram pesados 0,033 g de BSA e diluído em solução tampão PBS. A solução foi mantida na geladeira.

4.1.6 Púrpura de Bromocresol (BCP) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

Para o preparo de 1 mL de solução estoque de BCP $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, foram pesados 0,00562 g de BCP e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir desta solução foram feitas as diluições necessárias em solução tampão PBS, para cada experimento. A solução estoque foi mantida na geladeira.

4.1.7 Ácido acético-3-indol (3-IAA) $0,001 \text{ mol L}^{-1}$

Para o preparo de 1 mL de solução de 3-IAA $0,001 \text{ mol L}^{-1}$, foram pesados 0,00197 g de 3-IAA e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). A solução foi mantida na geladeira e a solução de trabalho era descartada após o uso.

4.1.8 Varfarina $0,001 \text{ mol L}^{-1}$

Para o preparo de 1 mL de solução de Varfarina foram pesados 0,00309 g desse fármaco e diluído em etanol e mantida na geladeira.

4.1.9 Ibuprofeno $0,001 \text{ mol L}^{-1}$

Para o preparo de 1 mL de solução de Ibuprofeno foram pesados 0,00206 g desse fármaco e diluído em etanol e mantida na geladeira.

4.1.10 Digitoxina 0,001 mol L⁻¹

Para o preparo de 1 mL de solução de digitoxina foram pesados 0,00766 g desse fármaco e diluído em etanol e mantida na geladeira.

4.2 Estudo da interação entre BCP e BSA

4.2.1 Determinação do espectro UV-Vis do BCP a partir da adição de BSA e determinação da constante de associação (K_a)

A obtenção dos espectros de absorção da BCP com ou sem a adição da BSA foi realizada através da técnica de espectrofotometria de absorção de UV-Vis. Para esta técnica foi utilizado o Espectrofotômetro UV-Vis Agilent Cary 8455, no qual foi ajustado no comprimento de onda de 500 a 650 nm, que consiste na faixa de emissão visível do corante BCP em solução PBS. A concentração de 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BCP foi titulada com a proteína BSA (alíquotas equivalentes a 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ até atingir a saturação). Os dados foram analisados com auxílio do *software Origin 8.0* para o cálculo da constante de dissociação (K_d), seguindo a equação:

$$\alpha = \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (4.1)$$

onde α corresponde aos valores de máxima absorção obtidos nos espectros de absorção na região UV-Vis da diferença entre o espectro do BCP livre e os espectros do complexo BCP + BSA, $[L]$ refere-se a concentração de BSA e K_d corresponde a constante de dissociação. A constante de dissociação é obtida através de um ajuste não linear de α em função da concentração de BSA (RAWEL; MEIDTNER; KROLL, 2005).

A constante de afinidade ou associação (K_a) é descrita pela equação (4.2) à seguir:

$$K_a = \frac{1}{K_d} \quad (4.2)$$

Os dados foram obtidos em triplicata e tratados conforme descrito na literatura (RAWEL; MEIDTNER; KROLL, 2005)

4.2.2 Ensaios de espectro de UV-Vis em diferentes temperaturas e determinação de parâmetros termodinâmicos

Para a obtenção dos espectros de absorção UV-Vis do BCP com a adição de BSA, foram utilizados o agitador e circuladores da *Grant Instruments Série GD100* na temperaturas 20,9 °C, 29,6 °C e 38,4 °C, mantendo fixa a concentração de 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BCP e adicionando BSA em 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (3 - 72 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A partir disso, a constante de afinidade (K_a) de BCP foi determinada como descrita no item anterior (Rawel *et al.*,

2006). A partir dos valores de constante de associação obtidos em cada temperatura, os parâmetros termodinâmicos (Variação de Entalpia (ΔH), Variação de Entropia (ΔS) e Variação de Energia Livre de Gibbs (ΔG) foram calculadas.

4.2.3 Ensaios de competição entre fármacos e espectros de UV-Vis da interação entre BCP e BSA para o estudo de preferência por sítios de ligação

A especificidade do BCP para os sítios de ligação em BSA foi estudada usando a varfarina, um marcador de sítio I, o ibuprofeno, um marcador de sítio II e a digitoxina, um marcador de sítio III. O experimento foi realizado, individualmente, usando a varfarina, ibuprofeno, digitoxina e VID (Mistura com os fármacos varfarina, ibuprofeno e digitoxina) numa faixa de absorção de 500 – 650 nm, pH 7,4 e 25 °C. A concentração de 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e de BCP e 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada fármaco foram tituladas com a proteína BSA (alíquotas equivalentes a 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ até atingir a saturação). A partir dos espectros foram calculadas as constantes de associação para estudar a especificidade de sítio de ligação do BCP na BSA por meio das equações (4.1) e (4.2).

4.2.4 Obtenção da curva de calibração para o estudo da interação entre BCP com a adição de fármacos e BSA através de espectroscopia UV-Vis

A curva de calibração foi obtida através da absorbância de 12,5 μmol de BCP com a adição de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA no comprimento de onda de 600 nm. Foi utilizado uma solução tampão de acetato no pH 5,2, de acordo com método de curva de calibração descrito na literatura (CHRISTOPOULOS; DIAMANDIS, 1986). O mesmo procedimento foi realizado incluindo os diferentes fármacos (varfarina, ibuprofeno e digitoxina) no BCP à uma concentração 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As titulações de cada experimento foram obtidas de modo que a alíquota atingisse o valor de 1000 μL nos tubos de endorfe.

4.2.5 Espectros de absorção UV-Vis da interação entre BCP e composto urêmico 3-IAA a partir do aumento de concentração de BSA

Os espectros de absorção UV-VIS do ensaio BCP + 3-IAA + BSA foram obtidos utilizando o comprimento de emissão de 500 – 650 nm. Nesse ensaio, foi adicionado 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BCP e 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 3-IAA em intervalos de 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA. Os espectros de absorção UV-Vis obtidos foram utilizados para determinação de K_a .

4.2.6 Estudo do pH no corante BCP

Nesse experimento foram obtidos espectros de absorção UV-Vis para os ensaios de BCP e BCP + BSA nos valores de pH 3, 7, 8 e 9 com a faixa de comprimento de absorção de 200 a 700 nm.

4.2.7 Estudo de solvatocromismo: Solventes

A análise do solvatocromismo do BCP foi realizada através dos espectros de absorção pelo espectrofotômetro UV-vis entre os comprimentos de absorção 200 a 700 nm. A concentração do BCP utilizada foi de $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e adicionada em todos os solventes utilizados, que foram: água (PBS), acetonitrila, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, tetraidrofurano, etanol e metanol.

4.3 Metodologia Computacional

A conformação de menor energia do BCP na forma aberta e fechada foi obtida através do DFT. Os espectros de absorção na região do ultravioleta e do visível da forma aberta do BCP foi obtido através da superfície de energia potencial no vácuo e diferentes solventes através dos cálculos computacionais de TD-DFT. Os resultados deste estudo puderam elucidar quais as conformações adotadas por estas moléculas através da comparação entre os resultados de TD-DFT obtidos nas simulações computacionais com aqueles obtidos experimentalmente.

4.3.1 Construção da molécula BCP e cálculos da superfície de energia potencial

As conformações mais estável do BCP em sua forma aberta em fase gasosa e nos solventes água, ACN, etanol, metanol, DMSO, DMF e THF foram calculadas usando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com o funcional híbrido CAM-B3LYP e conjunto de função de base 6-311++G (3df,2p), usando o programa Gaussian16 no CEPID/ FAPESP Center for Computational Engineering and Sciences da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). No processo de otimização foi adicionada a versão D3 da dispersão de Grimmes com o amortecimento de Becke-Johnson e o modelo SMD solvente (água).

No cálculo dos espectros teóricos de absorção UV-Vis foram utilizados os seguintes parâmetros no programa Gaussian16: TD(FULL,SINGLET,NSTATES=15) SCRF(SMD, SOLVENT). Para este experimento foi utilizado o funcional PBE0 e conjunto de bases 6-311++G (3df,2p), na otimização e cálculo das frequências. A visualização e interpretação dos resultados foram feitas através do software GAUSSVIEWS 5.0.

5 Resultados e Discussões

A metodologia desenvolvida foi aplicada para estudar a interação BCP-BSA através de técnicas experimentais e de simulações computacionais. Os espectros do complexo BCP-BSA e a constante de associação entre essa interação foi determinada na seção 5.1. Na seção 5.2 a interação entre o BCP e BSA foi caracterizada através dos parâmetros termodinâmicos. O estudo de deslocamento de sítios de ligação e teste estatístico foram realizados na seção 5.3.

Na seção 5.4 foi realizado o experimento de curva de calibração a fim de identificar um possível sítio de ligação do BCP na BSA. A interação BCP-BSA na presença de 3-IAA foi estudada na seção 5.3. O estudo da dependência com o pH e efeito dos solventes nos espectros experimentais de BCP foram descritos nas seções 5.6 e 6.7, respectivamente. Nas subseções 5.9.1 e 5.9.2 foram realizados os cálculos de DFT e TD-DFT para a molécula de BCP.

5.1 Interação entre BCP e BSA

5.2 Estudo dos espectros de absorbância na região do UV-Vis da interação BCP-BSA e determinação da constante de associação.

O deslocamento espectral de um corante orgânico associado a uma proteína fornece informações sobre as propriedades químicas de sua superfície, e também é uma base importante para o uso do ligante como uma sonda para estudos de fenômenos fisiológicos (NAKAMARU; SATO, 1997). A fim compreender os fenômenos que ocorrem na interação BCP-BSA foi realizado experimentos de espectrofotometria de absorção na região UV-Vis desse complexo (Figura 7).

Conforme os espectros presentes na Figura 7, notou-se que o espectro muda ligeiramente para o maior comprimento de onda e uma diminuição na intensidade de absorção a partir do aumento da concentração de BSA. Também foi possível verificar um ponto isobéstico em 598 nm. Os autores Nakamaru *et al.* atribuíram o ponto isobéstico à presença de dois componentes na mistura de reação, provavelmente o ânion BCP livre e o ânion BCP ligado ao BSA como um monômero (NAKAMARU; SATO, 1997). A presença do ponto isobéstico também pode ser verificado no espectro de diferença entre o BCP livre e os espectros de BCP-BSA, obtidos a partir da titulação de BSA, conforme apresentado na Figura 8.

Figura 7 – Espectro de absorbância visível de BCP na ausência e presença de BSA. BCP $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$; BSA $0-72 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{abs} = 500-650 \text{ nm}$ a 25°C .

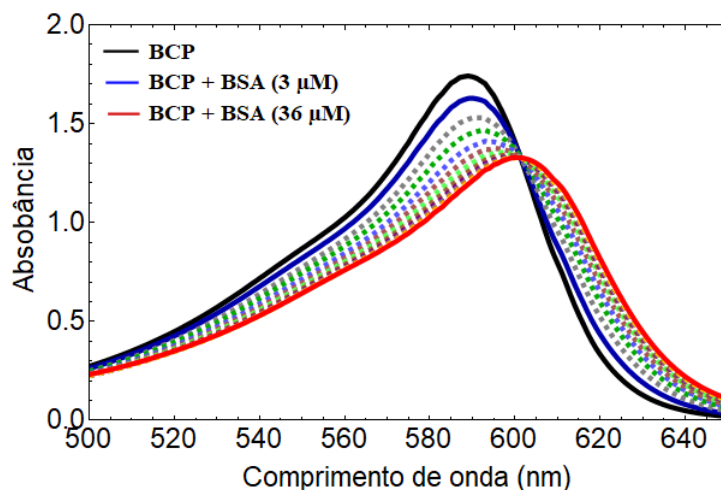
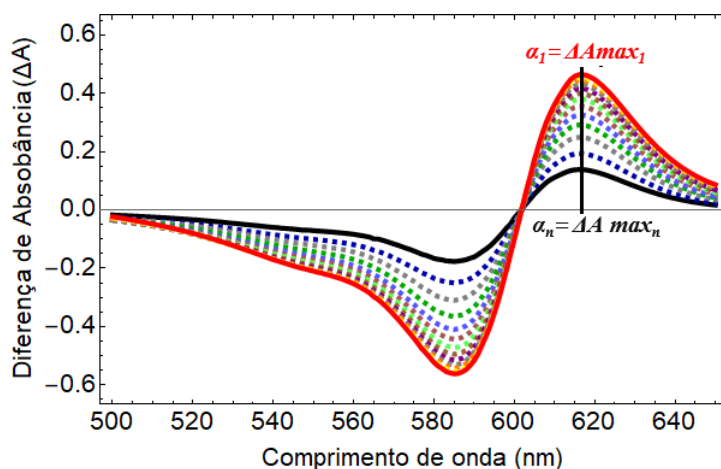


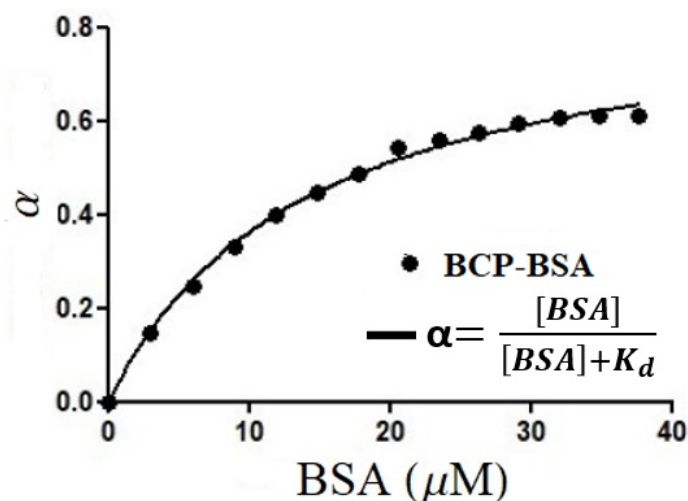
Figura 8 – Espectro de diferença entre o BCP e os espectro de BCP com adições de BSA. BCP $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$; BSA $0-72 \mu\text{mol L}^{-1}$. $\lambda_{abs} = 500-650 \text{ nm}$ a 25°C .



Legenda: O eixo y corresponde aos espectros da diferença entre BCP livre subtraído com interação BCP-BSA em cada concentração de BSA titulada (ΔA). A linha traçada destaca os valores de α (valores de absorbância máxima ou ΔA_{max} obtida em cada um desses espectros.

Com base nos espectros de diferença presentes na Figura 8, foi possível construir um gráfico com os valores de máxima absorção (α) em função da concentração de BSA (RAWEL; MEIDTNER; KROLL, 2005).

Figura 9 – Dependência do parâmetro α com a concentração de BSA e ajuste polinomial para a determinação do K_d .



A Figura 9 mostra um platô dentro do intervalo de concentração utilizada, o que indica uma saturação do complexo estudado. Os dados da Figura 9 foram ajustados por uma função polinomial como descrito na equação (4.1) do modelo de Rawel (Rawel *et. al.*, 2006), e o valor de K_d foi obtido. A partir deste, foi calculado a constante de associação (equação 4.2), sendo obtido um valor de $K_a = (6,60 \pm 0,02) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

5.3 Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos

A utilização da técnicas espectroscópicas para o estudo da interação entre proteínas e ligantes em diferentes temperaturas são fundamentais, uma vez que uma única análise permite obter os parâmetros da interação, tais como a constante de associação e parâmetros termodinâmicos envolvidos na associação, como a variação de entalpia (ΔH), de energia livre de Gibbs (ΔG) e de entropia (ΔS) (SURYAWANSHI *et al.*, 2016).

Os espectros de absorção da interação BCP-BSA nas temperaturas 293,9, 302,6 e 311,4 K foram apresentados na Figura 10. A formação desse complexo foi confirmada adicionalmente a partir dos valores de K_a obtidos nas diferentes temperaturas (Tabela 2). A partir dos resultados apresentados na Tabela 2, verificou-se uma diminuição da constante de associação em maiores temperaturas. Isto ocorre porque em altas temperaturas a entalpia do sistema é predominante, provocando uma diminuição do efeito hidrofóbico das regiões polares da BSA (ALLEWELL *et al.*, 1979). Além disso, a partir dos valores das constantes de afinidade da interação entre BCP e BSA em diferentes temperaturas foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos. A variação da entalpia (ΔH°) (Equação 5.1), variação de energia livre de Gibbs (ΔG°) (Equação 5.2) e variação de entropia (ΔS°) (Equação 5.3) do sistema são parâmetros capazes de determinar o tipo

de interação existente.

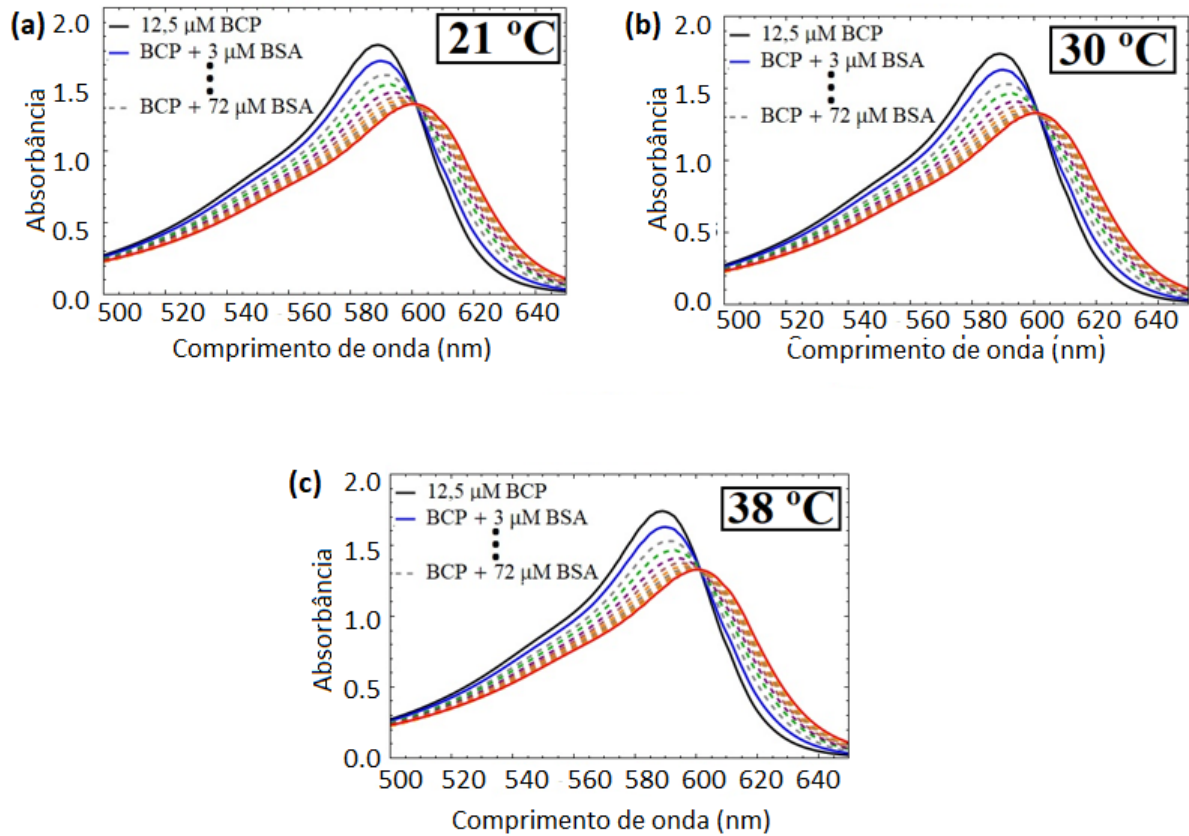
$$\ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = \frac{(\Delta H^\circ)}{R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \quad (5.1)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (5.2)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (5.3)$$

em que o índice $\circ$ representa o valor médio. A partir das equações descritas acima foram calculados $\Delta G^\circ, \Delta H^\circ, \Delta S^\circ$, respectivamente, utilizando os valores das constantes de associação obtidas na Tabela 2 e suas respectivas temperaturas. Os valores obtidos para esses parâmetros termodinâmicos são mostrados na Tabela 3.

Figura 10 – Espectro de absorção Visível do BCP com a adição de BSA em diferentes temperaturas.



Legenda: (a) Temperatura de 20 °C, (b) Temperatura de 29 °C e (c) Temperatura de 38 °C . A concentração de BCP foi de 12,5 μmol L⁻¹ e de 3-72 μmol L⁻¹ de BSA. Foi utilizado o tampão PBS com pH 7,4 e faixa de absorbância de 500 a 650 nm.

Tabela 1 – Determinação das constantes de associação (K_a) em diferentes temperaturas (kelvin).

Temperatura (K)	K_a (M^{-1})
293	$9,96 \times 10^4$
302	$7,46 \times 10^4$
311	$6,70 \times 10^4$

Tabela 2 – Valores médios dos parâmetros termodinâmicos

T (°C)	ΔH° (KJ mol $^{-1}$)	ΔG° (KJ mol $^{-1}$)	ΔS° (J mol $^{-1}$)
293	0	- 28,11	0,095
302	-24,55	-28,21	0,012
311	-17,23	-28,75	0,037

Como pode ser visto na Tabela 3, a entalpia foi calculada pela diferença das temperaturas das amostras analisadas. O valor da energia livre de Gibbs foi praticamente o mesmo, mostrando que este parâmetro só depende do sistema analisado. Por último, o valor da entropia está diretamente relacionada com o valor da entalpia.

De acordo com Ross and Subramanian, os parâmetros termodinâmicos podem ser caracterizados por seus sinais e magnitude. Os valores de ΔH e ΔS , estão associados a vários tipos individuais de interações que podem tomar lugar no processo de associação. Se $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$, o componente principal na interação é considerada do tipo hidrofóbica. Para valores de $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ as interações de Van der Waals e de ligações de hidrogênio desempenham papéis importantes na interação (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). De posse dos valores das constantes termodinâmicas obtidas na Tabela 3 foi possível propor quais forças estão envolvidas na interação entre BCP e BSA. O valor negativo de ΔH° e positivo de ΔS° indica que essa interação é decorrente de forças eletrostáticas e o valor negativo de ΔG° , indica envolvimento de interação espontânea (BOLATTIN et al., 2016; ZHANG et al., 2006).

5.4 Estudo dos sítios de ligação na BSA pelo ligante BCP

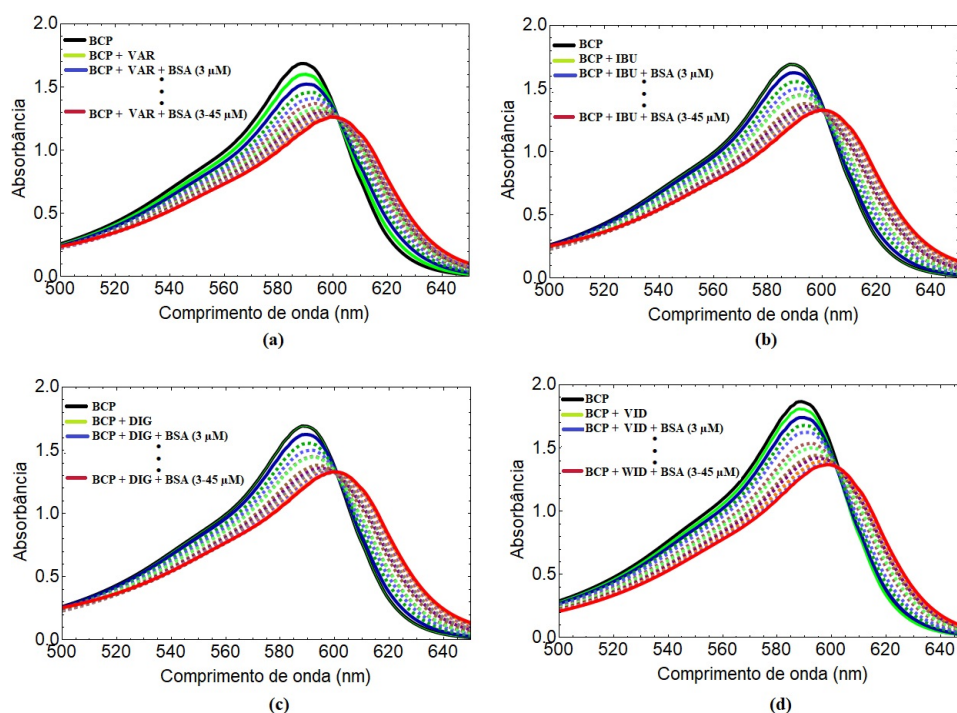
O uso de fármacos que se ligam preferencialmente em algum dos sítios da HSA e BSA são utilizados na elucidação dos locais de ligação de novos compostos por meio de estudos de deslocamento (KUMARI et al., 2014; LIU et al., 2015; NI; SU; KOKOT, 2006; SHAHID; CHAWLA, 2017; SUDLOW; BIRKETT; WADE, 1975). Assim, por exemplo, um novo composto que se ligue no mesmo sítio da proteína pode competir com o fármaco. Dessa maneira, podemos analisar essa propriedade de deslocamento para estudar o sítio

de ligação do BCP na proteína. De acordo com Sudlow, as principais regiões de ligação dos ligantes na albumina são os sítios I, II e III (SUDLOW; BIRKETT; WADE, 1975).

Nestes sítios, os fármacos fenilbutazona e varfarina são conhecidos por se ligarem no sítio I, os fármacos ibuprofeno e naproxeno se ligam no sítio II e digitoxina no sítio III (De, Kaur e Datta, 2013). Empregando este raciocínio, escolhemos um fármaco que se liga preferencialmente ao sítio I (varfarina), outro que se liga preferencialmente ao sítio II da BSA (ibuprofeno) e um último que se liga preferencialmente no sítio III (Digitoxina) para o estudo o estudo de sítios de ligação na BSA pelo ligante BCP através do espectro de absorção UV-vis. A Figura 11 mostra os espectros obtidos na titulação do BCP por BSA na ausência e presença dos fármacos varfarina, ibuprofeno e digitoxina, respectivamente.

As curvas mostram que o espectro de BCP na presença dos fármacos varfarina, ibuprofeno e digitoxina se sobrepõe ao espectro de BCP livre, pois não há diferença significativa. Também foi possível notar que a ligação entre a BCP e a proteína ocorreu mesmo na presença dos fármacos, pois foi observado o mesmo comportamento para todos os gráficos (De A a D). Logo, não é possível se houve competição entre o fármaco e o BCP. Na Tabela 4 são apresentados os valores das constantes de afinidade (K_a) do BCP na BSA na ausência e presença dos fármacos estudados, obtidas através da equação (4.2). Esses valores foram obtidos em triplicata com intervalo de confiança de 95%.

Figura 11 – Espectros da interação entre BCP e fármacos com o aumento da BSA.



Legenda: A) varfarina; B) ibuprofeno; C) digitoxina D) Complexo com todos os fármaco (VID). Concentração de $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BCP e $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada fármaco.

Com base nos valores calculados da constante de associação do BCP na ausência e presença de fármacos, notou-se uma redução de aproximadamente 70% na constante de ligação de BCP na presença do Ibuprofeno, de 62 % na presença de varfarina e de 50 % na presença da digitoxina. No entanto, essa redução não foi suficiente para que fosse possível determinar um sítio preferencial do BCP na proteína (DE; KAUR; DATTA, 2013).

A redução nos valores das constantes de ligação na presença dos fármacos pode ser devido ao fato da ligação entre o BCP e a BSA ocorrer, principalmente, por forças eletrostáticas, conforme observado nos valores das constantes termodinâmicas obtidas na seção (5.2).

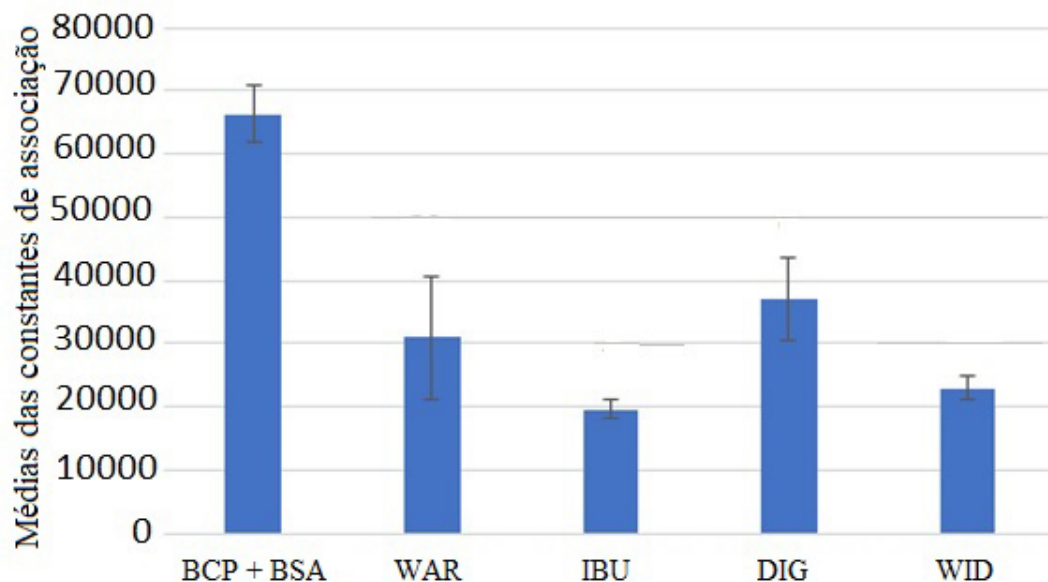
Tabela 3 – Valores médios da constante de afinidade (K_a) obtida no experimento de competição com fármacos. BCP ($12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), fármaco ($12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão PBS no pH 7,4.

Interação na BSA	Fármacos	$K_a(\times 10^4) M^{-1}$
	Sem Fármaco	$6,60 \pm 0,03$
Sítio I	Varfarina	$2,50 \pm 0,02$
Sítio II	Ibuprofeno	$1,90 \pm 0,04$
Sítio III	Digitoxina	$3,35 \pm 0,03$
	Todos os Fármacos	$1,83 \pm 0,04$

Afim avaliar os resultados, o teste estatístico de Tukey (ANOVA ou análise de variância) foi realizado para as amostras dos complexos de BCP + BSA na ausência e presença dos fármacos varfarina, ibuprofeno e mistura com estes fármacos (DRISCOLL, 1996). O valor de p calculado através do teste de Tukey foi inferior a 0.001, indicando que existe diferença estatística entre todas as amostras estudadas. A partir desses resultados, não foi possível determinar um sítio de ligação preferencial do BCP na BSA, o que pode indicar que o BCP possui afinidade por dois ou três sítios da BSA.

Na Figura 12 são apresentados os valores da média e desvio padrão das constantes de associação dos complexos com BCP + BSA na ausência e presença de fármacos competidores pelo sítio de ligação da BSA. Estas análises são muito importantes do ponto de vista da clínica médica, uma vez que se caso esses fármacos impedissem a ligação do corante na proteína, os exames de concentração plasmática de pacientes com comorbidades renais poderiam ser comprometidos e apresentarem erros.

Figura 12 – Médias e Desvio padrão das constantes de ligação (K_a) dos complexos com BCP + BSA na ausência e presença de fármacos competidores pelo sítio de ligação da BSA.



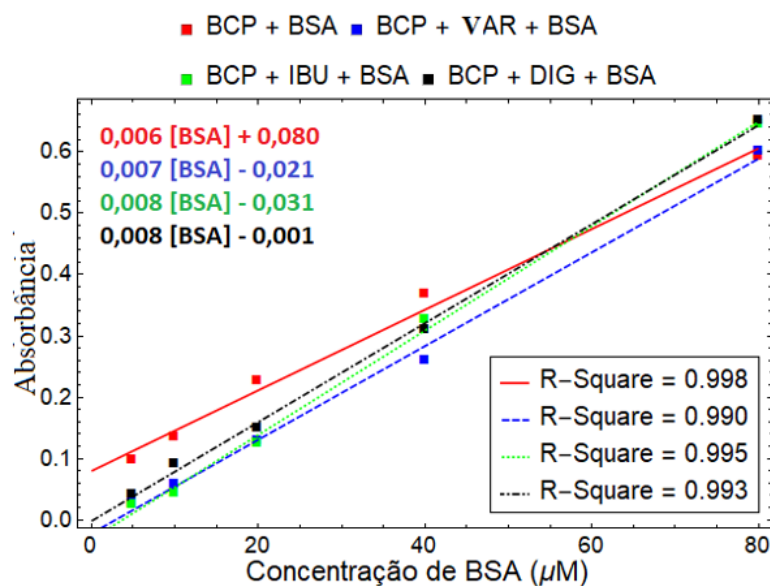
Legenda: A significância estatística do complexo de BCP + BSA em relação aos complexos de BCP + BSA com os fármacos estudados apresentou um valor de $p < 0.001$.

5.5 Curvas de Calibração do BCP

A albumina em fluidos biológicos pode ser determinada com procedimentos imunológicos, como ensaio eletroimunoensaio, imunodifusão radial, imunonefelometria, radioimunoensaio. Os métodos são específicos e sensíveis, mas não são adequados para uso rotineiro porque são lentos, caros e difíceis de automatizar. Na maioria dos laboratórios de química clínica, a albumina é medida, rotineiramente, com técnicas de ligação de corante (CHRISTOPOULOS; DIAMANDIS, 1986).

Nesse contexto, decidimos fazer um estudo das curvas de calibração do BCP na presença e ausência de fármacos com intuito de simular os exames realizados na clínica médica e também averiguar se a presença dos fármacos realmente não impediu a ligação do BCP na BSA. Com base nisso, as curvas de calibração do corante BCP, na ausência e presença dos fármacos foram analisadas nas concentrações de 5, 10, 20, 40 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A Figura 13 apresenta os valores de absorvância medidas em 600 nm das amostras anteriormente citadas. Os valores de *R-Square* calculados foram superiores a 0,990, o que indica uma ótima correlação linear para esses ajustes. Além disso, as curvas de calibração parecem indicar que não existe diferença entre as curvas analisadas (Figura 13).

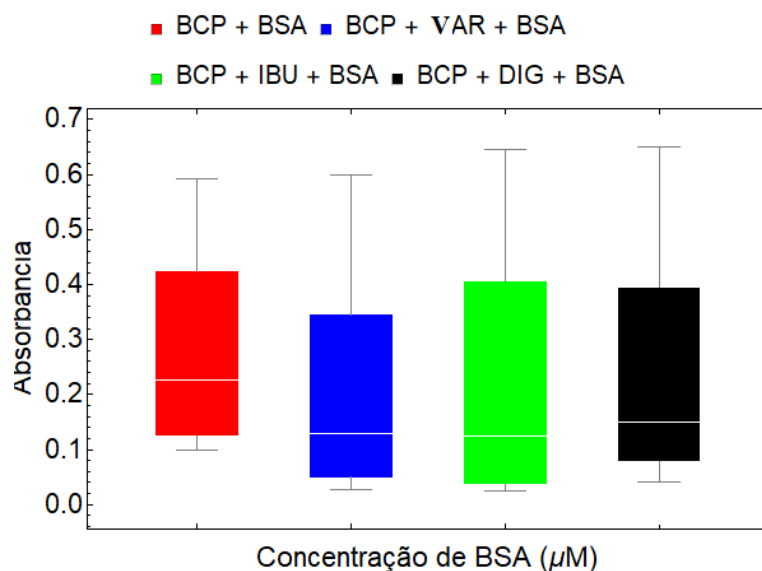
Figura 13 – Curvas de calibração do complexo BCP-BSA, na ausência e presença de fármacos



Legenda: BCP ($12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), Fármacos $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e BSA $10-80 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato, pH 5,4 a 25°C .

Na Figura 14 é apresentado o box-plot com informações sobre as médias, medianas e desvio padrão do complexo BCP-BSA na ausência e presença de fármacos.

Figura 14 – Box-plot dos valores de absorbância medidos nas diferentes concentrações de BSA nos complexos estudados.



Baseado no box-plot da Figura 14 foi possível notar que não houve uma variação significativa nos dados. Isso pode ser comprovado pela dispersão, que corresponde à diferença entre o primeiro e terceiro quartis (extremidades dos retângulos). Além disso,

as medianas presentes nas linhas centrais dos quartis indicam que a distribuição dos dados é assimétrica, ou seja, os valores de médias, medianas e moda não são coincidentes.

A partir disso, um teste estatístico de comparação de variâncias ou de Bartlett (quando existem mais de duas amostras homogêneas) foi realizado, afim de avaliar diferenças estatísticas entre essas curvas (BARTLETT, 1936). O teste de Bartlett é utilizado para testar se as variâncias dos grupos são homogêneas e se baseiam nas seguintes equações:

$$B = \frac{M}{C} \quad (5.4)$$

$$M = \sum_{i=1}^{\alpha} (n_i - 1) \ln(s_c^2) - \sum_{i=1}^{\alpha} (n_i - 1) \ln(s_i^2) \quad (5.5)$$

$$C = 1 + \frac{1}{3(\alpha - 1)} \left[\sum_{i=1}^{\alpha} \frac{1}{n_i - 1} - \frac{1}{\sum_{i=1}^{\alpha} n_i - 1} \right] \quad (5.6)$$

onde:

- n_i consiste no número de repetições do grupo i ;
- α é o número de tratamentos;
- s_i^2 é a variância do tratamento i ;
- s_c^2 é a variância conjunta calculada por:

$$s_c^2 = \frac{\sum_{i=1}^{\alpha} (n_i - 1) s_i^2}{\sum_{i=1}^{\alpha} (n_i - 1)} \quad (5.7)$$

O valor de P (p-value) é calculado pela relação:

$$P - Valor = P[X_{(K-1)}^2 > B_0 | H_0] \quad (5.8)$$

onde, a Hipótese (H_0) corresponde a $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2$. Na hipótese (H_1) pelo menos um σ_i^2 é diferente, $i = 1, \dots, k$.

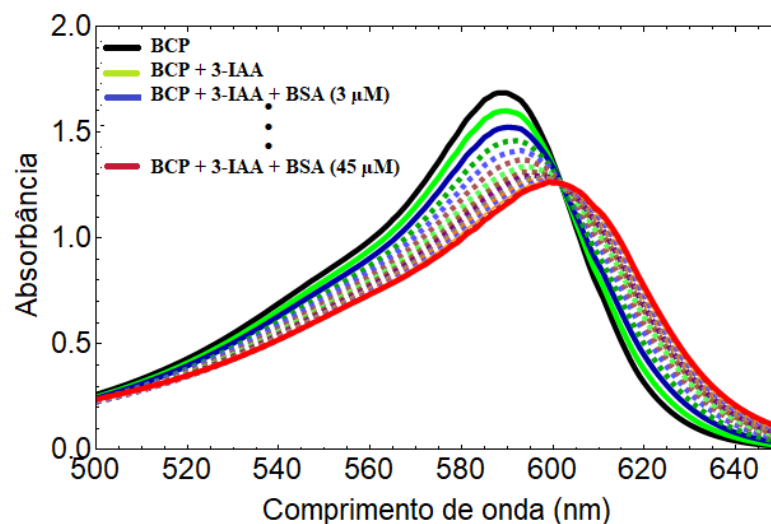
O valor de p foi calculado a partir dessas equações. O $p - value$ encontrado foi de $0,87 > 0,05$. Este resultado mostrou que não existe diferença estatística entre as curvas de calibração estudadas. Do ponto de vista da interação BCP-BSA, esse resultado pode indicar que a presença dos fármacos não impediu a ligação do BCP na BSA.

5.6 Estudo do complexo BCP-BSA na presença do composto urêmico 3-IAA e determinação da constante de associação

Na fase terminal dos pacientes com insuficiência renal crônica (IRC), em que predominam sinais e sintomas da uremia (síndrome urêmica), ocorre um distúrbio metabólico

causado pela presença de inúmeras toxinas que se acumulam progressivamente comprometendo múltiplos órgãos e sistemas fisiológicos (ARRIZURIETA, 2001). O termo uremia significa urina no sangue, indicando que certas substâncias, normalmente excretadas na urina, são retidas na circulação. Nesse contexto, avaliamos se a presença do composto urêmico pode impedir a ligação de BCP na BSA (Figura 15).

Figura 15 – Espectro de absorção do complexo BCP + 3-IAA + BSA.



Legenda: BCP ($12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), 3 – IAA ($12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e BSA ($3\text{-}72 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão PBS, pH 7,4 a 25°C

A partir dos espectros da Figura 15, não foi possível verificar nenhum deslocamento no espectro da interação entre BCP e BSA na presença da toxina 3-IAA. A constante de afinidade dessa interação foi calculada a partir da Equação 4.2, o que resultou no valor de $K_a = (3,30 \pm 0,02) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Com base nesses resultados, verificou-se uma redução de aproximadamente 50% na capacidade de ligação entre BCP e BSA com a interação desse composto urêmico. No entanto, essa redução não foi capaz de impedir a ligação, o que é muito importante para os pacientes com IRC, caso contrário poderia comprometer as medidas de concentração plasmática de BSA nesses pacientes, o que poderia comprometer o diagnóstico e tratamento dos pacientes com IRC.

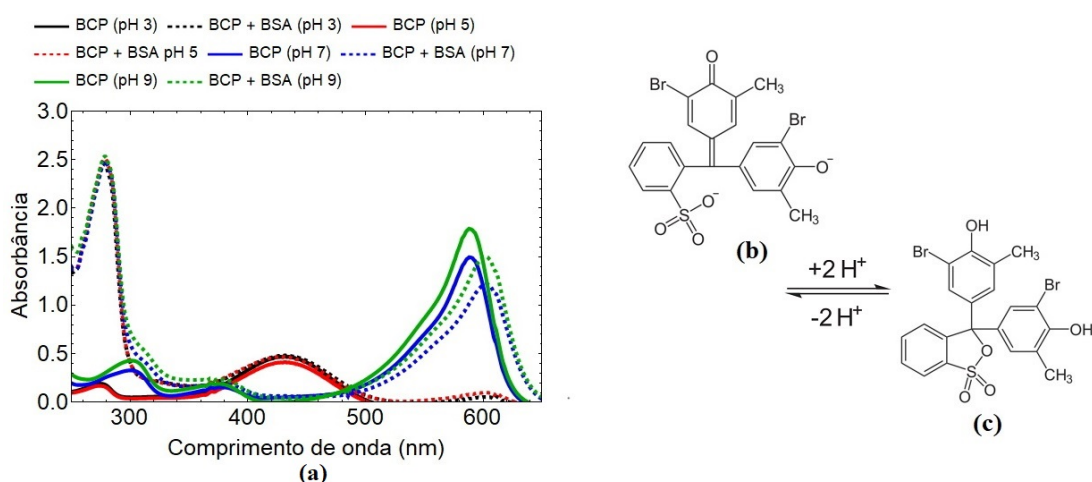
5.7 Estudo do efeito do pH no corante BCP e na interação entre BCP e BSA

Na Figura 16 (a) apresentou-se os espectros de absorbância do BCP e do complexo BCP + BSA para os valores de pH 3, pH 5, pH 7 e pH 9, na faixa de absorção ajustada entre 250-600 nm. Conforme os espectros da Figura 16, notou-se uma banda de absorção com máximo em 280 nm, somente para os espectros do complexo BCP + BSA, indicando

que esse máximo é característico do triptofano existente na BSA. Também foi verificado os espectros de absorção de BCP no pH 3 e pH 5 apresentaram uma banda de absorção com máximo no intervalo entre 400-500 nm, porém não obtiveram picos de absorção entre 590-650 nm e uma mudança de coloração para o amarelo. Isto indica que a estrutura fechada do BCP (Figura 16 (c)) pode ser predominante nesses valores de pH. Por outro lado, a análise de BCP e do complexo BCP + BSA também mostrou que ambos apresentaram uma banda absorção com máximo entre 590-650 nm e uma mudança de cor para o roxo. Essa mudança de cor sugere a estrutura aberta do BCP (Figura 16 (b)) é predominante.

A mudança de cor de um complexo BCP-HSA devido a uma reação de troca de prótons foi verificada através do experimento de pH-dependente presente na Figura 16 (a). De acordo com Ito, quando o BCP se liga a HSA, a mudança na cor da solução aquosa é semelhante à esperada de uma mudança de pH (ITO; YAMAMOTO, 2010). No entanto, os espectros de absorção dos complexos BCP-HSA diferem do BCP em soluções aquosas.

Figura 16 – Espectro de absorção UV-Vis do BCP e do complexo BCP-BSA em diferentes valores de pHs.



Legenda: BCP ($12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e BSA ($72 \mu\text{mol L}^{-1}$), pH 7,4 a 20°C .

5.8 Estudos solvatocrômicos do corante Púrpura de Bromocresol (BCP)

O efeito solvatocrômico descreve as mudanças na posição da banda de absorção na região do UV-vis, que acompanha uma mudança de polaridade do meio. Um deslocamento para os menores comprimentos de onda (ou maiores energias) com o aumento da polaridade é conhecido como deslocamento hipsocrômico (ou deslocamento para o azul), o que caracteriza um solvatocromismo negativo. Já o deslocamento para os maiores comprimentos de onda (ou menores energias) é conhecido como deslocamento

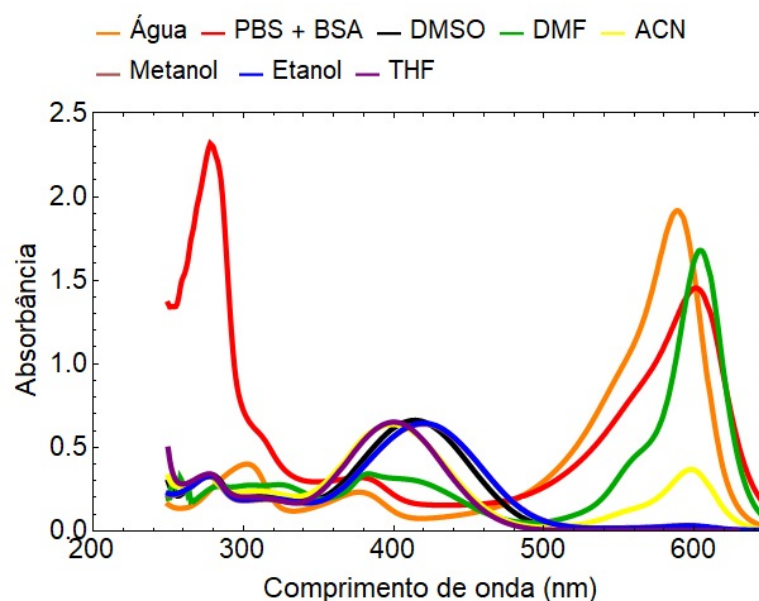
batocrômico (ou deslocamento para o vermelho), o que caracteriza um solvatocromismo positivo (LEWKOWICZ et al., 2019).

A partir disso, investigou-se o efeito do solvatocromismo nos espectros de absorção UV-vis do BCP à uma concentração de $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes solventes. Estes foram selecionados de acordo com as diferentes polaridades dos mesmos e divididos em polares próticos e polares apróticos (Tabela 5). Os resultados dos espectros de absorbância são apresentados na Figura 17 e mostram um deslocamento no comprimento de onda máximo do BCP em função do solvente utilizado, evidenciando sua característica solvatocrômica. Os solventes utilizados no estudo foram o tampão PBS (Água), acetonitrila (ACN), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e o tetraidrofurano (THF), metanol e etanol.

Tabela 4 – Solventes utilizados nesse estudo classificados em próticos e apróticos.

Classificação	Solventes
Prótico	Água (PBS)
Aprótico	DMSO
Aprótico	DMF
Aprótico	ACN
Prótico	Metanol
Prótico	Etanol
Aprótico	THF

Figura 17 – Espectros de absorção UV-vis do BCP em diferentes solventes.



Legenda: $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BCP e BSA $72 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS, pH 7,4 a 20°C .

A partir dos espectros gerados foi possível verificar duas bandas de absorção, com máximo em 421 nm e 604 nm. Foi observado uma variação expressiva na posição da segunda banda do espectro (na região de 604 nm) com os diferentes solventes. Entretanto é possível observar uma redução da absorbância nessa banda com o aumento da polaridade do solvente (deslocamento batocrômico). Somente os solventes acetonitrila (ACN) e DMF apresentaram máximo de absorção na faixa de 500-650 nm, que consiste na faixa de absorção do BCP no pH fisiológico (PBS), com o DMF apresentando pico similar ao BCP + BSA.

Sabe-se que a absorção de radiação eletromagnética na região do ultravioleta e visível provoca excitações eletrônicas, sendo as transições n ou π para o estado excitado π^* as mais relevantes em moléculas orgânicas. Nestes casos, a absorção de radiação faz com que elétron, sejam promovidos de um orbital ocupado para um orbital não ocupado de menor energia. Em outras palavras, a transição mais provável é do mais alto orbital molecular ocupado para o mais baixo orbital molecular desocupado. Sendo assim, podemos observar que existe a relação ao tipo de transição eletrônica que explicaria as duas bandas presentes nos diversos solventes.

Tudo indica que a primeira banda localizada em 421 nm seja $\pi \rightarrow \pi^*$ pois além de menor comprimento de onda, possui maior intensidade, característico do HOMO. Enquanto que na segunda banda de absorção pode ser $n \rightarrow \pi^*$ que geralmente possui menor intensidade e maior comprimento de onda. A partir disso, a Tabela 6 apresenta os valores da constante dielétrica, do comprimento de onda máximo e seus respectivos valores de absorbância correspondente ao BCP em diferentes solventes e BCP ligado à BSA no solvente PBS.

Tabela 5 – Valores de constante dielétrica (ϵ), do comprimento de onda máximo (λ_{max}) e seus respectivos valores de absorbância (Abs_{max}) correspondente ao BCP em diferentes solventes e BCP ligado à BSA no solvente PBS.

Solventes	ϵ	$\lambda_{max}(nm)$	Abs_{max}
(BCP+PBS)+BSA	80	601	1,90
BCP + PBS	80	689	1,45
BCP + DMSO	46,7	585	0,65
BCP + DMF	38	604	1,70
BCP + ACN	37,5	399	0,65
BCP + Metanol	33	420	0,65
BCP + Etanol	25,7	420	0,65
BCP + THF	7,5	400	0,65

Com base nos resultados apresentados na Tabela 6, é possível verificar um deslocamento batocrômico e hipocrômico dos espectros de BCP com o aumento da polaridade dos solventes, o que reforça a teoria de que o deslocamento para o maior

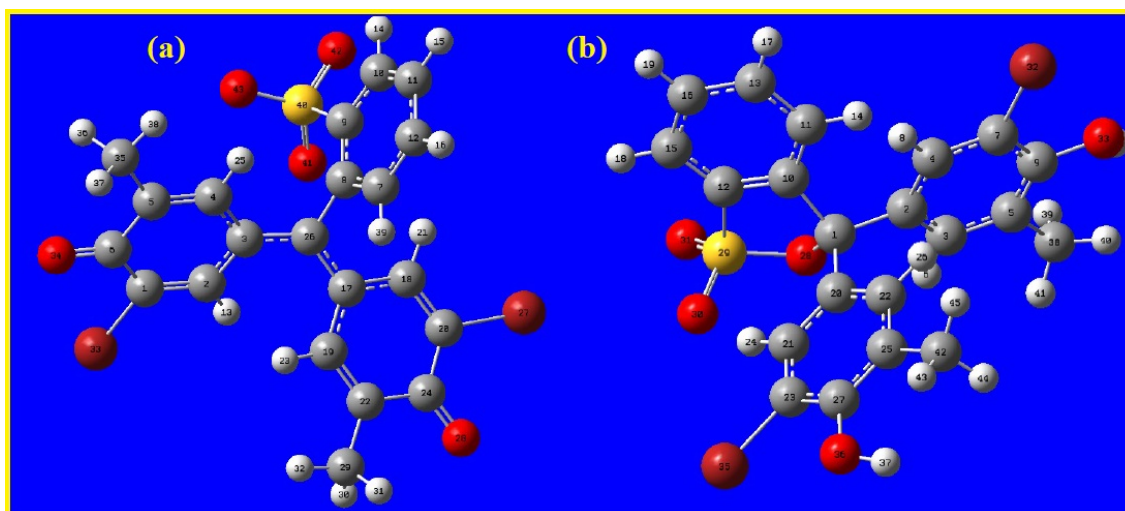
comprimento de onda do espectro de BCP na presença de BSA pode ser proveniente dos efeito de solvatocromismo no BCP e da interação hidrofóbica e eletrostática entre BCP e BSA.

5.9 Estudos Teóricos da conformação do BCP e de seus espectros de absorbância em diversos solventes

5.9.1 Otimização ab initio da molécula de BCP via DFT

A conformação geométrica do BCP foi otimizada usando o conjunto de base 6-311+G (3df,2p) e o funcional PBE0, devido ao fato desse corante apresentar metais pesados em sua estrutura, bem como o átomo de bromo. Na Figura 18 é apresentado a conformação de BCP otimizada via DFT para a forma desprotonada (aberta) do BCP.

Figura 18 – Conformações de menor energia da forma protonada e desprotonada de BCP.



Legenda: Em (a) Estrutura aberta (desprotonada) de BCP. (b) Estrutura fechada (protonada) de BCP.

A partir das estruturas otimizadas do BCP nas formas aberta e fechada, foi possível obter informações sobre a geometria molecular do BCP. Esta se baseia na teoria da repulsão dos pares eletrônicos da camada de valência que considera o ângulo tridimensional máximo de afastamento possível entre os ligantes, também chamado ângulo diedros. Sendo assim, os principais valores de ângulos diedros, distância entre ângulos e distância entre as ligações nas duas formas de equilíbrio de BCP foram calculados com o intuito de comparar as estruturas aberta e fechada do BCP (Tabela 7). Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram que existe uma diferença significativa na geometria molecular das duas estruturas de BCP.

Tabela 6 – Distância entre ângulos, entre as ligações e ângulos diedros das duas estruturas de BCP

Átomos conectados	Estrutura Aberta	Estrutura Fechada
	Ligações ($\text{\AA}$)	Ligações ($\text{\AA}$)
C9-S40	1,84	1,13
S40-O40	1,49	1,18
	Ângulos ($^{\circ}$)	Ângulos ($^{\circ}$)
C8-C26-C3	118,90	110,90
C9-S40-O43	104,10	113,00
	Diedros ($^{\circ}$)	Diedros ($^{\circ}$)
C26-C8-C9-C40	-0,90	-0,20
C4-C3-C26-C17	153,40	108,30

5.9.2 Estudo teórico do espectro de absorbância do BCP em diferentes solventes

Realizamos estudos teóricos utilizando o conjunto de base PBE0/6-311++g(2d,p), para simulação dos espectros de absorção UV-VIS via TD-DFT do corante BCP nos mesmos solventes utilizados na parte experimental. Na Figura 19, 20 e 21 são apresentados os espectros de UV-vis de BCP em diferentes solventes para as cargas $q = 0$, $q = -1$ e $q = -2$, respectivamente.

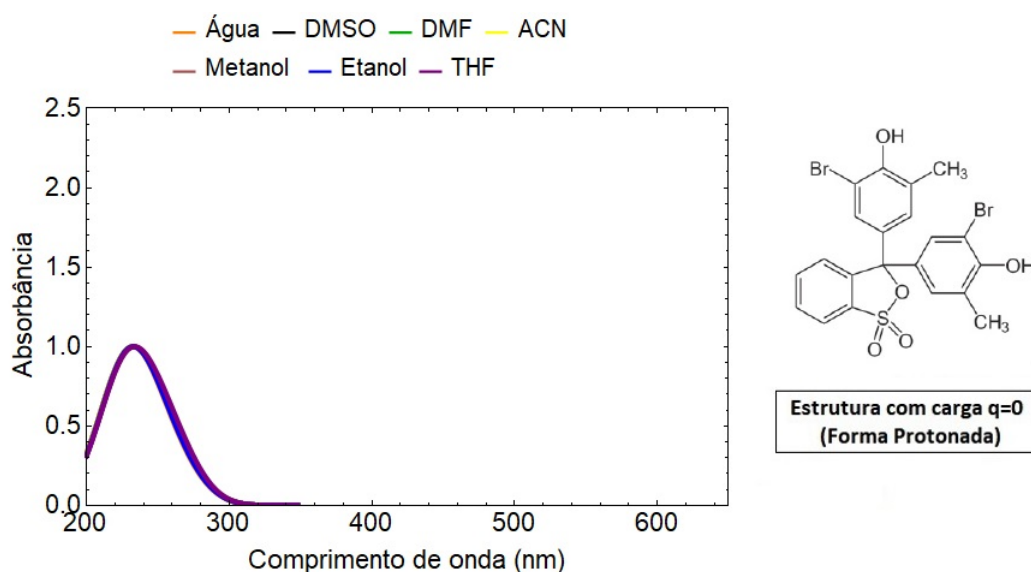
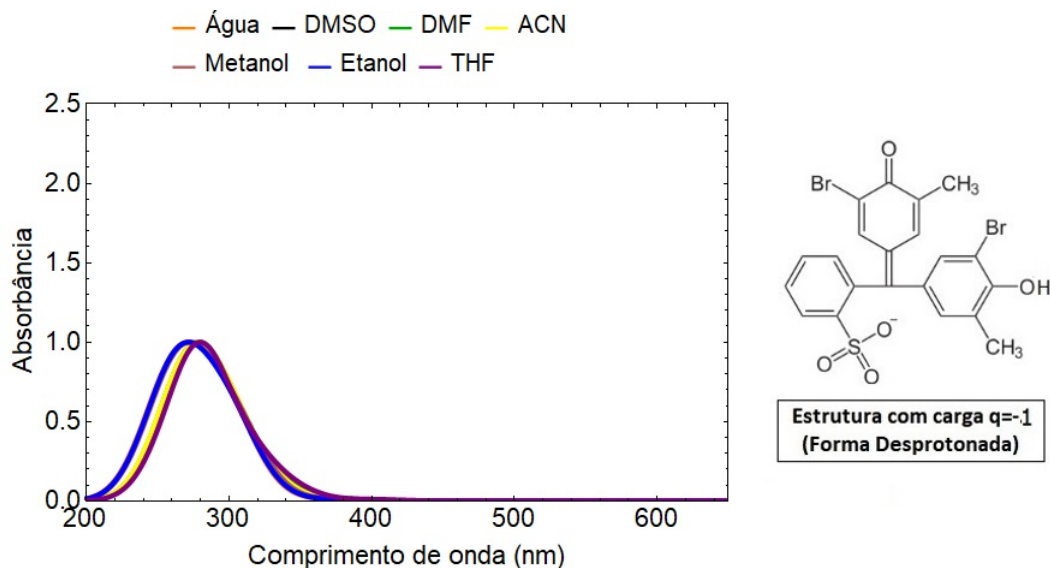
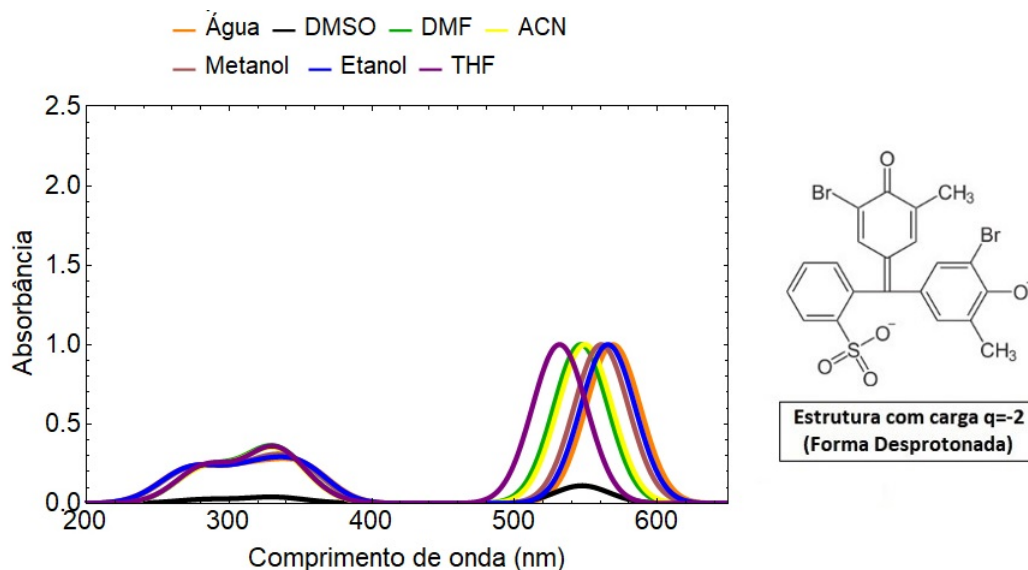
Figura 19 – Espectros teóricos de BCP em diferentes solventes ($q=0$.)

Figura 20 – Espectros teóricos de BCP em diferentes solventes ($q=-1$)Figura 21 – Espectros teóricos de BCP em diferentes solventes ($q=-2$)

Com base nos espectros de BCP obtidos em diferentes solventes e cargas foi observado que os espectros com carga ($q=-2$) são os que melhor representam os espectros da BCP em PBS, BCP + BSA em PBS, BCP em ACN e BCP em DMF. Isso indica que a molécula de BCP aberta e desprotonada é a estrutura mais presente nas amostras analisadas experimentalmente. O surgimento da banda em aproximadamente 500-650 nm se refere a transições $n-\pi^*$, similarmente como observados nos espectros experimentais. Já os espectros com cargas ($q=0$ e $q=-1$) são os que melhor representam as amostras experimentais de BCP em metanol, BCP em etanol e BCP em THF, indicando que esta se encontra, em sua grande maioria, protonada. Nota-se que na faixa de comprimento

de onda de 200 a 350 nm existe um máximo de absorção. Acreditamos que essas bandas ocorram devido as transições $\pi \rightarrow \pi^*$. Na tabela 8 são apresentados os valores experimentais e teóricos de constante dielétrica.

Tabela 7 – Valores experimentais e teóricos da constante dielétrica (ϵ), comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}) e seu respectivo valor de absorbância (Abs_{max}) dos espectros normalizados de BCP com carga q= -2 em diferentes solventes.

Solventes	Experimental			Teórico		
	ϵ	λ_{max}	Abs_{max}	ϵ	λ_{max}	Abs_{max}
(BCP+PBS)+BSA	80	601	1,90	-	-	1
BCP + PBS	80	689	1,45	80	569	1
BCP + DMSO	46,7	585	0,65	47,7	547	1
BCP + DMF	38	604	1,70	38	547	1
BCP + ACN	37,5	399	0,65	37,5	546	1
BCP + Metanol	33	420	0,65	33	546	1
BCP + Etanol	25,7	420	0,65	25,7	561	1
BCP + THF	7,5	400	0,65	7,5	532	1

Os resultados da Tabela 7 mostram que assim como no espectro de BCP experimental, no espectro de absorção teórico do BCP com carga -2 também ocorre deslocamento batocrômico e hiperacrômico com o aumento da polaridade, que é característico do efeito do solvatocromismo. No entanto, apesar do solvente DMF possuir uma condutividade elétrica maior que o do PBS (água), o seu deslocamento para o maior comprimento de onda foi mais intenso que no espectro de BCP + PBS experimental. Nesse contexto, decidimos comparar os espectros teóricos e experimentais do BCP na presença dos solventes PBS e DMF (Figuras 22 e 23).

Figura 22 – Espectros experimental e teórico de BCP no solvente Água (q = -2)

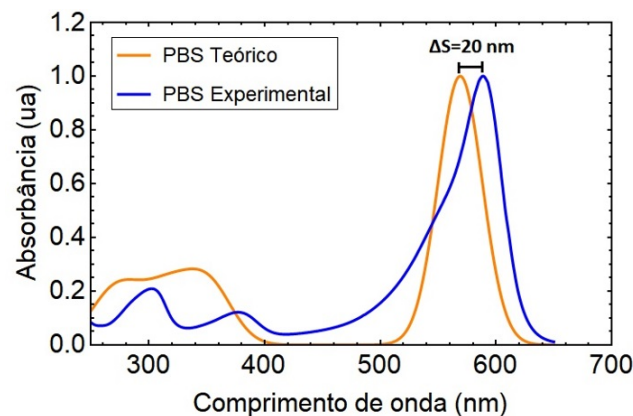
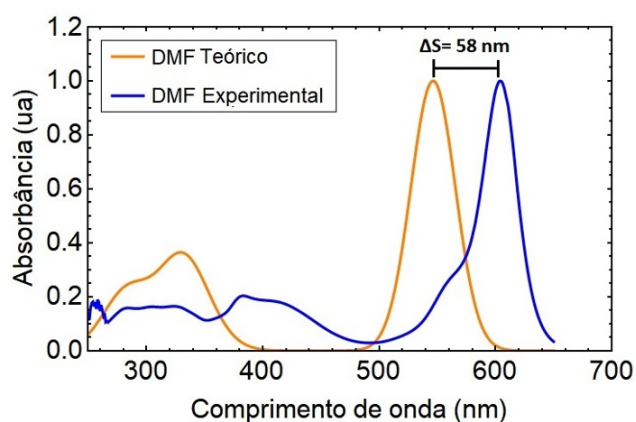


Figura 23 – Espectros experimental e teórico de BCP no solvente DMF ($q = -2$)



Os espectros experimentais e teóricos de BCP na presença de PBS são bem similares e o deslocamento de 20 nm está dentro do limite de diferenças entre os espectros, o que confirma a escolha da base e do funcional escolhido. No caso do solvente DMF, a diferença entre os espectros é razoável e pode ser decorrente dos orbitais envolvidos nessa transição de carga. Sendo assim, os resultados experimentais corroboram com os teóricos.

6 Conclusões

O espectros de absorção na região do UV-Vis entre o corante BCP e a proteína BSA mostraram a presença de um ponto isosbético. Além disto, a determinação dos parâmetros termodinâmicos evidenciou uma interação do tipo eletrostática.

Os estudos de competição envolvendo fármacos específicos para um determinado sítio da proteína através da determinação de K_a por espectroscopia de UV-Vis mostraram que a presença dos fármacos alterou a capacidade de ligação do BCP na BSA, mas não impediu que a mesma ocorresse. Este resultado foi corroborado pelo teste estatístico de Tukey (ANOVA) que mostrou que o BCP sofreu alterações em sua capacidade de ligação na presença dos diferentes fármacos, o que indica que este pode se ligar nos sítios I, II, e III da proteína, competindo assim com estes marcadores.

O box-plot do experimento da curva de calibração do complexo BCP-BSA e BCP-fármacos-BSA mostrou que não houve diferença nas médias das absorbâncias em diferentes concentrações de BSA na ausência ou presença dos fármacos, que foi corroborado pelo teste estatístico de Bartlett.

A determinação da constante de associação entre BCP e a proteína BSA na presença do composto urêmico 3-IAA mostrou que este composto não altera a capacidade de ligação do corante. Com isto, o fato do BCP conseguir se ligar na BSA mesmo na presença dos fármacos marcadores de sítio I, II e III e composto urêmico é um ótimo resultado, pois, nos testes rápidos de concentração de HSA realizados na clínica médica, a presença destas substâncias no plasma do paciente não alteraria do resultado desse teste, supondo que ambos HSA e BSA possuem características similares.

O deslocamento da banda de absorção dos espectros visíveis de BCP na presença de BSA não é decorrente do efeito do pH e sim decorrente de propriedades solvatocrômicas, comprovadas pelo efeito batocrômico da sonda em diferentes solventes (espectros experimentais e teóricos).

Os estudos experimentais e teóricos do BCP em diferentes solventes comprovaram que a forma do BCP nestes espectros é desprotonada para solventes com constante dielétrica acima de 30. Para valores de constante dielétrica abaixo disso foi observado principalmente a existência da forma protonada do BCP.

As diferenças entre os espectros de absorção teórico e experimental indicam que existe uma diferença significativa nos máximos de absorção, que pode ser decorrente do funcional utilizado ou dos orbitais envolvidos.

Referências

- AKIHISA, T. et al. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, Elsevier, v. 43, n. 6, p. 1255–1260, 1996.
- ALDRICH, S. disponível em: [http://www. sigmaaldrich. com/us-export. html](http://www.sigmaaldrich.com/us-export.html). **Citado em junho de**, 2011.
- ALLEWELL, N. et al. Bohr effect of escherichia coli aspartate transcarbamylase. linkages between substrate binding, proton binding, and conformational transitions. **Biochemistry**, ACS Publications, v. 18, n. 14, p. 3008–3015, 1979.
- ARRIZURIETA, E. E. Insuficiencia renal crónica. fisiopatología y perspectivas de tratamiento. **MEDICINA (Buenos Aires)**, v. 61, n. 5/2, p. 648–651, 2001.
- BARTHOLOMEW, R.; DELANY, A. Determination of serum albumin. **Proc. Aust. Assoc. Clin. Biochem**, v. 1, p. 214–218, 1966.
- BARTLETT, M. The square root transformation in analysis of variance. **Supplement to the Journal of the Royal Statistical Society**, JSTOR, v. 3, n. 1, p. 68–78, 1936.
- 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**, Royal Society of Chemistry, v. 6, n. 68, p. 63463–63471, 2016.
- BOZA, I. A. F. Investigação teórica e experimental dos sítios de interação entre a albumina do soro humano (hsa) e o aminoácido dansilglicina. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2018.
- CACITA, N.; NIKOLAOU, S. Studying the interaction between trinuclear ruthenium complexes and human serum albumin by means of fluorescence quenching. **Journal of Luminescence**, Elsevier, v. 169, p. 115–120, 2016.
- CHRISTOPOULOS, T. K.; DIAMANDIS, E. P. A general method for the assay of binders. application to the potentiometric determination of albumin in human serum, plasma and whole blood. **Clinical biochemistry**, Elsevier, v. 19, n. 3, p. 151–160, 1986.
- COLMENAREJO, G.; ALVAREZ-PEDRAGLIO, A.; LAVANDERA, J.-L. Cheminformatic models to predict binding affinities to human serum albumin. **Journal of medicinal chemistry**, ACS Publications, v. 44, n. 25, p. 4370–4378, 2001.
- DE, D.; KAUR, H.; DATTA, A. Unusual binding of a potential biomarker with human serum albumin. **Chemistry–An Asian Journal**, Wiley Online Library, v. 8, n. 4, p. 728–735, 2013.
- DRISCOLL, W. C. Robustness of the anova and tukey-kramer statistical tests. **Computers & Industrial Engineering**, Elsevier, v. 31, n. 1-2, p. 265–268, 1996.
- FANALI, G. et al. Human serum albumin: from bench to bedside. **Molecular aspects of medicine**, Elsevier, v. 33, n. 3, p. 209–290, 2012.

- FRISCH, M. et al. **Gaussian 16**. [S.l.]: Gaussian, Inc. Wallingford, CT, 2016.
- GHUMAN, J. et al. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **Journal of molecular biology**, Elsevier, v. 353, n. 1, p. 38–52, 2005.
- GILBERT, T. L. Hohenberg-kohn theorem for nonlocal external potentials. **Physical Review B**, APS, v. 12, n. 6, p. 2111, 1975.
- GIORDANO, L. et al. Highly solvatochromic 7-aryl-3-hydroxychromones. **The journal of physical chemistry letters**, ACS Publications, v. 3, n. 8, p. 1011–1016, 2012.
- HIRAYAMA, K. et al. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by esims and frit-fab lc/ms. **Biochemical and biophysical research communications**, Elsevier, v. 173, n. 2, p. 639–646, 1990.
- ITO, S.; YAMAMOTO, D. Identification of two bromocresol purple binding sites on human serum albumin. **Clinica chimica acta**, Elsevier, v. 411, n. 19-20, p. 1536–1538, 2010.
- JR, T. P. **All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications**. [S.l.]: Academic press, 1995.
- 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**, Elsevier, v. 124, p. 349–356, 2014.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. [S.l.]: Springer science & business media, 2013.
- LEWKOWICZ, A. et al. Solvent dependent spectroscopic properties of fingerprint reagent-1, 8-diazafluoren-9-one. **Journal of Molecular Liquids**, Elsevier, 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**, Elsevier, v. 168, p. 69–76, 2015.
- MACHADO, C. et al. Estudos fisico-quimicos do solvatocromismo e halocromismo. 1997.
- MARTÍN-RODRÍGUEZ, A.; ARAVENA, D.; RUIZ, E. Dft approaches to transport calculations in magnetic single-molecule devices. **Theoretical Chemistry Accounts**, Springer, v. 135, n. 8, p. 1–10, 2016.
- MORALES, J. V.; VERONESE, F. J. V.; WEBER, R. Fisiopatologia e tratamento da síndrome nefrótica: conceitos atuais. **Revista HCPA. Porto Alegre. Vol. 20, n. 3 (nov. 2000), p. 290-301**, 2000.
- NAKAMARU, Y.; SATO, C. Multivariate analysis of the association of bromocresol purple anion with bovine serum albumin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, Elsevier, v. 1341, n. 2, p. 207–216, 1997.

- NAN, Z. et al. Interaction of graphene oxide with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Elsevier, v. 210, p. 348–354, 2019.
- 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**, Elsevier, v. 580, n. 2, p. 206–215, 2006.
- PAGNOUX, C. et al. Predictors of treatment resistance and relapse in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated small-vessel vasculitis: comparison of two independent cohorts. **Arthritis & Rheumatism**, Wiley Online Library, v. 58, n. 9, p. 2908–2918, 2008.
- PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. [S.l.]: Cengage Learning, 2010.
- PESCITELLI, G.; BARI, L. D.; BEROVA, N. Conformational aspects in the studies of organic compounds by electronic circular dichroism. **Chemical Society Reviews**, Royal Society of Chemistry, v. 40, n. 9, p. 4603–4625, 2011.
- PETERS, T. All about albumin: biochemistry. **Genetics, and Medical Applications (Academic Press, 1996)**, 1996.
- PINNELL, A. E.; NORTHAM, B. E. New automated dye-binding method for serum albumin determination with bromocresol purple. **Clinical chemistry**, Oxford University Press, v. 24, n. 1, p. 80–86, 1978.
- RAWEL, H. M.; MEIDTNER, K.; KROLL, J. Binding of selected phenolic compounds to proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, ACS Publications, v. 53, n. 10, p. 4228–4235, 2005.
- RODRIGUES, C. E.; TITAN, S.; WORONIK, V. Síndrome nefrótica. **Revista. Eletrônica Medicinanet. Ano**, 2012.
- ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, ACS Publications, v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1981.
- RUBIN, H. et al. Randomized, double-blind study of intravenous human albumin in hypoalbuminemic patients receiving total parenteral nutrition. **Critical care medicine**, LWW, v. 25, n. 2, p. 249–252, 1997.
- RYAN, A. J. et al. Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin. **Journal of structural biology**, Elsevier, v. 174, n. 1, p. 84–91, 2011.
- SAYLE, R.; BISSELL, A. Rasmol: a program for fast realistic rendering of molecular structures with shadows. In: **Proceedings of the 10th Eurographics UK**. [S.l.: s.n.], 1992. v. 92, p. 7–9.
- 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**, Elsevier, v. 188, p. 460–464, 2017.

- SKOOG, D. Holler. fj; nieman, ta. **Principles of Instrumental Analysis**, v. 5, 2002.
- SOUZA, A. R. d. et al. Elucidation of the induced chirality of dansylglycine by its interaction with human serum albumin. **Química Nova**, Soc Brasileira Química, p. 135–142, 2019.
- SUDLOW, G.; BIRKETT, D.; WADE, D. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular pharmacology**, ASPET, v. 11, n. 6, p. 824–832, 1975.
- SUGIO, S. et al. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein engineering**, Oxford University Press, v. 12, n. 6, p. 439–446, 1999.
- SURYAWANSHI, V. D. et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Elsevier, v. 6, n. 1, p. 56–63, 2016.
- 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**, Elsevier, v. 212, p. 15–24, 2019.
- YAMASAKI, K. et al. Characterization of site i on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, Elsevier, v. 1295, n. 2, p. 147–157, 1996.
- ZHANG, H.-X. et al. Studies on the interaction of tricyclazole with β -cyclodextrin and human serum albumin by spectroscopy. **Journal of fluorescence**, Springer, v. 16, n. 3, p. 287–294, 2006.

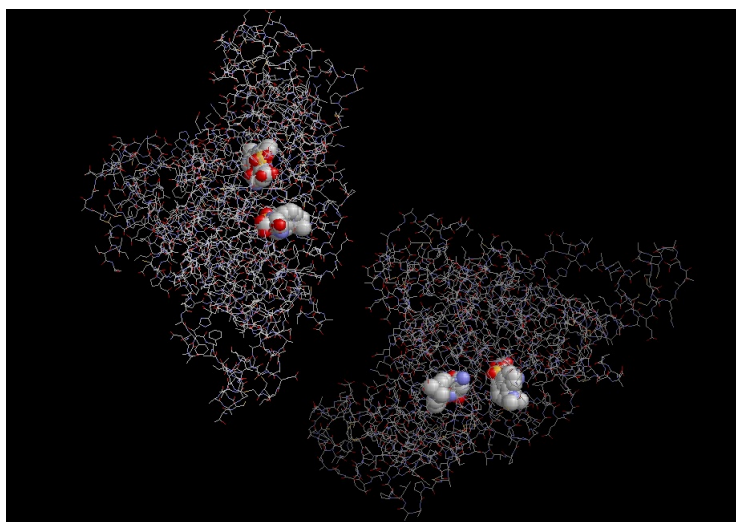
A APÊNDICE

A.1 Automatização do processo de obtenção de coordenadas atômicas no processo de construção de modelos exatos para pré-cálculos de Simulação Computacional

A obtenção de coordenadas cartesianas do ligante em uma proteína fornecem informações sobre a conformação real do ligante em uma proteína. Para a realização de cálculos de DFT, TD-DFT e outros cálculos da interação proteína-ligante, em especial a interação de albumina com fármacos, aminoácidos dansilados e outros ligantes, é necessário que os cálculos sejam realizados somente com as coordenadas atômicas do ligante, devido ao custo computacional. Para a realização dos cálculos de SM, existe um banco de dados no site do Protein Data Bank (PDB, 2020), que contém as estruturas cristalográficas de proteínas com centenas de ligantes.

No entanto, um dos maiores problemas de albuminas-ligantes consiste no fato de tanto a HSA, quanto a BSA possuem milhares de átomos e podem possuir mais de uma cadeia e fazer isso de forma manual demanda muito tempo. Por isso, a automatização desse processo para a construção de modelos exatos é fundamental. Na Figura 24, estão presentes o complexo de HSA - dansil-L-asparagina. As moléculas destacadas corresponde a dansil-L-asparagina, que aparentemente, se liga em mais de um sítio da HSA. Também é possível notar que a HSA possui mais de uma cadeia. Portanto, a obtenção manual do ligante seria muito custosa.

Figura 24 – Visualização da interação entre HSA e a dansil-L-Asparagina no programa Rasmol. (Código PDB: 2xvu).



As informações estruturais sobre proteínas estão disponíveis na bases de dados do Protein Data Bank (PDB, 2019). Na Tabela A9 estão descritos os nomes dos fármacos e aminoácidos dansilados que se ligam na HSA, os códigos, símbolos do ligante e número de sítios que esse ligante se liga na HSA.

Tabela A.8 – Siglas, símbolo do ligante e número de sítios identificados nos complexos da HSA com fármacos e amino-ácidos do site PDB.

Nome do Ligante	Código	Símbolos do ligante	Quantidade de Sítios
CMPF	<i>2bxa</i>	C1F	2
Dansil-L-asparagina	<i>2xvu</i>	9DN	2
Dansil-L-sarcosina	<i>2xvq</i>	9DS	1
Dansil-L-fenilalanina	<i>2xw0</i>	9NF	2
Dansil-L-norvalina	<i>2xw1</i>	9NV	1
Ibuprofeno	<i>2bxg</i>	IBP	2
Azapropazona	<i>2bx8</i>	AZQ	2
Diazepan	<i>2bxf</i>	DZP	1
Naproxeno	<i>2vdb</i>	NPS e DKA	2
Miristato e Aspirina	<i>2i2z</i>	MYR e SAL	1
Dansil-L-glutamato	<i>2xsi</i>	9NE e MYR	1
Dansil-L-arginina	<i>2xvw</i>	9NR e MYR	2

Os arquivos selecionados foram visualizados no programa Rasmol (Figura 25). Após a visualização desses arquivos, as valências dos átomos desses arquivos foram completadas com a adição de átomos de hidrogêncios no programa GAUSSVIEW 5.0 (Figura 26).

Figura 25 – Complexo de HSA com o aminiácido dansil-L-asparagina (2xvu). O complexo a cima contém cerca de 8083 átomos.

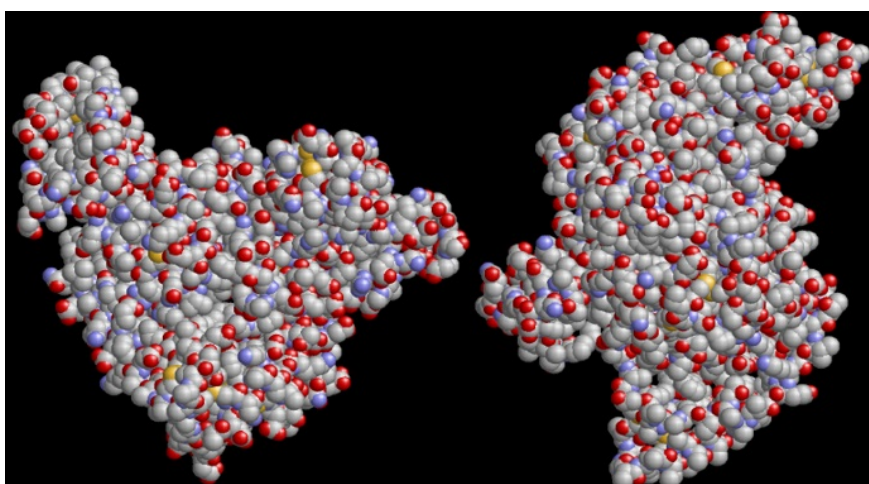
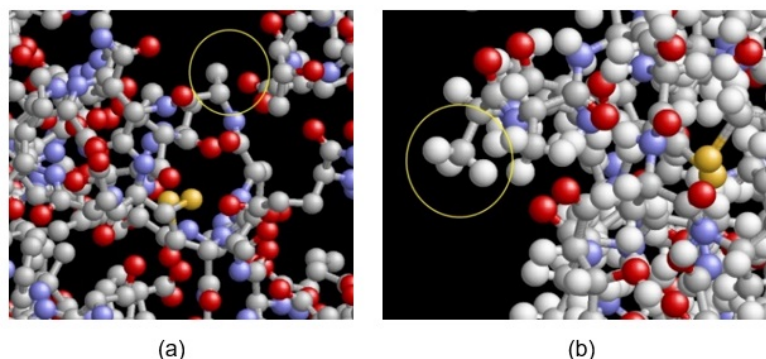
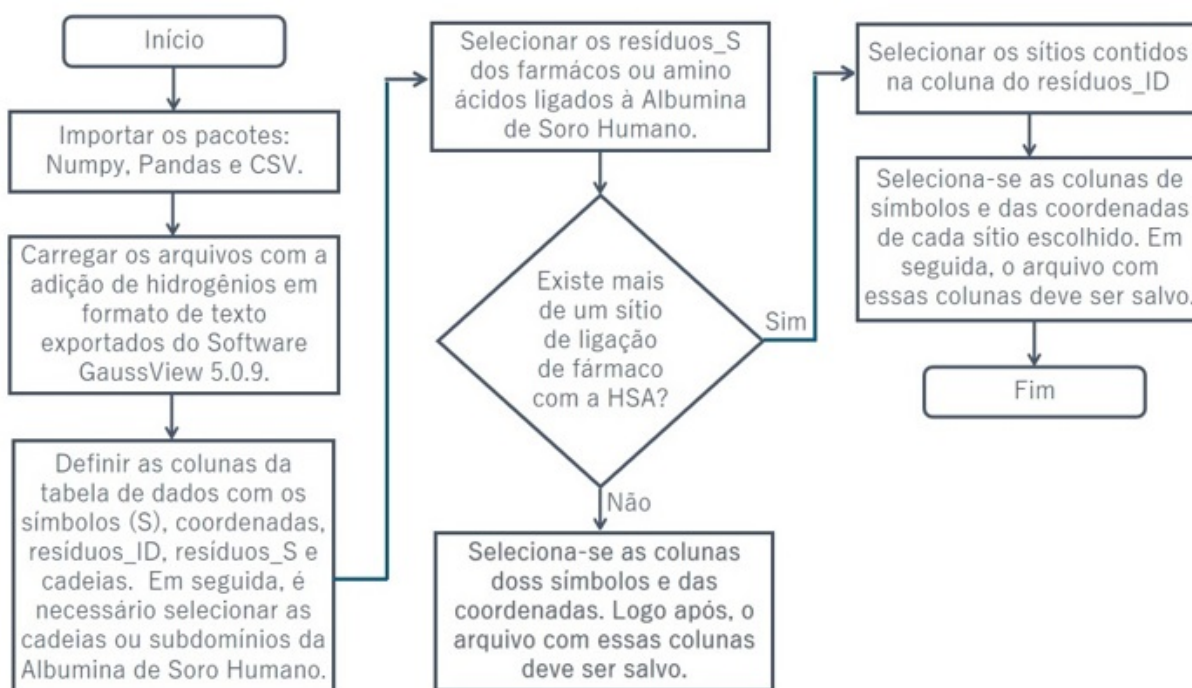


Figura 26 – Complexo de HSA com o aminiácido dansil-L-asparagina (2xvu). (a) Valência incompleta e (b) Valência completa após a adição de hidrogênio.



A instalação do programa PYTHON e da ferramenta interativa JUPYTER NOTEBOOK foi realizada através da página de internet da Anaconda (Anaconda, 2019). Para a execução dos algoritmos para a automatização do processo de obtenção das coordenadas atômicas dos ligantes da HSA, o comando “jupyter notebook” foi executado no terminal de comando do computador e os algoritmos utilizados nessa metodologia são descritos pelo Fluxograma apresentado na Figura 27

Figura 27 – Fluxograma para a automatização do processo de obtenção das coordenadas dos ligantes da HSA no programa PYTHON.



A obtenção de coordenadas atômicas dos ligantes de HSA e de outras proteínas é muito importante para o estudo de simulações computacionais, principalmente em cálculos

teóricos baseados em DFT e TD-DFT, pois essas coordenadas fornecem informações de qual conformação os fármacos, aminoácidos dansilados, corantes e outras moléculas se ligam nos sítios de uma proteína. Nesse estudo, nós estudamos fármacos e aminoácidos dansilados se ligando na HSA como modelo para qualquer interação proteína-ligante.

A partir dos arquivos em PDB da página da internet do Protein Data Bank, as camadas de valência foram completadas pelo GaussView e as colunas com as informações necessárias para o estudo foram selecionadas. No programa Python, as informações dos arquivos foram processadas e os algoritmos da Figura ?? foram executados para a seleção da cadeia de interesse.

A partir dos arquivos em PDB da página da internet do Protein Data Bank, as camadas de valência foram completadas pelo GaussView e as colunas com as informações necessárias para o estudo foram selecionadas. No programa Python, as informações dos arquivos foram processadas e os algoritmos da Figura 28 foram executados para a seleção da cadeia de interesse.

Figura 28 – Algoritmos no programa Python para a seleção da cadeia de interesse (Código PDB: 2xvu)

- Instalar os seguintes pacotes

```
In [1]: import pandas as pd # Manipular dados no formato de tabelas
import numpy as np # Manipular dados no formato de matrizes
import csv # Manipular dados com extensão "arquivo. txt" e "arquivo.csv"
```

- Carregar os arquivos, nomear as colunas e imprimir a tabela de dados

```
In [2]: PDB = pd.read_csv('2xvu.txt', sep="\t", header=None) # Carregar arquivos
PDB.columns = ['Símbolos_S', 'X', 'Y', 'Z', 'PDB_Resíduo_ID', 'PDB_Resíduo_S', 'Cadeias_ID']
# Nomear cada coluna
PDB # Imprime a tabela de dados (Opcional)
```

```
Out[2]:
```

	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
0	N	-18.139000	-15.529000	25.722	A_5_SER	SER	A
1	C	-18.097000	-14.066000	25.428	A_5_SER	SER	A
2	C	-16.842000	-13.677000	24.659	A_5_SER	SER	A
3	O	-15.761000	-13.506000	25.235	A_5_SER	SER	A

- Selecionar uma ou mais cadeias

```
In [3]: sel_cad_PDB=PDB[PDB['Cadeias_ID'] == 'A'] # Seleciona os dados referentes a cadeia escolhida.
sel_cad_PDB #Imprime os dados (Opcional)
```

```
Out[3]:
```

	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
0	N	-18.139000	-15.529000	25.722	A_5_SER	SER	A
1	C	-18.097000	-14.066000	25.428	A_5_SER	SER	A
2	C	-16.842000	-13.677000	24.659	A_5_SER	SER	A

A Figura 29 apresenta os algoritmos para a seleção das coordenadas dos ligantes e identificação de quantos sítios o ligante interage com a proteína e os algoritmos para a seleção das coordenadas do ligante nos sítios da proteína.

Figura 29 – Seleção do ligante, identificação de quais sítios o ligante se liga na HSA e seleção no sítio de interesse (Código PDB: 2xvu)

• Selecionar o PDB_Resíduo_S

```
In [9]: Residuo_s=sel_cad_PDB[sel_cad_PDB[ 'PDB_Resíduo_S' ].str.contains( '9DN' )]
Residuo_s # Imprime todas as linhas com símbolo: "9DN" (Opcional)
```

```
Out[9]:
```

	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
8231	N	5.906000	-9.177000	5.598000	A_2001_9DN	9DN	A
8232	C	5.308000	-8.109000	4.784000	A_2001_9DN	9DN	A
8233	C	5.960000	-7.848000	3.416000	A_2001_9DN	9DN	A
8234	O	7.255000	-7.948000	3.308000	A_2001_9DN	9DN	A
8235	C	5.256000	-6.805000	5.636000	A_2001_9DN	9DN	A

• Sítio 1

```
In [12]: sitio_1=sel_cad_PDB[sel_cad_PDB[ 'PDB_Resíduo_ID' ].str.contains( 'A_2001_9DN' )]
# Selecionar o sítio 1
sitio_1 #Imprimir valores
```

```
Out[12]:
```

	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
8231	N	5.906000	-9.177000	5.598000	A_2001_9DN	9DN	A
8232	C	5.308000	-8.109000	4.784000	A_2001_9DN	9DN	A
8233	C	5.960000	-7.848000	3.416000	A_2001_9DN	9DN	A
8234	O	7.255000	-7.948000	3.308000	A_2001_9DN	9DN	A

• Sítio 2

```
In [14]: sitio_2=sel_cad_PDB[sel_cad_PDB[ 'PDB_Resíduo_ID' ].str.contains( 'A_2002_9DN' )]
# Selecionar sítio 2
sitio_2 #Imprimir os dados
```

```
Out[14]:
```

	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
8256	N	7.284000	1.325000	-17.176000	A_2002_9DN	9DN	A
8257	C	7.291000	2.283000	-18.283000	A_2002_9DN	9DN	A
8258	C	5.926000	2.697000	-18.860000	A_2002_9DN	9DN	A

```
In [15]: sit_2=sitio_2.iloc[:,0:4] # Selecionar os símbolos e coordenadas
sit_2.to_csv('2xvu_sitio2_dansil_asparagina',index=False, sep=" ") #Salvar
```

AS figuras 30 e 31 apresentam, respectivamente, a visualização, no software Rasmol de uma cadeia da HSA com os ligantes presentes nos sítios selecionados e o ligante Dansil-L-asparagina selecionado no sítio escolhido.

Figura 30 – Identificação das coordenadas de Dansil-L- asparagina que interagem com dois sítios de ligação da HSA.

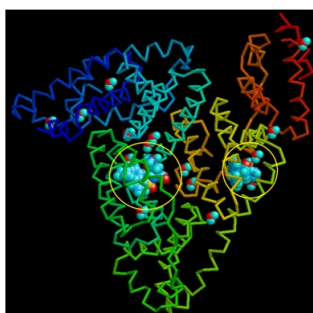
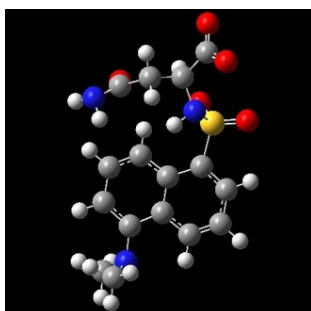


Figura 31 – coordenadas com átomos e coordenadas atômicas da Dansil-L-asparagina em um dos sítios da HSA.



Na Tabela A10 temos um trecho das coordenadas obtidas do ligante, como exemplo da eficiência do algoritmo. Logo, basta copiar todas as coordenadas obtidas no algoritmo para fazer cálculos de simulação computacional. Portanto, foi possível perceber que os algoritmos da base de dados são importantes para automatização e diminuição de tempo para preparação dos dados para os cálculos de dinâmica molecular, e química quântica.

Tabela A.9 – Símbolos dos átomos e coordenadas da molécula de dansil-L-asparagina no sítio 1.

Átomos	coordenadas X	coordenadas Y	coordenadas Z
N	5.906	-9.177	5.598
C	5.308	-8.109	4.784
C	5.96	-7.848	3.416
O	7.255	-7.948	3.308
C	5.256	-6.805	5.636
C	4.047	-6.747	6.573
O	3.015	-7.416	6.354
N	4.155	-5.943	7.634
O	5.285	-7.552	2.439
S	5.33	-10.72	5.488
O	3.958	-10.636	5.085
O	6.228	-11.406	4.591
N	4.27	-12.164	12.036
C	5.459	-11.491	7.153
C	6.407	-12.494	7.325
C	6.58	-13.15	8.58
C	5.806	-12.796	9.658
C	4.799	-11.771	9.582

A.2 Algoritmos

Algoritmo para pré-cálculo do complexo de Albuma Sérica Humana (HSA) com fármacos e Aminoácidos

Exemplo com arquivo em PDB- 2XVU

- Instalar os seguintes pacotes

In [1]:

```
import pandas as pd # Manipular dados no formato de tabelas
import numpy as np # Manipular dados no formato de matrizes
import csv #Manipular dados com extensão "arquivo. txt" e "arquivo.csv"
```

- Carregar os arquivos, nomear as colunas e imprimir a tabela de dados

In [6]:

```
PDB = pd.read_csv('2xvu.txt', sep="\t", header=None) # Carregar arquivos
PDB.columns = ['Símbolos_S ', 'X', 'Y', 'Z', 'PDB_Resíduo_ID', 'PDB_Resíduo_S', 'Cadeias_ID']
# Nomear cada coluna
PDB # Imprime a tabela de dados (Opcional)
```

Out[6]:

	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
0	N	-18.139000	-15.529000	25.722	A_5_SER	SER	A
1	C	-18.097000	-14.066000	25.428	A_5_SER	SER	A
2	C	-16.842000	-13.677000	24.659	A_5_SER	SER	A
3	O	-15.761000	-13.506000	25.235	A_5_SER	SER	A
4	C	-18.157000	-13.256000	26.714	A_5_SER	SER	A
5	O	-17.867000	-11.899000	26.444	A_5_SER	SER	A
6	N	-17.013000	-13.518000	23.350	A_6_GLU	GLU	A
7	C	-15.930000	-13.167000	22.444	A_6_GLU	GLU	A
8	C	-15.214000	-11.881000	22.834	A_6_GLU	GLU	A
9	O	-13.989000	-11.804000	22.746	A_6_GLU	GLU	A
10	C	-16.478000	-13.058000	21.023	A_6_GLU	GLU	A
11	C	-15.422000	-12.916000	19.953	A_6_GLU	GLU	A
12	C	-14.378000	-14.004000	20.025	A_6_GLU	GLU	A
13	O	-14.757000	-15.170000	20.258	A_6_GLU	GLU	A
14	O	-13.180000	-13.698000	19.837	A_6_GLU	GLU	A
15	N	-15.968000	-10.877000	23.271	A_7_VAL	VAL	A
16	C	-15.364000	-9.607000	23.668	A_7_VAL	VAL	A
17	C	-14.466000	-9.765000	24.881	A_7_VAL	VAL	A
18	O	-13.343000	-9.263000	24.899	A_7_VAL	VAL	A
19	C	-16.421000	-8.553000	24.018	A_7_VAL	VAL	A
20	C	-15.744000	-7.260000	24.421	A_7_VAL	VAL	A
21	C	-17.317000	-8.322000	22.842	A_7_VAL	VAL	A
22	N	-14.978000	-10.447000	25.902	A_8_ALA	ALA	A
23	C	-14.222000	-10.671000	27.128	A_8_ALA	ALA	A
24	C	-12.968000	-11.455000	26.767	A_8_ALA	ALA	A

25	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
26	C	-15.072000	-11.448000	28.122	A_8_ALA	ALA	A
27	N	-13.164000	-12.460000	25.921	A_9_HIS	HIS	A
28	C	-12.081000	-13.304000	25.445	A_9_HIS	HIS	A
29	C	-10.907000	-12.440000	24.987	A_9_HIS	HIS	A
...	...	...	...	...	...	...	...
16352	H	44.240154	24.932277	48.936	B_3004_HOH	HOH	B
16353	H	44.146373	23.367411	48.936	B_3004_HOH	HOH	B
16354	H	42.006154	21.492277	60.808	B_3005_HOH	HOH	B
16355	H	41.912373	19.927411	60.808	B_3005_HOH	HOH	B
16356	H	35.946154	19.524277	43.908	B_3006_HOH	HOH	B
16357	H	35.852373	17.959411	43.908	B_3006_HOH	HOH	B
16358	H	42.908154	51.559277	43.937	B_3007_HOH	HOH	B
16359	H	42.814373	49.994411	43.937	B_3007_HOH	HOH	B
16360	H	39.335154	51.777276	53.602	B_3008_HOH	HOH	B
16361	H	39.241373	50.212411	53.602	B_3008_HOH	HOH	B
16362	H	28.311154	48.009276	82.692	B_3009_HOH	HOH	B
16363	H	28.217373	46.444411	82.692	B_3009_HOH	HOH	B
16364	H	43.165154	40.125276	76.106	B_3010_HOH	HOH	B
16365	H	43.071373	38.560411	76.106	B_3010_HOH	HOH	B
16366	H	45.528154	29.066277	67.445	B_3011_HOH	HOH	B
16367	H	45.434373	27.501411	67.445	B_3011_HOH	HOH	B
16368	H	44.894154	18.579277	71.423	B_3012_HOH	HOH	B
16369	H	44.800373	17.014411	71.423	B_3012_HOH	HOH	B
16370	H	41.171154	27.835277	74.760	B_3013_HOH	HOH	B
16371	H	41.077373	26.270411	74.760	B_3013_HOH	HOH	B
16372	H	40.952154	28.635276	77.425	B_3014_HOH	HOH	B
16373	H	40.858373	27.070411	77.425	B_3014_HOH	HOH	B
16374	H	56.968154	27.667276	82.506	B_3015_HOH	HOH	B
16375	H	56.874373	26.102411	82.506	B_3015_HOH	HOH	B
16376	H	50.318154	22.154277	87.440	B_3016_HOH	HOH	B
16377	H	50.224373	20.589411	87.440	B_3016_HOH	HOH	B
16378	H	52.352154	25.144277	88.174	B_3017_HOH	HOH	B
16379	H	52.258373	23.579411	88.174	B_3017_HOH	HOH	B
16380	H	49.834154	15.955277	84.042	B_3018_HOH	HOH	B
16381	H	49.740373	14.390411	84.042	B_3018_HOH	HOH	B

16382 rows × 7 columns

- Selecionar uma ou mais cadeias

In [7]:

```
sel_cad_PDB=PDB[PDB['Cadeias_ID'] == 'A'] # Seleciona os dados referentes a cadeia escolhida.  
sel_cad_PDB #Imprime os dados (Opcional)
```

Out[7]:

	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
0	N	-18.130000	-15.520000	25.722	A_5_SER	SER	A

	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
1	C	-18.097000	-14.066000	25.428	A_5_SER	SER	A
2	C	-16.842000	-13.677000	24.659	A_5_SER	SER	A
3	O	-15.761000	-13.506000	25.235	A_5_SER	SER	A
4	C	-18.157000	-13.256000	26.714	A_5_SER	SER	A
5	O	-17.867000	-11.899000	26.444	A_5_SER	SER	A
6	N	-17.013000	-13.518000	23.350	A_6_GLU	GLU	A
7	C	-15.930000	-13.167000	22.444	A_6_GLU	GLU	A
8	C	-15.214000	-11.881000	22.834	A_6_GLU	GLU	A
9	O	-13.989000	-11.804000	22.746	A_6_GLU	GLU	A
10	C	-16.478000	-13.058000	21.023	A_6_GLU	GLU	A
11	C	-15.422000	-12.916000	19.953	A_6_GLU	GLU	A
12	C	-14.378000	-14.004000	20.025	A_6_GLU	GLU	A
13	O	-14.757000	-15.170000	20.258	A_6_GLU	GLU	A
14	O	-13.180000	-13.698000	19.837	A_6_GLU	GLU	A
15	N	-15.968000	-10.877000	23.271	A_7_VAL	VAL	A
16	C	-15.364000	-9.607000	23.668	A_7_VAL	VAL	A
17	C	-14.466000	-9.765000	24.881	A_7_VAL	VAL	A
18	O	-13.343000	-9.263000	24.899	A_7_VAL	VAL	A
19	C	-16.421000	-8.553000	24.018	A_7_VAL	VAL	A
20	C	-15.744000	-7.260000	24.421	A_7_VAL	VAL	A
21	C	-17.317000	-8.322000	22.842	A_7_VAL	VAL	A
22	N	-14.978000	-10.447000	25.902	A_8_ALA	ALA	A
23	C	-14.222000	-10.671000	27.128	A_8_ALA	ALA	A
24	C	-12.968000	-11.455000	26.767	A_8_ALA	ALA	A
25	O	-11.862000	-11.155000	27.235	A_8_ALA	ALA	A
26	C	-15.072000	-11.448000	28.122	A_8_ALA	ALA	A
27	N	-13.164000	-12.460000	25.921	A_9_HIS	HIS	A
28	C	-12.081000	-13.304000	25.445	A_9_HIS	HIS	A
29	C	-10.907000	-12.440000	24.987	A_9_HIS	HIS	A
...	...	...	...	...	...	...	...
16316	H	-22.040846	-5.827724	11.336	A_3003_HOH	HOH	A
16317	H	-22.134627	-7.392589	11.336	A_3003_HOH	HOH	A
16318	H	2.936154	-7.267723	12.747	A_3004_HOH	HOH	A
16319	H	2.842373	-8.832589	12.747	A_3004_HOH	HOH	A
16320	H	-5.157846	-2.639724	9.879	A_3005_HOH	HOH	A
16321	H	-5.251627	-4.204589	9.879	A_3005_HOH	HOH	A
16322	H	0.577154	0.008277	7.193	A_3006_HOH	HOH	A
16323	H	0.483373	-1.556589	7.193	A_3006_HOH	HOH	A
16324	H	2.264154	-4.536723	4.422	A_3007_HOH	HOH	A
16325	H	2.170373	-6.101589	4.422	A_3007_HOH	HOH	A
16326	H	-9.113846	-3.552723	-1.628	A_3008_HOH	HOH	A
16327	H	-9.207627	-5.117589	-1.628	A_3008_HOH	HOH	A
16328	H	18.486154	-15.518723	14.025	A_3009_HOH	HOH	A
16329	H	18.392373	-17.083589	14.025	A_3009_HOH	HOH	A
16330	H	8.278154	-10.438724	-16.612	A_3010_HOH	HOH	A

	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
16331	H	8.184373	-12.003589	-16.612	A_3010_HOH	HOH	A
16332	H	15.948154	16.718277	-12.183	A_3011_HOH	HOH	A
16333	H	15.854373	15.153411	-12.183	A_3011_HOH	HOH	A
16334	H	3.409154	7.668277	-23.310	A_3012_HOH	HOH	A
16335	H	3.315373	6.103411	-23.310	A_3012_HOH	HOH	A
16336	H	-3.335846	-6.584723	-15.615	A_3013_HOH	HOH	A
16337	H	-3.429627	-8.149589	-15.615	A_3013_HOH	HOH	A
16338	H	-0.375846	-3.650724	-8.413	A_3014_HOH	HOH	A
16339	H	-0.469627	-5.215589	-8.413	A_3014_HOH	HOH	A
16340	H	5.421154	1.401277	-24.966	A_3015_HOH	HOH	A
16341	H	5.327373	-0.163589	-24.966	A_3015_HOH	HOH	A
16342	H	-4.158846	3.847276	-28.727	A_3016_HOH	HOH	A
16343	H	-4.252627	2.282411	-28.727	A_3016_HOH	HOH	A
16344	H	11.013154	39.446277	-10.086	A_3017_HOH	HOH	A
16345	H	10.919373	37.881411	-10.086	A_3017_HOH	HOH	A

8248 rows × 7 columns

In [8]:

```
R=scl_cad_PDB.iloc[:,0:4] # Selecionar as colunas com os símbolos e coordenadas
R.to_csv('2xvu_cadeia',index=False, sep=" ") #Salvar todos os dados da cadeia escolhida
```

- Selecionar o PDB_Resíduo_S

In [9]:

```
Residuo_s=scl_cad_PDB[scl_cad_PDB[ 'PDB_Resíduo_S' ].str.contains( '9DN' )]
Residuo_s # Imprime todas as linhas com símbolo: "9DN" (Opcional)
```

Out[9]:

	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
8231	N	5.906000	-9.177000	5.598000	A_2001_9DN	9DN	A
8232	C	5.308000	-8.109000	4.784000	A_2001_9DN	9DN	A
8233	C	5.960000	-7.848000	3.416000	A_2001_9DN	9DN	A
8234	O	7.255000	-7.948000	3.308000	A_2001_9DN	9DN	A
8235	C	5.256000	-6.805000	5.636000	A_2001_9DN	9DN	A
8236	C	4.047000	-6.747000	6.573000	A_2001_9DN	9DN	A
8237	O	3.015000	-7.416000	6.354000	A_2001_9DN	9DN	A
8238	N	4.155000	-5.943000	7.634000	A_2001_9DN	9DN	A
8239	O	5.285000	-7.552000	2.439000	A_2001_9DN	9DN	A
8240	S	5.330000	-10.720000	5.488000	A_2001_9DN	9DN	A
8241	O	3.958000	-10.636000	5.085000	A_2001_9DN	9DN	A
8242	O	6.228000	-11.406000	4.591000	A_2001_9DN	9DN	A
8243	N	4.270000	-12.164000	12.036000	A_2001_9DN	9DN	A
8244	C	5.459000	-11.491000	7.153000	A_2001_9DN	9DN	A
8245	C	6.407000	-12.494000	7.325000	A_2001_9DN	9DN	A
8246	C	6.580000	-13.150000	8.580000	A_2001_9DN	9DN	A
8247	C	5.806000	-12.796000	9.658000	A_2001_9DN	9DN	A
8248	C	4.799000	-11.771000	9.582000	A_2001_9DN	9DN	A

8249	Simbolos_S	X	Y	Z	PDB_Residuo_ID	PDB_Residuo_S	Cadelas_ID
	C	4.590000	-11.070000	8.289000	A_2001_9DN	9DN	A
8250	C	3.589000	-10.062000	8.238000	A_2001_9DN	9DN	A
8251	C	2.816000	-9.725000	9.357000	A_2001_9DN	9DN	A
8252	C	3.012000	-10.400000	10.630000	A_2001_9DN	9DN	A
8253	C	4.007000	-11.438000	10.778000	A_2001_9DN	9DN	A
8254	C	5.195000	-11.419000	12.916000	A_2001_9DN	9DN	A
8255	C	3.047000	-12.431000	12.854000	A_2001_9DN	9DN	A
8256	N	7.284000	1.325000	-17.176000	A_2002_9DN	9DN	A
8257	C	7.291000	2.283000	-18.283000	A_2002_9DN	9DN	A
8258	C	5.926000	2.697000	-18.860000	A_2002_9DN	9DN	A
8259	O	5.741000	3.947000	-19.167000	A_2002_9DN	9DN	A
8260	C	8.202000	1.689000	-19.382000	A_2002_9DN	9DN	A
...	...	...	...	...	...	...	...
15642	H	9.026632	1.234714	-18.873565	A_2002_9DN	9DN	A
15643	H	7.567870	1.097006	-20.008355	A_2002_9DN	9DN	A
15644	H	9.040883	3.843336	-18.701835	A_2002_9DN	9DN	A
15645	H	10.207579	3.983680	-19.835762	A_2002_9DN	9DN	A
15646	H	7.654841	3.207942	-17.886766	A_2002_9DN	9DN	A
15647	H	8.252605	1.208365	-16.956452	A_2002_9DN	9DN	A
16262	H	7.020913	-12.780325	6.496731	A_2001_9DN	9DN	A
16263	H	7.315370	-13.920559	8.681834	A_2001_9DN	9DN	A
16264	H	5.957489	-13.301234	10.588962	A_2001_9DN	9DN	A
16265	H	3.420628	-9.544636	7.316650	A_2001_9DN	9DN	A
16266	H	2.071639	-8.960871	9.273724	A_2001_9DN	9DN	A
16267	H	2.410121	-10.123922	11.470489	A_2001_9DN	9DN	A
16268	H	5.359561	-11.976654	13.814244	A_2001_9DN	9DN	A
16269	H	4.767939	-10.468594	13.159410	A_2001_9DN	9DN	A
16270	H	6.127068	-11.272478	12.411341	A_2001_9DN	9DN	A
16271	H	3.321236	-12.957663	13.744124	A_2001_9DN	9DN	A
16272	H	2.584188	-11.502818	13.117026	A_2001_9DN	9DN	A
16273	H	2.360470	-13.023568	12.286162	A_2001_9DN	9DN	A
16274	H	6.664265	3.848161	-13.992375	A_2002_9DN	9DN	A
16275	H	8.304675	4.808375	-12.406049	A_2002_9DN	9DN	A
16276	H	10.464525	3.770901	-12.096209	A_2002_9DN	9DN	A
16277	H	8.940230	-0.088083	-15.837948	A_2002_9DN	9DN	A
16278	H	11.152925	-1.081902	-15.478969	A_2002_9DN	9DN	A
16279	H	12.776704	-0.067188	-13.863018	A_2002_9DN	9DN	A
16280	H	13.711204	1.804912	-10.733375	A_2002_9DN	9DN	A
16281	H	12.357498	0.706791	-10.854508	A_2002_9DN	9DN	A
16282	H	13.670580	0.604885	-12.002765	A_2002_9DN	9DN	A
16283	H	14.046696	3.519340	-12.195049	A_2002_9DN	9DN	A
16284	H	12.967373	3.839262	-13.531379	A_2002_9DN	9DN	A
16285	H	14.035767	2.457609	-13.582736	A_2002_9DN	9DN	A

- Salvar arquivo final

In [10]:

```
Res_s=Residuo_s.iloc[:,0:4] # Selecionar os símbolos e coordenadas
Res_s.to_csv('2xsu_1sit_dansil_asparagina',index=False, sep=" ") #Salvar
```

Caso exista mais de um sítio de ligação entre o complexo de HSA com farmaco ou amino ácidos.

- Sítio 1

In [12]:

```
sitio_1=scl_cad_PDB[scl_cad_PDB[ 'PDB_Residuo_ID' ].str.contains( 'A_2001_9DN' )]
# Selecionar o sítio 1
sitio_1 #Imprimir valores
```

Out[12]:

	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Residuo_ID	PDB_Residuo_S	Cadeias_ID
8231	N	5.906000	-9.177000	5.598000	A_2001_9DN	9DN	A
8232	C	5.308000	-8.109000	4.784000	A_2001_9DN	9DN	A
8233	C	5.960000	-7.848000	3.416000	A_2001_9DN	9DN	A
8234	O	7.255000	-7.948000	3.308000	A_2001_9DN	9DN	A
8235	C	5.256000	-6.805000	5.636000	A_2001_9DN	9DN	A
8236	C	4.047000	-6.747000	6.573000	A_2001_9DN	9DN	A
8237	O	3.015000	-7.416000	6.354000	A_2001_9DN	9DN	A
8238	N	4.155000	-5.943000	7.634000	A_2001_9DN	9DN	A
8239	O	5.285000	-7.552000	2.439000	A_2001_9DN	9DN	A
8240	S	5.330000	-10.720000	5.488000	A_2001_9DN	9DN	A
8241	O	3.958000	-10.636000	5.085000	A_2001_9DN	9DN	A
8242	O	6.228000	-11.406000	4.591000	A_2001_9DN	9DN	A
8243	N	4.270000	-12.164000	12.036000	A_2001_9DN	9DN	A
8244	C	5.459000	-11.491000	7.153000	A_2001_9DN	9DN	A
8245	C	6.407000	-12.494000	7.325000	A_2001_9DN	9DN	A
8246	C	6.580000	-13.150000	8.580000	A_2001_9DN	9DN	A
8247	C	5.806000	-12.796000	9.658000	A_2001_9DN	9DN	A
8248	C	4.799000	-11.771000	9.582000	A_2001_9DN	9DN	A
8249	C	4.590000	-11.070000	8.289000	A_2001_9DN	9DN	A
8250	C	3.589000	-10.062000	8.238000	A_2001_9DN	9DN	A
8251	C	2.816000	-9.725000	9.357000	A_2001_9DN	9DN	A
8252	C	3.012000	-10.400000	10.630000	A_2001_9DN	9DN	A
8253	C	4.007000	-11.438000	10.778000	A_2001_9DN	9DN	A
8254	C	5.195000	-11.419000	12.916000	A_2001_9DN	9DN	A
8255	C	3.047000	-12.431000	12.854000	A_2001_9DN	9DN	A
15636	H	6.118407	-6.831712	6.268803	A_2001_9DN	9DN	A
15637	H	5.128038	-6.002757	4.939629	A_2001_9DN	9DN	A
15638	H	3.298453	-5.955060	8.149928	A_2001_9DN	9DN	A
15639	H	4.900971	-6.261393	8.218938	A_2001_9DN	9DN	A
15640	H	4.328388	-8.452804	4.525041	A_2001_9DN	9DN	A
15641	H	5.717833	-8.906703	6.542210	A_2001_9DN	9DN	A

16262	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
	H	7.020913	-12.780325	6.496731	A_2001_9DN	9DN	A
16263	H	7.315370	-13.920559	8.681834	A_2001_9DN	9DN	A
16264	H	5.957489	-13.301234	10.588962	A_2001_9DN	9DN	A
16265	H	3.420628	-9.544636	7.316650	A_2001_9DN	9DN	A
16266	H	2.071639	-8.960871	9.273724	A_2001_9DN	9DN	A
16267	H	2.410121	-10.123922	11.470489	A_2001_9DN	9DN	A
16268	H	5.359561	-11.976654	13.814244	A_2001_9DN	9DN	A
16269	H	4.767939	-10.468594	13.159410	A_2001_9DN	9DN	A
16270	H	6.127068	-11.272478	12.411341	A_2001_9DN	9DN	A
16271	H	3.321236	-12.957663	13.744124	A_2001_9DN	9DN	A
16272	H	2.584188	-11.502818	13.117026	A_2001_9DN	9DN	A
16273	H	2.360470	-13.023568	12.286162	A_2001_9DN	9DN	A

In [13]:

```
sit_1=sitio_1.iloc[:,0:4] # Selecionar os símbolos e coordenadas
sit_1.to_csv('2xvu_sitiol_dansil_asparagina',index=False, sep=" ") #Salvar
```

- Sítio 2

In [14]:

```
sitio_2=sel_cad_PDB[sel_cad_PDB[ 'PDB_Resíduo_ID' ].str.contains( 'A_2002_9DN' )]
# Selecionar sítio 2
sitio_2 #Imprimir os dados
```

Out[14]:

	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
8256	N	7.284000	1.325000	-17.176000	A_2002_9DN	9DN	A
8257	C	7.291000	2.283000	-18.283000	A_2002_9DN	9DN	A
8258	C	5.926000	2.697000	-18.860000	A_2002_9DN	9DN	A
8259	O	5.741000	3.947000	-19.167000	A_2002_9DN	9DN	A
8260	C	8.202000	1.689000	-19.382000	A_2002_9DN	9DN	A
8261	C	8.791000	2.759000	-20.269000	A_2002_9DN	9DN	A
8262	O	8.851000	2.572000	-21.492000	A_2002_9DN	9DN	A
8263	N	9.224000	3.886000	-19.684000	A_2002_9DN	9DN	A
8264	O	5.027000	1.886000	-19.026000	A_2002_9DN	9DN	A
8265	S	6.591000	1.635000	-15.726000	A_2002_9DN	9DN	A
8266	O	5.573000	2.631000	-15.893000	A_2002_9DN	9DN	A
8267	O	6.155000	0.343000	-15.261000	A_2002_9DN	9DN	A
8268	N	12.377000	2.232000	-12.297000	A_2002_9DN	9DN	A
8269	C	7.893000	2.235000	-14.598000	A_2002_9DN	9DN	A
8270	C	7.614000	3.371000	-13.869000	A_2002_9DN	9DN	A
8271	C	8.553000	3.926000	-12.958000	A_2002_9DN	9DN	A
8272	C	9.773000	3.334000	-12.786000	A_2002_9DN	9DN	A
8273	C	10.160000	2.153000	-13.493000	A_2002_9DN	9DN	A
8274	C	9.205000	1.549000	-14.453000	A_2002_9DN	9DN	A
8275	C	9.614000	0.371000	-15.145000	A_2002_9DN	9DN	A
8276	C	10.878000	-0.200000	-14.939000	A_2002_9DN	9DN	A

8277	C	11.819000	0.389000	-14.003000	A_2002_9DN	9DN	A
	Símbolos_S	X	Y	Z	PDB_Resíduo_ID	PDB_Resíduo_S	Cadeias_ID
8278	C	11.485000	1.578000	-13.259000	A_2002_9DN	9DN	A
8279	C	13.078000	1.270000	-11.410000	A_2002_9DN	9DN	A
8280	C	13.432000	3.072000	-12.948000	A_2002_9DN	9DN	A
15642	H	9.026632	1.234714	-18.873565	A_2002_9DN	9DN	A
15643	H	7.567870	1.097006	-20.008355	A_2002_9DN	9DN	A
15644	H	9.040883	3.843336	-18.701835	A_2002_9DN	9DN	A
15645	H	10.207579	3.983680	-19.835762	A_2002_9DN	9DN	A
15646	H	7.654841	3.207942	-17.886766	A_2002_9DN	9DN	A
15647	H	8.252605	1.208365	-16.956452	A_2002_9DN	9DN	A
16274	H	6.664265	3.848161	-13.992375	A_2002_9DN	9DN	A
16275	H	8.304675	4.808375	-12.406049	A_2002_9DN	9DN	A
16276	H	10.464525	3.770901	-12.096209	A_2002_9DN	9DN	A
16277	H	8.940230	-0.088083	-15.837948	A_2002_9DN	9DN	A
16278	H	11.152925	-1.081902	-15.478969	A_2002_9DN	9DN	A
16279	H	12.776704	-0.067188	-13.863018	A_2002_9DN	9DN	A
16280	H	13.711204	1.804912	-10.733375	A_2002_9DN	9DN	A
16281	H	12.357498	0.706791	-10.854508	A_2002_9DN	9DN	A
16282	H	13.670580	0.604885	-12.002765	A_2002_9DN	9DN	A
16283	H	14.046696	3.519340	-12.195049	A_2002_9DN	9DN	A
16284	H	12.967373	3.839262	-13.531379	A_2002_9DN	9DN	A
16285	H	14.035767	2.457609	-13.582736	A_2002_9DN	9DN	A

In [15]:

```
sit_2=sitio_2.iloc[:,0:4] # Selecionar os símbolos e coordenadas
sit_2.to_csv('2xvu_sitio2_dansil_asparagina',index=False, sep=" ") #Salvar
```