



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”



Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

**Investigação teórica e experimental dos sítios de interação entre a
Albumina do Soro Humano (HSA) e o aminoácido Dansilglicina**

Mestranda: Izabelle Amorim Ferreira Boza

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Robinson de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

BAURU

2018

Izabelle Amorim Ferreira Boza

**Investigação teórica e experimental dos sítios de interação entre a Albumina do
Soro Humano (HSA) e o aminoácido Dansilglicina**

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

BAURU

2018

Boza, Izabelle Amorim Ferreira.

Investigação teórica e experimental dos sítios de interação entre a Albumina do Soro Humano (HSA) e o aminoácido Dansilglicina / Izabelle Amorim Ferreira Boza, 2018

98 f.: il.

Orientador: Aguinaldo Robinson de Souza
Coorientador: Valdecir Farias Ximenes

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2018

1. Dansilglicina. 2. Albumina. 3. Sítios de Ligação. 4. Dicroísmo Circular Eletrônico. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE IZABELLE AMORIM FERREIRA BOZA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 27 dias do mês de julho do ano de 2018, às 14:00 horas, no(a) Sala 1 da Pós Graduação/FC, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA - Orientador(a) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, Prof. Dr. NELSON HENRIQUE MORGON do(a) Departamento de Física Química / Instituto de Química - UNICAMP/Campinas, Profª Drª IGNEZ CARACELLI do(a) Departamento de Física / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar/São Carlos, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE IZABELLE AMORIM FERREIRA BOZA, intitulada *Investigação teórica e experimental dos sítios de interação entre a Albumina do Soro Humano (HSA) e o aminoácido Dansilglicina..* Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. AGUINALDO ROBINSON DE SOUZA

Prof. Dr. NELSON HENRIQUE MORGON

Profª Drª IGNEZ CARACELLI

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela vida e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Aguinaldo Robinson de Souza, pela orientação, pelo suporte e pela confiança depositados em mim, durante todo o decorrer do meu mestrado.

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

Ao Prof. Dr. Nelson Henrique Morgon, do departamento de físico-química da UNICAMP, que contribuiu com os estudos teóricos, sendo este uma peça chave para que pudéssemos concluir nossos resultados.

Aos meus pais Ana Eliza e Antônio, aos meus tios Rosana e Daniel e a minha sogra Dona Cida, por sempre estarem presentes, apoiando e incentivando a seguir em frente e vencer os desafios.

Em especial ao meu esposo Tiago que sempre esteve presente nesta caminhada, pela paciência, apoio, compreensão, e amor à mim oferecidos.

À Capes pelo auxílio financeiro.

E a todos que colaboraram na realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Domínios e subdomínios da estrutura terciária da HSA	6
Figura 2. Visão geral da DanN vinculada aos sítios I e II dos fármacos na HSA.....	10
Figura 3. (a) DanNV e (b) DanSRC, comparação da ligação ao sítio II de fármacos da HSA.....	12
Figura 4. Molécula da Dansilglicina.....	15
Figura 5. (a) Luz verticalmente polarizada; (b) Luz horizontalmente polarizada e (c) Formando um vetor resultante num ângulo de 45°. (An introduction to circular dichroism spectroscopy, 2013, documento eletrônico).....	19
Figura 6. (a) Luz circularmente polarizada à esquerda; (b) Luz circularmente polarizada à direita((An introduction to circular dichroism spectroscopy, 2013, documento eletrônico).....	21
Figura 7. Sinais de CD em estruturas secundárias de proteínas. (Bioinformática-DicroísmoCircular, 2016, documento eletrônico).....	23
Figura 8. Um par de enantiômeros. (LIMA, V. L. E., 1997, documento eletrônico).....	24
Figura 9. (a) Espectro de Dicroísmo Circular Induzido em complexos de fenilbutazona ligada com HSA(____), BSA(-----), RSA(.....) e DSA(-.-.-) [albumina]=100µM em tampão fosfato 67mM, pH 7,4. Caminho óptico 0,1 cm (PISTOLOZZI; BERTUCCI, 2008)	27
Figura 10. Deslocamento de dansilglicina (DanGly) da HSA por ligantes do site I e II: estudos de dicroísmo circular. As misturas consistiram em HSA 30 mM, DanGly 30 mM e 30 mM de naproxeno (NX), ibuprofeno (IB), fenilbutazona (PB) ou varfarina (WF). (GRACIANE; XIMENES, 2013).....	30
Figura 11. Inversão da Amônia	32
Figura 12. Comportamento do par de elétrons numa amina tetraédrica, e hibridação sp ² do nitrogênio. (Nitrogen Inversion, 2014, documento eletrônico)	33
Figura 13. Configuração absoluta de uma amina tetraédrica. (Nitrogen Inversion, 2014, documento eletrônico).....	34
Figura 14. Inversão do nitrogênio evitada, devido a presente de quatro anexos diferentes. (Nitrogen Inversion, 2014, documento eletrônico)	34
Figura 15. Inversão do nitrogênio, devido o tunelamento quântico apresentad. (Nitrogen Inversion, 2014, documento eletrônico).....	35
Figura 16. Estrutura molecular da Dansilglicina.....	55

Figura 17. Espectros de absorção da DanGly 100 μ M em diversos solventes. (A) acetonitrila; (B). THF; (C) água; (D) etanol e (E) metanol.....	58
Figura 18. Espectros teóricos de absorção da DanGly (r e s) em diversos solventes. (a) acetonitrila; (b). THF; (c) água; (d) etanol e (e) metanol.....	62
Figura 19. Configurações (a) R e (b) S da Dansilglicina.....	63
Figura 20. (a) ECD da DanGly isolada, não apresenta sinal por ser uma molécula aquiral; (b) ECD da HSA e (c) Após complexação DanGly-HSA.....	65
Figura 21. ECD da DanGly em diferentes solventes e suas configurações r e s. (a) acetonitrila; (b).THF; (c) água; (d) etanol e (e) metanol.....	67
Figura 22. Estrutura da DanGly com os átomos numerados.....	69
Figura 23. PES da DanGly	70
Figura 24. ECD da DanGly no solvente água	70
Figura 25. PES da DanGly	71
Figura 26. ECD da DanGly no solvente água	71
Figura 27. PES da DanGly	72
Figura 28. ECD da DanGly no solvente água	73
Figura 29. PES da DanGly	73
Figura 30. ECD da DanGly no solvente água	74
Figura 31. PES da DanGly	74
Figura 32. ECD da DanGly no solvente água	75
Figura 33. PES da DanGly	76
Figura 34. ECD da DanGly no solvente água	77
Figura 35. ECD da DanGly no solvente água	77
Figura 36. ECD da DanGly no solvente água	78
Figura 37. ECD da DanGly no solvente água	79
Figura 38. ECD da DanGly no solvente água	79
Figura 39. ECD da DanGly no solvente água	80
Figura 40. Estrutura da cavidade do sitio II na HSA	81
Figura 41. Sítio II de interação da HSA com a DanGly	82
Figura 42. Principais orbitais moleculares (a) HOMO e (b) LUMO da DanGly para o diedro de 80°	83
Figura 43. Principais orbitais moleculares (a) HOMO e (b) LUMO da DanGly para o diedro de 150°.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades características dos solventes: constante dielétrica (ϵ) e momento dipolar (D)	56
Tabela 2. Máximos de absorção nas duas bandas presentes	58
Tabela 3. Valores da menor energia apresentada da DanGly nos diversos solventes	68
Tabela 4. Contribuição dos orbitais atômicos no HOMO e LUMO da DanGly	86

Boza, I. A. F. **Investigação teórica e experimental dos sítios de interação entre a Albumina do Soro Humano (HSA) e o aminoácido Dansilglicina**. 2018. 98 f. Dissertação (Mestre em Ciências dos Materiais) – UNESP – Faculdade de Ciências, Bauru, 2018.

RESUMO

A Albumina do Soro Humano (HSA) desempenha um papel importante no transporte de substâncias com propriedades farmacológicas devido a sua alta concentração e especificidade plasmática, colocando-a como uma das proteínas fundamentais responsáveis pela implicação farmacocinética dos fármacos. O derivado de aminoácido dansilglicina (DanGly) é um marcador fluorescente específico para o sítio II na HSA. Além disso, ao se ligar à proteína, a DanGly adquire quiralidade, uma característica que também pode ser usada para caracterizar o sítio de ligação de novos compostos na HSA. Este trabalho teve como objetivo elucidar a indução de quiralidade na DanGly por sua ligação com a HSA. Os espectros de Dicroísmo Circular Eletrônico (ECD) da DanGly (100 μ M) na ausência ou presença de HSA (30 μ M) em solução fosfato de sódio 50 mM em pH 7,0 foram obtidos num espectropolarímetro Jasco J-815 a 25° C com uma resolução de 1 nm numa velocidade de 50 nm/min. Os ECDs teóricos foram simulados usando a abordagem da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com os funcionais híbridos B3LYP e CAM-B3LYP no conjunto de bases 6-311 ++ G (2d, p) e o Modelo de Solvação baseado em Densidade (SMD) para os solventes etanol, metanol, acetonitrilo, água e tetra-hidrofurano; os cálculos foram realizados com o programa Gaussian09. A formação do complexo DanGly-HSA em tampão resultou no aparecimento de um espectro positivo de ECD centrado em 346 nm. Considerando que o sinal do ICD deve surgir a partir de uma conformação quiral da DanGly adquirida por ligação na proteína, os cálculos foram inicialmente realizados para obter as

conformações estáveis com foco na inversão da configuração centrada no átomo de nitrogênio: grupo alfa-amino. No entanto, ambas as configurações: R e S mostraram sinais de ECD semelhantes, positivos para configuração R e negativo para configuração S. Cálculos da superfície de energia potencial (PES) da DanGly foram realizados, enfocando os ângulos diédricos formados pela ligação do grupo -N (CH₃)₂ do anel naftalênico. A análise das várias conformações obtidas e seus respectivos ECDs teóricos revelaram que o diedro de 150° (ECD positivo centrado em 320 nm) apresentou excelente similaridade com o espectro experimental. Por outro lado, o diedro de 80° apresentou um sinal do espectro de ECD oposto ao observado experimentalmente. Além disso, observamos que o átomo de nitrogênio do grupo -N (CH₃)₂ apresentou a maior contribuição para a transição HOMO-LUMO que dá origem à transição eletrônica n-pi* envolvida na geração do sinal de ECD. A análise de docking molecular, usando o programa GOLD 5.5, da complexação entre DanGly e HSA revelou uma conformação com um diedro similar (150°) àquele obtido teoricamente (DFT) e cujo ECD está em acordo com o resultado experimental. Em conclusão, através do estudo das possíveis conformações para a dansilglicina e o cálculo do seu ECD teórico, foi possível identificar a origem do sinal de ECD obtido pela complexação entre DanGly e HSA.

Palavras chave: Dansilglicina, Albumina, Sítios de ligação, Dicroísmo Circular Eletrônico.

ABSTRACT

Human serum albumin (HSA) plays an important role in the transport of substances with pharmacological properties due to their high plasma concentration and specificity, placing it as the fundamental protein responsible for the pharmacokinetic implication of the drugs. The dansylglycine amino acid derivative (DanGly) is a fluorescent marker specific for the II site on the HSA. In addition, when binding to the protein, DanGly acquires chirality, a feature that can also be used to characterize the binding site of new compounds in albumin. This work aimed to elucidate the induction of chirality in the DanGly by its bonding to the HSA. Experimental Electronic Circular Dichroism (ECD) spectra of DanGly (100 μ M) in the absence or presence of HSA (30 μ M) in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 were obtained in a Jasco J-815 spectropolarimeter at 25° C. The spectra were obtained with a resolution of 1 nm and a scanning speed of 50 nm/min. The theoretical ECDs were simulated using the Density Functional Theory (DFT) approach with the hybrid functional B3LYP and CAM-B3LYP in the base set 6-311 ++ G (2d, p) and the implicit Solvation Model based on Density (SMD) for the solvents ethanol, methanol, acetonitrile, water and tetrahydrofuran; the calculations were performed with the Gaussian09 program. The DanGly -HSA complex formation in buffer resulted in the appearance of a positive ECD spectrum centered at 346 nm. Considering that the ICD signal should arise from a chiral conformation of the DanGly acquired by binding in the protein, calculations were initially performed to obtain the stable conformations focusing on the inversion of configuration centered on the nitrogen atom: alpha-amino group. However, both configurations: R and S showed similar ECD signals, positive for R configuration and negative for S configuration. Calculations of the potential energy surface (PES) of the DanGly were performed, focusing on the dihedral angles formed by the bonding of the -N(CH₃)₂ group of the naphthalene ring.

The analysis of the various conformations obtained and their respective theoretical ECDs revealed that the 150 ° dihedral (ECD positive centered at 320 nm) presented excellent similarity with the experimental spectrum. On the other hand, the 80° dihedral showed a signal of the ECD spectrum opposite to that observed experimentally. In addition, we observed that the nitrogen atom of the -N(CH₃)₂ group presented the greatest contribution to the HOMO-LUMO transition that gives rise to the n-π* electronic transition involved in the generation of the ECD signal. The molecular docking analysis, using the GOLD 5.5 program, of the complexation between DanGly and HSA revealed a conformation with a dihedral similar (150°) to that obtained theoretically (DFT) and whose ECD is in agreement with the experimental result. In conclusion, through the study of the possible conformations for dansylglycine and the calculation of its theoretical ECD, it was possible to identify the origin of the ECD signal obtained by the complexation between DanGly and HSA.

Key words: dansylglycine, Albumin, Bonding sites, Electronic Circular Dichroism.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Albumina De Soro Humano (HSA).....	4
2.1.1. Propriedades Da Albumina.....	5
2.2. Dansilados.....	7
2.2.1. Aminoácidos Dansilados.....	8
2.2.2. Interações Do Sítio I.....	9
2.2.3. Interações Do Sítio II.....	11
2.3. Dansilglicina (Dangly).....	14
2.3.1. Técnicas Para O Sstudo Da Ligação De Fármacos.....	16
2.3.2. Espectroscopia Na Região Ultra Violeta E Do Visível.....	17
2.3.3. Excitações Eletrônicas.....	17
2.3.4. Dicroísmo Circular Eletrônico (ECD).....	17
2.3.4.1. Origem Da Luz Circularmente Polarizada.....	18
2.3.5. Molécula Quiral.....	23
2.3.5.1. Enantiômeros.....	24
2.3.6. Dicroísmo Circular Induzido (ICD).....	25
2.3.7. Marcadores.....	30
2.3.8. Par De Elétrons Isolados Do Nitrogênio.....	32
2.3.9. Amônia.....	32
2.9.10. Inversão Dos Ligantes Do Nitrogênio.....	33
2.5. Formalismo E Uso Da Teoria Do Funcional Da Densidade (DFT).....	36
2.5.1. Fundamentos Teóricos Da Modelagem Molecular.....	36
2.5.2. O Modelo Contínuo De Solvente	39
2.5.3. Modelo SMD.....	40
2.5.4. Método De Hartree-Fock.....	41
2.5.5. Teoria Do Funcional Da Densidade.....	42
2.5.6. Teoria Do Funcional Da Densidade Dependente do Tempo.....	45
2.5.7. Funcionais Híbridos.....	46
2.5.8. Funções De Bases.....	47

2.5.9. Funções Adicionais.....	47
2.5.10. Funções De Polarização.....	48
2.5.11. Funções Difusas.....	49
3. OBJETIVOS.....	50
3.1. Objetivos Específicos.....	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1. Reagentes E Soluções.....	51
4.2. Preparo De Soluções.....	51
4.2.1. Dansilglicina (Dangly).....	51
4.2.2. Albumina De Soro Humano (HSA).....	52
4.2.3. Tampão Fosfato.....	52
4.3. Estudo Dos Espectros Experimentais E Teóricos.....	52
4.3.1. Espectroscopia UV-Vis.....	52
4.3.2. Elipticidade: Dicroísmo Circular Eletrônico (ECD).....	53
4.3.3. Metodologia Computacional: Teoria Do Funcional Da Densidade E Docking Molecular.....	53
4.4. Tratamento Dos Dados.....	54
4.4.1. Construção Da Molécula Dansilglicina.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1. Absorbância UV-Vis da Dansilglicina Em Diversos Solventes.....	56
5.2. Estudo Teórico Dos Espectros De Absorbância UV-Vis Da Dansilglicina Em Diversos Solventes.....	60
5.3. Interação Da Dansilglicina Com A HSA: Dicroísmo Circular Induzido.....	63
5.4. Estudo Teórico Do Dicroísmo Circular Eletrônico (ECD).....	65
5.5. Dansilglicina E A Inversão Dos Ligantes No Nitrogênio.....	68
5.6. Estudo Da Superfície De Energia Potencial (PES) E ECD Da Dansilglicina.....	69
5.7. Estudo Dos Orbitais Moleculares HOMO-LUMO Da Dansilglicina.....	82
6. CONCLUSÕES.....	87
7. REFERÊNCIAS.....	88

1. INTRODUÇÃO

Nesta dissertação pretendemos apresentar o estudo da molécula DanGly do ponto de vista da Simulação Computacional e experimental. Este aminoácido tem sido usado como sonda fluorescente na caracterização dos sítios de interação na HSA. A HSA confere um importante papel no transporte de substâncias com propriedades farmacológicas devido à sua alta concentração no plasma e especificidade colocando-a como a proteína fundamental responsável na implicação farmacocinético dos medicamentos (LINDUP, 1981).

De acordo com SUDLOW e colaboradores em meados de 1970 surgiu um dos avanços no estudo da ligação HSA-fármaco. Esses pesquisadores usaram uma variedade de fármacos e aminoácidos dansilados fluorescentes em estudos de ligação e competição para identificar os principais sítios de ligação de fármacos na HSA (SUDLOW, 1975). Os aminoácidos dansilados são estudados por permitirem entender as interações moleculares e determinar o sítio em que um novo fármaco se liga com maior afinidade.

A HSA é uma das proteínas mais abundantes no plasma humano, se encontra predominantemente nos fluídos corporais, possuindo muitas funções fisiológicas devido a sua alta capacidade como portadora e como reservatório para moléculas endógenas e exógenas (FANALI, 2012). Apresenta-se como um monômero de 67 kDa possuindo três domínios globulares, sendo eles divididos em dois subdomínios os quais são denominados de subdomínios IA, IIA, IB, IIB, IIIA e IIIB. 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 (RYAN *et al.*, 2011).

A relevância em entendermos as bases estruturais da especificidade da interação entre a HSA e moléculas consideradas como fármacos é devido ao fato de buscarmos e

aperfeiçoarmos um melhor entendimento da interação molecular que poderá definir então as possíveis abordagens terapêuticas para o tratamento de enfermidades e no alívio de sintomas advindos de doenças ou síndromes (GRAHAM, 2003).

A Simulação Computacional será utilizada na busca de um maior entendimento das interações entre a biomolécula HSA e o aminoácido DanGly, buscando subsídios teóricos para uma possível comparação entre os resultados experimentais. Outra propriedade da simulação computacional a ser utilizada é o seu caráter preditivo das propriedades químicas e físicas de sistemas de interesse como, por exemplo, na predição da conformação adotada pela DanGly no sítio ativo da HSA (GUSTEREN *et al.*, 2008).

A caracterização de como um fármaco pode se ligar na HSA, torna-se de suma importância, podendo afetar a sua distribuição no corpo, à taxa de metabolismo e de excreção. Sendo assim, a caracterização estrutural e energética leva a parâmetros que auxiliam na determinação de afinidade entre as espécies, a constante de ligação e o número de sítios de ligação. Com este intuito utilizaremos o aminoácido DanGly no estudo e caracterização dos sítios de ligações à HSA.

O objetivo de estudarmos aminoácidos dansilados é devido ao seu alto rendimento quântico de fluorescência, esta propriedade aumenta consideravelmente quando ligados aos sítios da HSA. Observando um deslocamento para comprimentos de onda menores (para a cor azul do espectro eletromagnético), devido à ocorrência de um fenômeno típico de mudança do meio hidrofílico para o meio hidrofóbico no interior da proteína. Sendo assim, com a diminuição da fluorescência do complexo HSA-aminoácido dansilado provocado pela adição de um fármaco específico se obtém um parâmetro analítico para detecção do seu sítio de ligação (LAKOWICZ, 2006).

Outra abordagem experimental que pode fornecer informações fundamentais sobre a interação entre as biomoléculas e os fármacos são os métodos espectrais de

dicroísmo circular, CD (Circular Dichroism), e eletrônico, ECD (Electronic Circular Dichroism). Esses métodos são úteis no estudo das prováveis configurações, das conformações e das interações entre as biomoléculas, que apresentam o fenômeno da quiralidade, e outras moléculas de menor tamanho como os fármacos, e também no estudo da influência de solventes (RODE, 2013). A espectroscopia na região do Ultra Violeta e Visível do espectro eletromagnético, à simplicidade operacional, elevada velocidade analítica e baixo custo, pode ser utilizada para observar o comportamento da DanGly nos diferentes solventes que serão apresentados.

Neste contexto, nessa dissertação procuramos estudar a interação entre a molécula DanGly com a proteína HSA tanto do ponto de vista teórico como experimental. O foco é a obtenção dos espectros de Dicroísmo Circular Eletrônico da dansilglicina no vácuo e em solventes como: etanol, metanol, acetonitrila, água e THF, e o uso do Ultra Violeta e Visível do espectro eletromagnético. Pretendendo-se estabelecer as conformações de menor energia adotada por esta molécula nos domínios de interação com a HSA através do cálculo da superfície de energia potencial no vácuo e nos solventes citados acima.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para deixarmos o leitor ciente, neste capítulo utilizaremos o livro do autor Theodore Peters, “*All about albumin*”, 1996. Acreditamos que este livro apresenta temas relevantes sobre a albumina, pois como se trata de um livro que aborda somente este tema, apresenta especificidades que consideramos importantes para a redação desta dissertação, e assim, para a elucidação do tema. Logo, trataremos de maneira abrangente sobre a albumina, suas propriedades e conformações com a mudança de pH.

2.1. Albumina de Soro Humano (HSA)

A albumina do soro humano (HSA) é uma das proteínas mais abundantes no plasma humano, se encontra predominantemente nos fluídos corporais. Uma das funções principais da albumina, entretanto consiste em sua capacidade de transportar diversos tipos de substâncias fisiologicamente importantes como ácidos graxos de cadeia longa, hormônios como a tiroxina, o cortisol, a aldosterona e pequenos íons como cálcio, cobre, níquel e zinco para todos os lugares do corpo. Conhecida pela facilidade de se ligar a moléculas menores de diversos tipos faz com que a albumina seja comparada a uma esponja da circulação. Apresentando em sua estrutura três domínios fornecendo uma variedade de subdomínios (GUNDRY *et al.*, 2007).

Os principais sítios de ligação para produtos farmacêuticos, referidos como sítio I e sítio II, estão localizados nas cavidades hidrofóbicas dos subdomínios IIA e IIIA, respectivamente. O sítio I é geralmente mencionado como o local de ligação à varfarina, possuindo também alta afinidade pelo piroxicam, fenilbutazona, entre outros. O sítio II,

denominado local de ligação à benzodiazepina, possui alta afinidade para diazepam, ibuprofeno, entre outros (GRACIANI; XIMENES, 2013).

2.1.1. Propriedades Da Albumina

A albumina é uma proteína formada por 585 aminoácidos constituída por uma cadeia de polipeptídio, apresentando um peso molecular de aproximadamente 67 kDa, sustentada por 17 pontes de dissulfeto, proporcionando a característica de proteínas extracelulares onde contribui para a estabilidade das proteínas plasmáticas na circulação. Possui três domínios globulares que são numerados em I, II e III. Sendo que no caso da albumina, os três domínios, apesar de semelhantes, possuem diferentes funções de ligação ao ligante, formando um ambiente altamente irregular (SUGIO *et al.*, 1999). Em sua arquitetura interna existem várias interações distintas entre resíduos de aminoácidos distribuídos de forma assimétrica que podem acomodar um conjunto estrutural de diversos ligantes em grande parte hidrofóbicos. No ultravioleta próximo (240-400 nm), o espectro de absorbância da HSA aparece com um pico próximo de 280 nm, devido à presença de apenas um triptofano localizado no subdomínio IIA na posição 214 ao longo de sua estrutura, atribuindo à proteína fluorescência (PETERS, 1996; HE; CARTER, 1992). Os três domínios globulares da HSA e seus respectivos subdomínios são apresentados na Figura 1 (PDB: 5ORI, BUJACZ A. *et al.*, 2017).

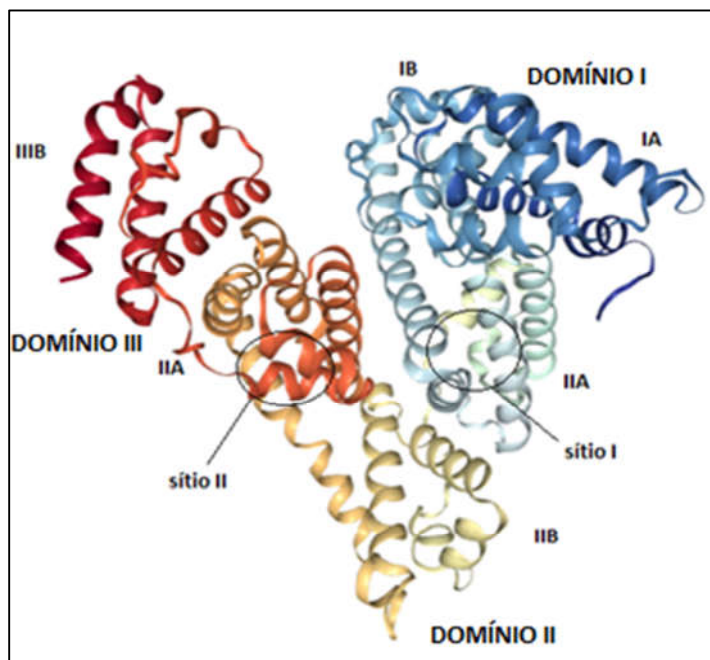


Figura 1. Domínios e subdomínios da estrutura terciária da HSA

GHUMAN *et al.*, 2005, apresentaram e definiram as bases estruturais para o estudo da interação entre as fármacos e a HSA. Utilizando as técnicas de difração de Raio X, foram identificados os principais resíduos da biomolécula, que conferem especificidade à interação e à acomodação flexível do fármaco durante a interação (FEIXAS *et al.*, 2014)

Consequentemente, a investigação das interações fármaco e HSA sempre foram de grande interesse do ponto de vista farmacológico. De maneira que, em meados da década de 1970, SUDLOW e colegas usaram uma variedade de fármacos e aminoácidos dansilados fluorescentes em experimentos de competição para identificar dois sítios principais de ligação de fármacos na HSA (SUDLOW *et al.*, 1975). Após determinação das estruturas cristalográficas, confirmaram que os sítios de fármacos I e II, estão localizados em subdomínios IIA e IIIA. Dividiram estes compostos em dois grupos: os que se ligam ao sítio de ligação à varfarina (sítio I), que compreende os ácidos dansil-*L*-

cisteína, dansil-*L*-arginina, dansil-*L*-glutamina, e dansilamida; e os que se ligam à benzodiazepina sítio de ligação (sítio II), que inclui dansilsarcosine, dansil- α aminobutiric ácido, dansil-hidroxi-*L*-prolina e dansil-*L*-prolina (GRACIANI; XIMENES, 2013), e fármacos anti-inflamatórios não esteróides como ibuprofeno e naproxeno (PETERS, 1996).

2.2. Dansilados

Neste capítulo alguns artigos serão utilizados como referência em particular aquele intitulado “*Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin*” dos autores ALI J. R.; GHUMAN, J.; ZUNZAIN, P. A.; CHUNG, C. W.; CURRY, S., 2011.

Serão apresentados conceitos a respeito dos aminoácidos dansilados e seus sítios específicos em relação à proteína albumina do soro humano (HSA), considerando de forma detalhada a maneira como interagem com a HSA em cada sítio e a influência do meio na sua estrutura.

Adiante, iremos tratar a respeito do aminoácido dansilglicina (DanGly) que é usado como sonda para detecção da sua ligação ao sítio e a geração de um novo sinal de dicroísmo circular induzido (ICD) para o complexo proteína-ligante, compreendendo que o DanGly é uma molécula opticamente inativa quando em solução. Além disso, iremos apresentar uma visão mais ampla para as várias aplicações onde compostos (aminoácidos, lipídeos, proteínas, fármacos, etc) são marcados com o grupo dansil para que possam ser estudados por fluorescência.

2.2.1. Aminoácidos Dansilados

O uso dos aminoácidos dansilados possui grande importância por apresentarem um aumento significativo de seus rendimentos quânticos quando ligados à proteína albumina. Do mesmo modo, um deslocamento do máximo de emissão para o azul é caracteristicamente observado. Este fenômeno se relaciona à mudança do meio hidrofílico para o meio hidrofóbico da proteína. Consequentemente, quando existe a formação do complexo proteína-amino a adição de um medicamento específico resulta na diminuição da fluorescência, e este é o parâmetro analítico para a detecção do seu local de ligação (GRACIANI; XIMENES, 2013).

Sabendo que a proteína mais abundante no sangue, HSA, desempenha um papel crucial na função de transportar a maioria dos compostos orgânicos quando a ela se ligam, bem como a sua distribuição, metabolismo e concentração livre do medicamento presente no sangue, se relaciona intimamente a ligações com a HSA (BERTUCCI *et al.*, 2002). Como citado no capítulo anterior, a HSA possui sítios de ligação com seletividades específicas, possuindo três domínios homólogos, nomeados de I, II e III, cada um dos quais é dividido em dois subdomínios (CURRY *et al.*, 1998). Entre esses subdomínios, o sítio I (no subdomínio IIA) e o sítio II (no subdomínio IIIA) têm importância fisiológica na ligação a um grande número de fármacos (YAMASAKI *et al.*, 1996). Uma maneira de localizar o ligante em sítios de ligação na HSA se baseia nos estudos de estruturas obtidas a partir da difração de raios X, como citado anteriormente, os aminoácidos dansilados por serem altamente fluorescentes, podem ser usados na competição de ensaios de ligação (ALI J. R. *et al.*, 2011).

Segundo SUDLOW *et al.*, 1975, a determinação dos locais de ligação ao sítio na HSA se deve às propriedades físico-químicas das cadeias laterais dos aminoácidos

dansilados. Os que possuem cadeias laterais hidrofóbicas como, por exemplo, a dansil-*L*-fenilalanina e a dansil-*L*-norvalina, são específicos do sítio II, assim como os aminoácidos dansilados, dansilsarcosina e a dansil-*L*-prolina, que tem um grupo amino metilado. Os aminoácidos dansilados com cadeias laterais polares ou carregadas se ligam preferencialmente ao sítio I como, por exemplo, a dansil-*L*-asparagina, a dansil-*L*-arginina e o dansil-*L*-glutamato.

2.2.2. Interações Do Sítio I

A capacidade do sítio I ligar aminoácidos dansilados com cadeias laterais polares carregadas e não carregadas e por apresentar uma geometria favorável devido ao tamanho da cavidade, pode acomodar cadeias laterais de médio e grande porte e também por possuir grupos polares, estabilizando assim as cadeias laterais dos compostos dansilados.

GHUMAN *et al.*, 2005; PETITPAS *et al.*, 2001, descreveram o comportamento da estrutura do aminoácido dansil-*L*-asparagina (DanN), quando ligado a HSA livre de ácidos graxos. Foi observado que o grupo dansil se liga no centro do sítio I localizado no subdomínio IIA, entre as cadeias laterais do aminoácido Alanina na posição 291 (Ala-291) e da Leucina na posição 238 (Leu-238) apresentado na Figura 2 (PDB:5ORI, BUJACZ A. *et al.*, 2017). O grupo dimetilamina do anel da dansila se encontra próximo das cadeias laterais de Leu-257, Ala-261, Serina na posição 289 (Ser-289) e uma parte alifática da Arginina na posição 257 (Arg-257). A outra extremidade da molécula é arranjada próxima da entrada polar na cavidade de ligação. O nitrogênio do grupo amida da fração sulfonamida forma uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonil do aminoácido Ala-291, enquanto um dos átomos de oxigênio do grupo SO₂ forma uma ligação

de hidrogênio da cadeia lateral da Arg-222 em um lado da entrada da cavidade. O grupo carboxilato do aminoácido forma duas interações eletrostáticas com as cadeias laterais básicas dos amino ácidos Lys-199 e Arg-222.

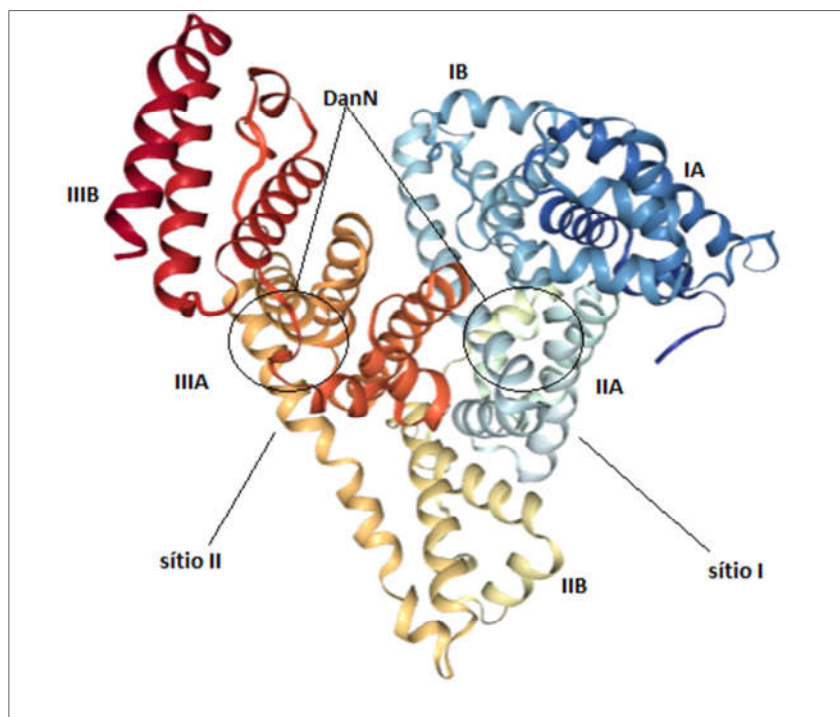


Figura 2. Visão geral da DanN vinculada aos sítios I e II dos fármacos na HSA

Essas observações foram consistentes para provar que a maior afinidade da danil-*L*-asparagina interage com o sítio I da HSA. GHUMAN *et al.*, 2005 relataram que DanN interage fracamente com o subdomínio IB, em que os grupos de aminoácidos estão todos expostos ao solvente e suas cadeias laterais não fazem contato significativo com a proteína. O aminoácido DanN não deveria se ligar a este subdomínio na ausência de ácido graxo, resultando assim numa interação cooperativa entre o composto dansilado e o ácido graxo. Segundo SIMARD *et al.*, 2006, essa interação não parece ser tão significativa para aminoácidos dansilados porque a sua ligação é dependente de interações com lipídeos ligados, e que é pouco provável estar presente em condições

normais devido à baixa afinidade do local para ácidos graxos no subdomínio IB (ALI J. R. *et al.*, 2011). Logo, com a existência de ligações de ácidos graxos no subdomínio IIIA elas se sobrepõem extensivamente ao sítio II, impedindo a DanN de se ligar nesta região da proteína.

2.2.3. Interações Do Sítio II

Uma vez que os sítios de ligação de ácidos graxos localizados no subdomínio IIIA se sobrepõem extensivamente com o local do sítio II, estudos realizados por ALI J. RYAN *et al.*, 2011, investigaram três complexos binários para a caracterização do sítio II, na qual apresentaremos dois destes aminoácidos. Dois destes sítios possuíam grandes cadeias laterais hidrofóbicas no grupo de aminoácidos dansil-*L*-norvalina (DanNV), e o aminoácido dansilsarcosina (DanSRC), que por sua vez é um derivado de dansilglicina, apresenta um grupo amida metilada. O grupo dansil é o responsável pelas interações mais importantes destes aminoácidos no sítio II da HSA.

O grupo dansil dos aminoácidos DanNV e DanSRC ocupam a mesma posição no local de ligação entre as cadeias laterais de Asn-391 e Phe-403 de um lado e Leu-453, do outro lado, como mostra a Figura 3a e 3b (PDB: 2XVQ e 2XW1, RYAN, A.J. *et al.*, 2011). O grupo da dimetilamina ocupa a parte mais profunda da cavidade proteica, interagindo com as cadeias laterais apolares de Ile-388, Val-433 e a ligação dissulfeto formada por Cys-393 e Cys-438 (BHATTACHARYA *et al.*, 2000, GHUMAN *et al.*, 2005).

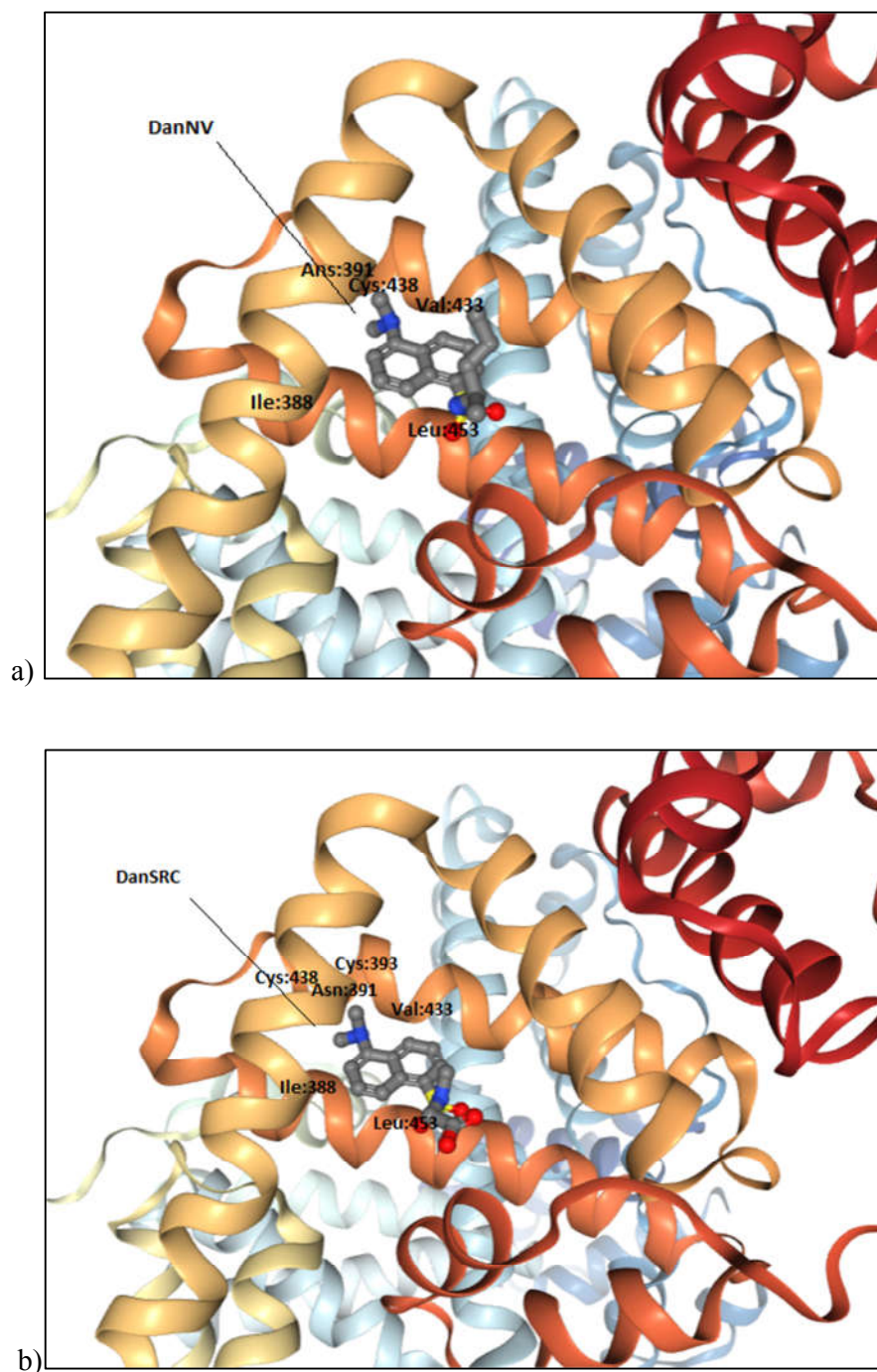


Figura 3. (a) DanNV e (b) DanSRC, comparação da ligação ao sítio II de fármacos da HSA

Os aminoácidos dansilados que apresentam o grupo SO_2 ocupam a mesma posição que o grupo SO_3 do composto sulfato de indoxila que é uma toxina urêmica ligada à proteína derivada do metabolismo do triptofano presente na dieta (BARRETO

et al., 2014). Em relação ao átomo de oxigênio dos dois aminoácidos dansilados, DanNV e DanSRC que estão ligados ao grupo SO_2 , um deles forma uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral de Tyr-411. Portanto, a distância entre esses grupos é de 3,7 Å para DanNV e 4,1 Å para DanSRC. A variação dos valores das distâncias de ligação é devido às possíveis orientações dos grupos SO_2 que aparecem de acordo com o posicionamento dos grupos dos diferentes compostos dansilados. Os grupos carboxilato destes aminoácidos formam uma interação eletrostática com a cadeia lateral de Lys-411.

Na presença de DanNV ou DanSRC, a cadeia lateral de Arg-410 sofre uma rotação girada em direção ao solvente, de maneira que desta rotação aparece uma parede hidrofóbica no local do sítio II que entra em contato com as cadeias laterais apolares de DanNV e o grupo metilo adicionado à sulfonamida em DanSRC. As cadeias laterais hidrofóbicas de Leu-396, Phe-403, Ala-406, Leu-407 e a porção apolar de Arg-410 são os principais contatos feitos por esses grupos funcionais apolares. Logo, essa parede hidrofóbica do local do sítio II, não é suficiente para a fixação completa das cadeias laterais dos aminoácidos dansilados, que permanecem parcialmente expostos ao solvente (SUDLOW *et al.*, 1975).

Segundo SUDLOW *et al.*, 1975, o sítio II é um local secundário para ligações dos compostos específicos localizados no sítio I. Como mencionado no tópico anterior, a unidade dansilada de DanN se liga a cavidade do mesmo forma observada para DanNV e DanSRC. Apesar disso, a polaridade da cadeia lateral Asn de DanN sofre uma rotação em relação às conformações observadas para as cadeias laterais de DanF e DanNV e não faz contato com a parede hidrofóbica formada por Leu-396, Phe-403, Ala-406 e Leu-407. Apesar de que a cadeia lateral de Asn permite fazer uma única ligação de hidrogênio (3,2 Å) com a cadeia lateral de Asn-391, isto parece insuficiente para superar a sua incapacidade de se tornar favorável contatos apolares com o bolso e

provavelmente respondem pelo menor afinidade de DanN para o sítio II (SUDLOW *et al.*, 1975).

Dos três aminoácidos estudados, a DanSRN por ser derivada da dansilglicina, apresentou um interesse maior para compreensão da interação da DanGly no sítio da HSA. A DanSRC não se liga ao sítio I devido a presença de uma ligação de hidrogênio do grupo amida central dos aminoácidos dansilados para a cadeia principal de oxigênio do grupo carbonilo de Ala-291. Por apresentar um grupo amida na sua estrutura o DanSRC é bloqueado por uma metila, não podendo fazer a interação de ligação de hidrogênio onde as estruturas da metilação da amida criaria um choque estérico com Ala-291 impedindo o grupo dansil de DanSRC de adotar a conformação favorecida pelos compostos específicos do sítio I como o DanN.

2.3. Dansilglicina (DanGly)

A Dansilglicina apresentada na Figura 4 pertence a uma classe de aminoácidos dansilados, que são largamente utilizados como sondas de fluorescência para a caracterização de locais de ligação na proteína albumina. A caracterização de como um fármaco se liga à albumina permite a realização de análises farmacocinéticas, quando um novo medicamento é descoberto ou sintetizado.

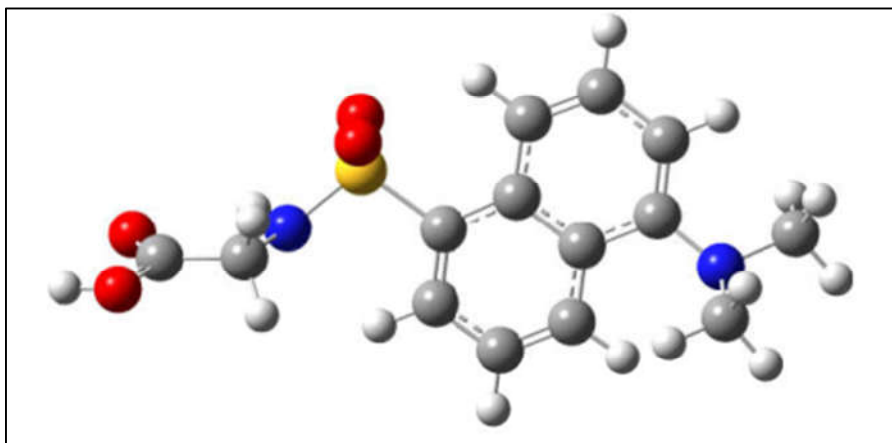


Figura 4. Molécula da Dansilglicina

Como fármacos dos mesmos sítios de ligação na HSA competem entre si pela ligação à proteína, sua distribuição e metabolismo no sangue é alterada. Deste modo, é importante identificar o sítio de ligação de um fármaco na HSA.

Está bem estabelecido que a estrutura tridimensional da HSA é dependente do pH, e várias conformações foram caracterizadas. Entre eles, a forma normal (N) em pH 7,0, forma básica (B) em pH acima de 8,0 e a forma de migração rápida (F) em pH abaixo de 4,3. Estas formas são caracterizadas por alterações nas proporções do conteúdo da hélice alfa e da folha-beta, e também na sua estrutura terciária (CHATTERJEE T. *et al.*, 2012). Com a diminuição do pH induz uma expansão da proteína e o deslocamento do domínio IIIA, que atinge o deslocamento máximo em cerca de pH 2,5. Por outro lado, a forma básica é caracterizada pela perda de rigidez, que afeta a região N-terminal da proteína (DOCKAL M. *et al.*, 2000).

De acordo com GRACIANE e XIMENES *et al.*, 2013, a HSA em meio básico (pH 7,0 e 9,0), e em meio ácido (pH 2,0), perde parcialmente sua capacidade de ligação com a DanGly. Logo em pH 3,5 a proteína reteve a maior parte de sua capacidade de

ligação à DanGly, lembrando que, em pH 3,5, a HSA já estava expandida e a separação do domínio IIIA do restante da molécula é a principal alteração da proteína.

2.3.1. Técnicas Para O Estudo Da Ligação De Fármacos

Elucidamos no capítulo anterior que a HSA interage com uma série de compostos endógenos e exógenos relativamente insolúveis e uma grande variedade de fármacos, permitindo o seu transporte por todo o corpo. Porém, quando possui uma alta afinidade com o fármaco a HSA reduz a concentração livre do mesmo, operando de maneira favorável ou como uma desvantagem para a sua eficácia, dependendo do alvo do fármaco (PETERS, 1996). Como a HSA apresenta características de extrema importância, novos estudos tem se voltado para investigação da interação fármaco-proteína com métodos mais específicos.

Algumas das técnicas mais utilizadas são adequadas para determinar os parâmetros de ligação de fármacos às albuminas séricas, como ultrafiltração (UF), calorimetria de titulação isotérmica (ITC), e biossensores ópticos, fluorescência, dicroísmo circular eletrônico (ECD) ressonância magnética nuclear (RMN) espectroscopia na região do Ultra Violeta e do Visível do espectro eletromagnético, cristalografia de raios X e espectrometria de massa (MS) (BERTUCCI *et al.*, , 2010). Ressaltando-se que toda técnica apresenta suas vantagens e desvantagens, porém sempre auxiliando na maior compreensão dos processos biológicos (BERTUCCI *et al.*, 2008). Devido ao grande número de técnicas, e como este estudo utilizou as técnicas de espectroscopia na região do Ultra Violeta e do Visível do espectro eletromagnético e espectroscopia de dicroísmo circular eletrônico, discutiremos a seguir com mais detalhes as mesmas.

2.3.2. Espectroscopia Na Região Ultra Violeta E Do Visível

Nas regiões do espectro eletromagnético, que chamamos de Ultra-violeta (UV) e visível (VIS) a maioria das moléculas orgânicas e dos grupos funcionais são transparente. A região do espectro eletromagnético situa-se de 190 nm a 800 nm.

2.3.3. Excitações Eletrônicas

Quando uma radiação continua atravessa um material, uma parte da radiação pode ser absorvida. Assim, a radiação residual, ao atravessar um prisma, produz um espectro, conhecido como espectro de absorção.

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 excitadas 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. A transição mais provável é do orbital ocupado de maior energia (HOMO) para o orbital de menor energia (LUMO) (PAVIA *et al.*, 2016).

2.3.4. Dicroísmo Circular Eletrônico (ECD)

A espectroscopia de dicroísmo circular eletrônico (ECD) é uma técnica em que o ECD de moléculas é medido em uma faixa de comprimentos de onda do espectro

eletromagnético; e largamente utilizada para estudar moléculas quirais de todos os tipos e tamanhos, mas é no estudo de moléculas biológicas de alto peso molecular, onde encontra suas aplicações mais importantes.

A técnica se baseia na irradiação da substância por luz circularmente polarizada na região do UV-Vis do espectro eletromagnético, onde as medições realizadas na região visível e ultravioleta são monitoradas pelas suas transições eletrônicas. Quando a molécula em estudo apresenta cromóforos quirais, a luz polarizada circularmente na orientação esquerda (E-LPC) será absorvida em maior extensão do que a luz polarizada circularmente com orientação para a direita (D-LPC) o sinal do ECD sobre os comprimentos de onda correspondentes apresentarão valores diferentes de zero.

O dicroísmo circular pode apresentar um sinal positivo ou negativo, dependendo se E-LCP é absorvida em maior extensão do que D-LCP (sinal de CD positivo) ou em menor extensão (sinal de CD negativo). Para entender realmente o dicroísmo circular, primeiro é preciso entender os conceitos básicos de polarização, sendo assim os próximos tópicos irão elucidar estes conceitos.

2.3.4.1. Origem Da Luz Circularmente Polarizada

A luz linearmente polarizada é a luz em que as suas oscilações são limitadas num único plano. Podendo ser descrita como a soma de dois estados de polarização linear, formando um ângulo reto entre si, conforme representado na Figura 5.

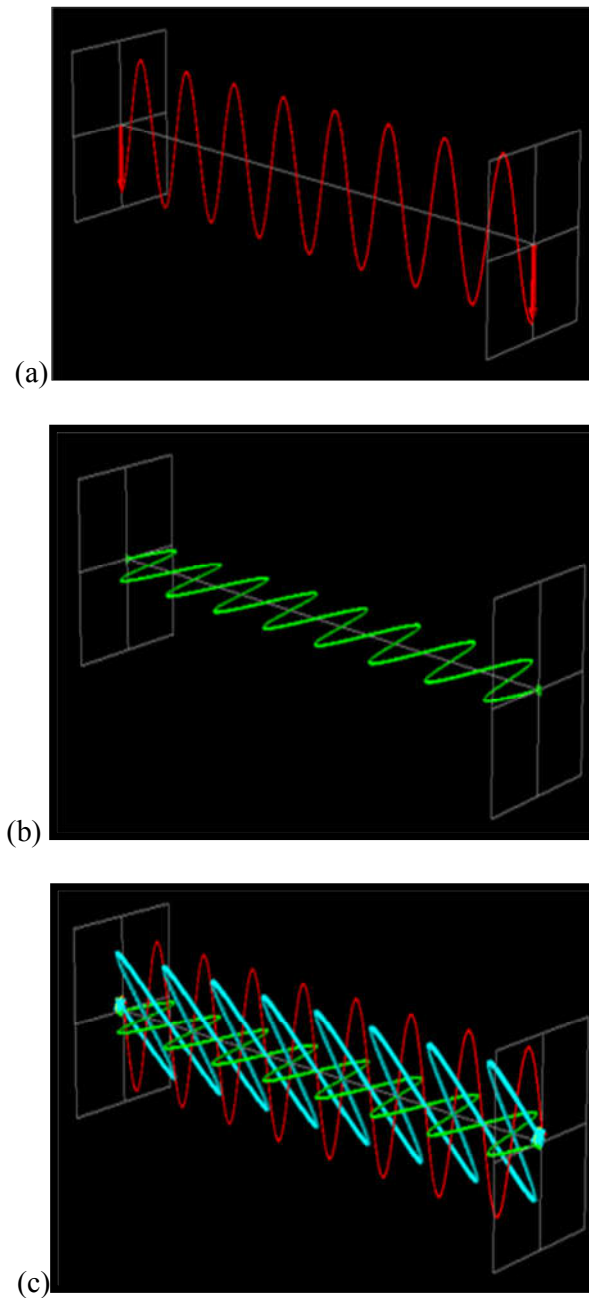


Figura 5. (a) Luz verticalmente polarizada; (b) Luz horizontalmente polarizada e (c) Formando um vetor resultante num ângulo de 45° . (An introduction to circular dichroism spectroscopy, 2013, documento eletrônico)

Caso os dois estados de polarização estiverem fora de fase por um quarto de onda, a componente linearmente polarizada deixa de ser formada e a resultante será a formação de uma hélice conhecida como luz circularmente polarizada (LCP),

comportando como hélices à direita ou à esquerda, onde suas imagens espelhadas não são sobreponíveis. O elemento que converte luz linearmente polarizada em luz circularmente polarizada é denominado de placa de quarto de onda, sendo constituído por um material anisotrópico, ou seja, seu índice de refração depende da direção (birrefringência).

No espectrofotômetro de ECD já apresenta um elemento óptico especializado responsável pela conversão de luz linearmente polarizada em luz circularmente polarizada, chamado de modulador foto elástico (PEM). O PEM é um elemento piezoelétrico, que possui a capacidade de gerar tensão elétrica em alguns cristais por meio de uma pressão mecânica, onde é cimentado a um bloco de sílica não birrefringente. Quando o PEM oscila numa frequência aproximadamente de 50 kHz ele provoca um stress no gel permitindo com que ele se torne birrefringente. Assim sendo, a sílica se funde e se transforma em uma placa de quarto de onda dinâmica retardando as fases vertical e horizontal de luz linearmente polarizada de forma alternada, gerando luz circularmente polarizada à esquerda e à direita.

A base conceitual do dicroísmo circular é diferença de absorbância da luz polarizada circularmente à esquerda e à direita. Para que uma molécula seja quiral, ou opticamente ativa, ela precisa absorver D-LCP e E-LCP, como mostrado na Figura 8. O sinal do CD é definido como a variação da absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita como apresentada na equação 1 :

$$CD: A(\lambda)_{LCPL} - A(\lambda)_{RCPL} \quad (1)$$

Onde A_{LCPL} e A_{RCPL} , são as absorções da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita.

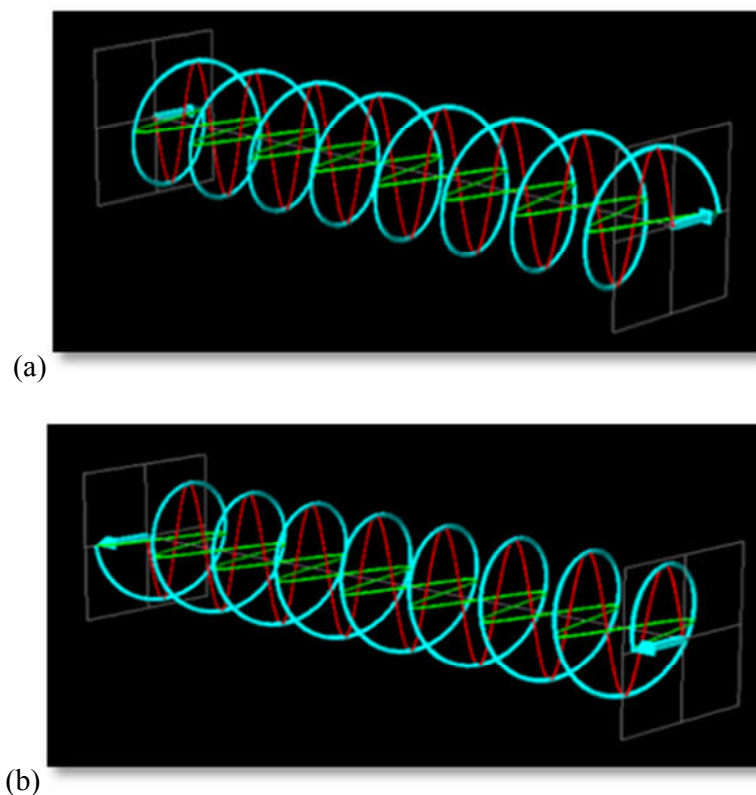


Figura 6. (a) Luz circularmente polarizada à esquerda; (b) Luz circularmente polarizada à direita((An introduction to circular dichroism spectroscopy, 2013, documento eletrônico)

Pelo fato das moléculas quirais apresentarem birrefringência circular, ou seja, possuem características anisotrópicas, permitem com que a luz circularmente polarizada à direita e à esquerda se propagam em diferentes velocidades. Enantiômeros de moléculas quirais, irão apresentar sinais opostos no CD, diferentes valores do CD, interagindo de maneira diferente com a luz circularmente polarizada. (BEROVA *et al.*, 2007). Um grupo de moléculas responsável por sua cor, ou como uma substância que tem muitos elétrons capazes de absorver energia ou luz visível, assim excitando-se e emitindo cores, são chamados de grupos cromóforos.

Moléculas que possuem cromóforos quirais causam alterações na luz incidente, da forma circular para a elipsoidal, devido à absorção de radiação em diferentes amplitudes para a direita (RCPL, da sigla em inglês *Right Circularly Polarized Ligth*) e para a esquerda (LCPL, da sigla em inglês *Left Circularly Polarized Ligth*). Esta alteração é detectada pelo aparelho, originando um gráfico de comprimento de onda (nm) pela diferença de absorção das componentes LCPL e RCPL, e a medida será dada pela tangente da elipse gerada em miligraus (mdeg), positiva ou negativa. A maior parte das moléculas biológicas são quirais, e os aminoácidos das proteínas são quirais, as moléculas da estrutura DNA e RNA, entre outras moléculas apresentam quiralidade.

O uso do dicroísmo circular na bioquímica é devido à compreensão das estruturas quirais, podendo ser usado para identificar elementos estruturais e acompanhar mudanças na estrutura de macromoléculas quirais. Estruturas secundárias como α -hélice, folhas β ou desordenada exibem sinais de CD específicos que servem como uma espécie de assinatura, possibilitando seu monitoramento de acordo com as interações com outras moléculas, alterações de temperatura, pH e oxidantes, como na Figura 7. O espectro de ECD em comprimentos de onda do UV distante (abaixo de 260 nm) pode ser usado para fornecer informações referentes às características das estruturas secundárias da proteína, já na região próxima do UV (260-320 nm) informações sobre a estrutura terciária são determinadas (KELLY *et al.*, 2000).

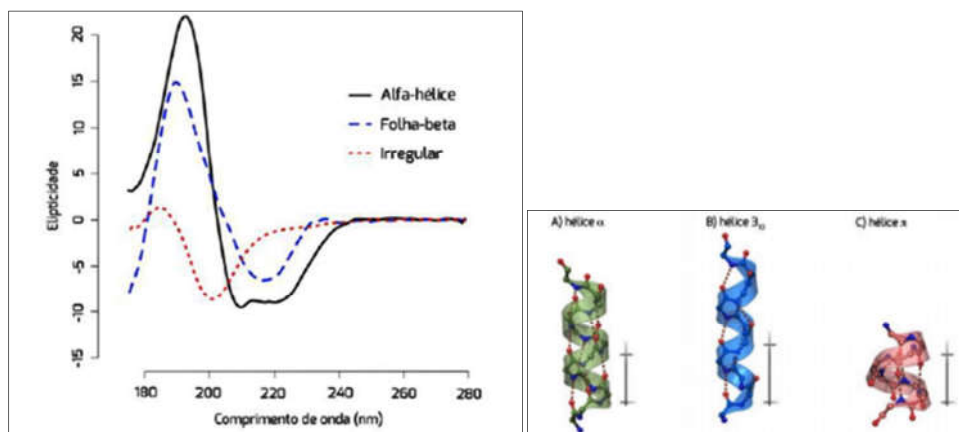


Figura 7. Sinais de CD em estruturas secundárias de proteínas. (Bioinformática-DicroísmoCircular, 2016, documento eletrônico)

O fato do CD poder registrar espectros em minutos e a cinética de comprimento de onda única ser registrada a partir de milissegundos em diante, ele se configura como uma poderosa ferramenta para acompanhar mudanças dinâmicas na estrutura proteica. Uma poderosa aplicação do dicroísmo circular é comparar duas macromoléculas, ou a mesma molécula em diferentes condições, e determinar se elas têm uma estrutura similar ou se ocorreu mudança na sua conformação.

2.3.5. Molécula Quiral

Uma molécula quiral se caracteriza por não ser sobreponível, sendo assim, o ramo da química que estuda estas propriedades é conhecida como estereoquímica. A seguir, iremos tratar a respeito da isomeria e como ocorre sua divisão, com o intuito de esclarecermos futuros resultados nos capítulos seguintes. A isomeria se classifica como sendo um fenômeno em que apresenta dois ou mais compostos com fórmulas

moleculares iguais, porém estruturas químicas ou arranjos dos átomos diferentes, conferindo características químicas diversas.

2.3.5.1. Enantiômeros

Um enantiômero existe sob forma de dois pares de isômeros, e não são sobreponíveis, mas sim simétricos em relação a um plano, como na Figura 8:

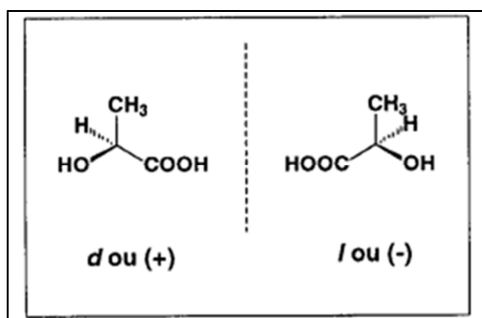


Figura 8. Um par de enantiômeros. (LIMA, V. L. E., 1997, documento eletrônico)

Os desvios polarimétricos opostos como apresentados na figura 8, são de mesma magnitude e o ângulo de rotação α é a rotação observada experimentalmente (CAREY *et al.*, 1992).

$$+ \alpha (+) \text{ ou } d (\textit{dextro})$$

$$- \alpha (-) \text{ ou } l (\textit{levo}),$$

Quantidades iguais de enantiômeros (50:50) em misturas, são chamamos de mistura racêmica. São opticamente inativas por cancelarem o desvio da luz polarizada à direita ou à esquerda, ou seja, quando um enantiômero desvia a luz polarizada para direita num determinado ângulo, o outro enantiômero desvia a luz polarizada para a esquerda na mesma proporção, porém na direção oposta.

Definido pelo Físico Francês Biot em 1860 o poder rotatório específico depende das condições experimentais, e apresenta grande importância na caracterização de um composto, sendo uma propriedade intrínseca de uma molécula opticamente ativa.

A medida da atividade ótica que é obtida num polarímetro pode ser traduzida pelo poder rotatório específico, e também ser usada em análises estruturais e análises quantitativas de substâncias opticamente ativas. Sendo definida como:

$$[\alpha] = \frac{100\alpha}{cl} \quad (2)$$

Onde, $[\alpha]$: rotação específica, α : rotação observada, c : concentração da amostra em g mL⁻¹ de solução e l : comprimento do tubo do polarímetro, em dm.

2.3.6. Dicroísmo Circular Induzido (ICD)

Apesar da técnica de ECD ser associada diretamente com a existência de espécies quirais, moléculas simétricas também podem ser estudadas. Pelo fato de estarem num ambiente quiral, essas moléculas podem vir a adquirir quiralidade e no mais, tornando-se propícias a análises. Este fenômeno é chamado de dicroísmo circular induzido (ICD - *Induced Circular Dichroism*) (BEROVA *et al.*, 2007).

Os fatores que podem ser considerados para uma substância aquiral, apresentar quiralidade quando colocada num ambiente com espécies quirais são evidenciadas pelas interações com o meio anisotrópico, originando assim uma restrição de liberdade conformacional devido a interações intermoleculares (GOTTARELLI, 2008; PESCITELLI *et al.*, 2014). A espectroscopia de ICD além de determinar as constantes de afinidade de ligantes, permite também obter informações sobre a estereoquímica da fármaco. Quando uma substância é quiral (ex.: HSA) e a outra substância aquiral (ex.:

fármaco) o ICD detecta o sinal do complexo formado, devido suas fortes transições de dipolo. (BEROVA; DI BARI; PESCIPELLI, 2007). Sua importância na área farmacêutica proporciona importantes informações a respeito da validação de novos fármacos, compreendendo assim sua interação proteína-fármaco (ALLENMARK, 2003; TEDESCO; BERTUCCI, 2015). A banda no ICD só pode ser observada quando o complexo é formado: proteína-ligante, de acordo com o comprimento de onda análoga ou igual ao da parte cromófora do ligante (NOZAKI, 2009; DI BARI *et al.*, 2010). Em muitos outros trabalhos foram apresentados o uso do ICD como forma de obter informações a respeito da interação e estereoseletividade de sítios de ligação da HSA, e a possibilidade de identificação dos estereoisômeros em meios biológicos (BERTUCCI; PISTOLOZZI *et al.*, 2008). Estudos foram realizados para demonstrar esta quiralidade induzida em alguns fármacos, com fenilbutazona, diazepam, cetoprofeno, varfarina, entre outros.

De acordo com os autores BERTUCCI E PISTOLOZZI *et al.*, 2008, o impacto da estereoseletividade na atividade biológica explica o crescente interesse pelos mecanismos moleculares envolvidos pela interação ligante-albumina que foi comprovada em diferentes tipos de proteínas séricas como, albumina de soro humano (HSA), albumina de soro bovino (BSA), albumina de rato (RSA) e albumina de cão (DSA). Mostrando que todas as interações de ligantes aquirais se comportaram como quirais, quando formado o complexo com a albumina, apresentadas na Figura 9.

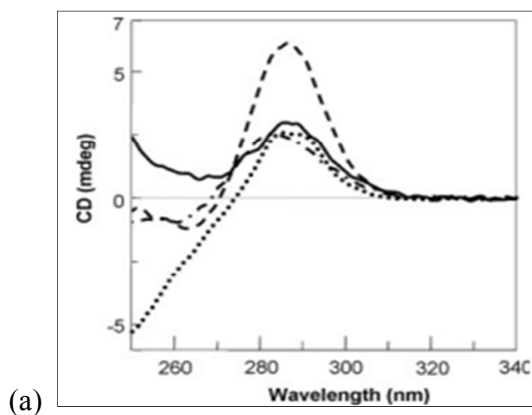


Figura 9. (a) Espectro de Dicroísmo Circular Induzido em complexos de fenilbutazona ligada com HSA(____), BSA(-----), RSA(.....) e DSA(-.-.-.-) [albumina]=100 μ M em tampão fosfato 67mM, pH 7,4. Caminho óptico 0,1 cm (PISTOLOZZI; BERTUCCI, 2008)

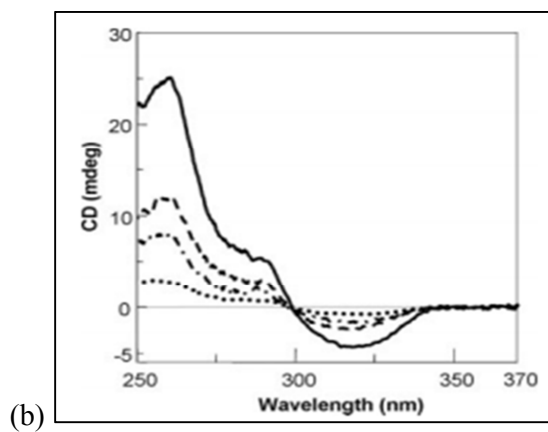


Figura 9. (b) Espectro de Dicroísmo Circular Induzido em complexos de diazepam ligado com HSA(____), BSA(-----), RSA(.....) e DSA(-.-.-.-) [albumina]=100 μ M em tampão fosfato 67mM, pH 7,4. Caminho óptico 0,1 cm(PISTOLOZZI; BERTUCCI, 2008)

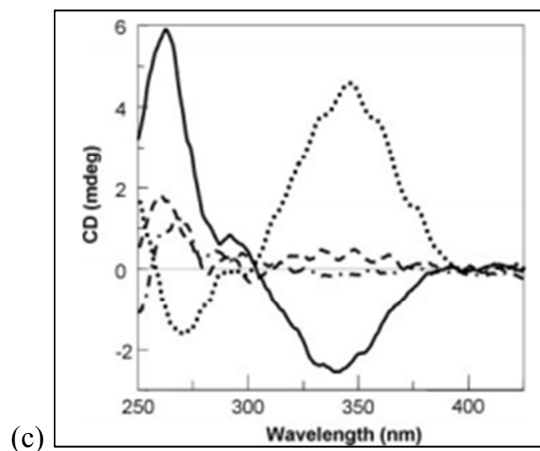


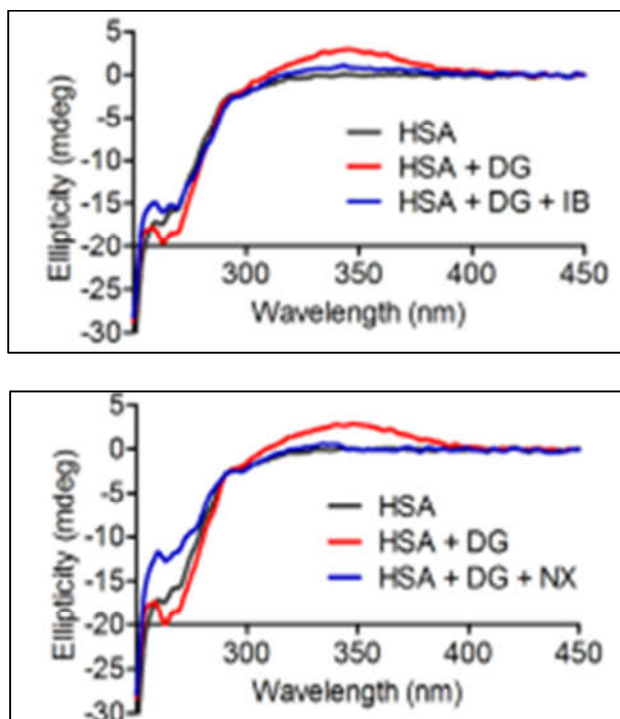
Figura9. (c) Espectro de Dicroísmo Circular Induzido em complexos de bilirrubina ligada com HSA(____), BSA(____), RSA(.....), e DSA(-.-.-.). [albumina]=100 μ M em tampão fosfato 67 mM, pH 7,4. Caminho óptico 0,1 cm. Com o BSA a bilirrubina apresentou sinais opostos de CD, indicando enantiômero inverso àquele encontrado em outros tipos de albumina (PISTOLOZZI; BERTUCCI, 2008)

O ICD vem sendo usado também com outra finalidade da determinação dos sítios específicos de ligação entre fármacos e albumina (NOZAKI *et al.*, 2009; DI BARI *et al.*, 2010). Pelo fato de alguns complexos fármaco-proteína não exibirem sinais CD, alguns ligantes foram classificados como marcadores no intuito de sinalizarem um local específico de ligação ou uma alteração sofrida por este, através do sinal ICD (aumento, diminuição ou deslocamento).

A realização de testes de competição com substâncias que apresentam afinidades com um determinado sítio específico, e que exibem sinais de ICD, como fármacos específicos ou moléculas bioativas com a albumina, podem ser consideradas marcadores, tais como: cetoprofeno, fenilbutazona, diazepam, bilirrubina e dansilglicina (PETERS,1996; KRAGH-HANSEN; CHUANG; OTAGIRI, 2002; GRACIANNI; XIMENES, 2013).

Segundo GRACIANNI; XIMENES *et al.*, 2013, o aminoácido Dansilglicina, caracterizado como uma sonda fluorescente, se liga no sítio II da HSA, utilizando marcadores como, ibuprofeno, naproxeno (sítio II) e fenilbutazona e warfarina (sítio I), mostrado na Figura 10.

De modo que uma interpretação aceita para marcadores e competidores no ICD é que a ligação não pode causar alterações no espectro de ICD do marcador, mas quando existe a competição direta, ocorre uma diminuição desse sinal. Assim quando ambos apresentam afinidades por sítios diferentes, ocasiona num aumento desse sinal, conceituado como uma interação alostérica causada pela presença do segundo ligante (BERTUCCI; PISTOLOZZI; SIMONE, 2010).



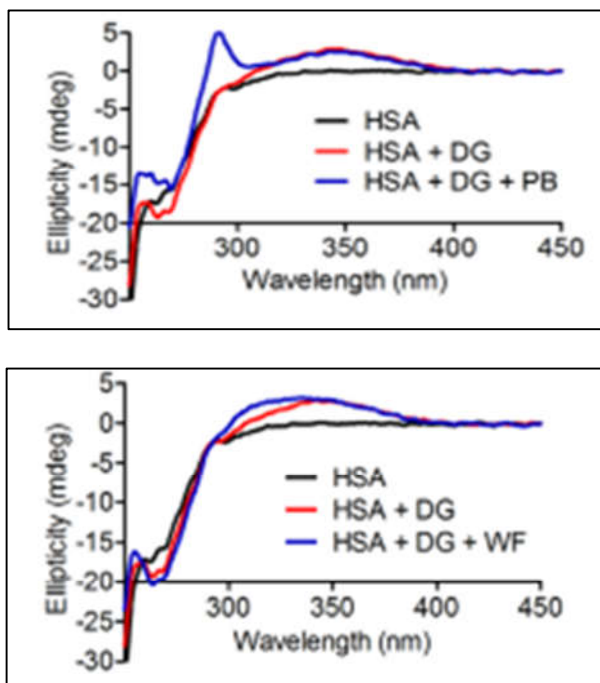


Figura 10. Deslocamento de dansilglicina (DanGly) da HSA por ligantes do site I e II: estudos de dicroísmo circular. As misturas consistiram em HSA 30 mM, DanGly 30 mM e 30 mM de naproxeno (NX), ibuprofeno (IB), fenilbutazona (PB) ou varfarina (WF). (GRACIANE; XIMENES, 2013).

De fato o ICD tem se tornado de suma importância para obtenção de dados mais específicos e confiáveis no estudo de interações proteína-fármaco.

2.3.7. Marcadores

Como mencionamos anteriormente através do sinal ICD os marcadores são usados para sinalizarem um local específico de ligação ou uma alteração sofrida por este. Portanto, iremos elucidar algumas aplicações onde compostos são marcados com o grupo dansil, para que possam ser estudados por fluorescência. SUDLOW *et al.*, 1975, foi pioneiro no estudo de deslocamento de sondas fluorescentes, revelando que a

maioria dos medicamentos se ligam com alta afinidade a um dos dois sítios, chamados sítio I e sítio II.

Na maioria das vezes, sondas fluorescentes são usadas, e a diminuição na fluorescência de uma sonda ligada indica um local de ligação comum. Entre as condições que abrangem o tema, é que a sonda deve se ligar apenas a um sítio da albumina. Algumas exemplos de sondas do site I, além da mais conhecida varfarina, são 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonamida (DNSA), dansilamida, dansil-*L*-glutamina, dansil-*L*-asparagina, dansil-*L*-lisina, e entre as sondas do site II são dansyl-sarcosine, dansyl-*L*-proline, dansylglycine.

Devido a sua importância, as sondas fluorescentes possuem características específicas como o espectro fluorescente pode ser fortemente dependente do solvente que se encontra. Essa característica é conhecida como fluoróforo, por possuírem um momento de dipolo elevado no estado excitado, apresentando deslocamentos do comprimento de onda maiores em solventes polares (LAKOWICZ, 1983). STEARNS *et al.*, 1985, realizaram estudos microscópicos de fluorescência com estramustina dansilada (DnsEM) com o propósito de investigação do mecanismo de captação de estramustina (EM) que é um agente antineoplásico, eficaz no tratamento de tumores prostáticos. São medicamentos utilizados para destruir células malignas e evitar ou inibir o crescimento e disseminação de tumores. A DnsEm interage rapidamente nas margens das células periféricas, sendo sua função determinar os locais de incorporação e ação da EM.

2.3.8. Par De Elétrons Isolados Do Nitrogênio

Neste capítulo trataremos a respeito da inversão do nitrogênio, exemplificando com a amônia. Justifica-se tal capítulo pelo fato da dansilglicina apresentar a mesma característica de inversão, devido o par de elétrons isolados no nitrogênio grupo alfa-amino.

2.3.9. Amônia

Composto químico relativamente abundante tanto no meio ambiente terrestre quanto em objetos no meio interestelar, faz com tenha uma grande relevância de seu estudo (PUC RIO – Certificação Digital Nº 0321142/CA).

Uma característica interessante na molécula de amônia é a inversão do nitrogênio, como apresentado na Figura 11. Estas configurações são intercambiáveis pela transposição de substituintes para o lado oposto do átomo central, com a formação de uma imagem espelhada da molécula original (KNORR *et al.*, 1993; BACH *et al.*, 1982).



Figura 11. Inversão da Amônia

2.3.10. Inversão Dos Ligantes Do Nitrogênio

Na química, a inversão do nitrogênio é caracterizada como um processo fluxional em compostos com um átomo de nitrogênio que tem uma geometria piramidal, como a amônia (NH_3). Ocorre uma oscilação rápida do átomo de nitrogênio e dos substituintes, em que o nitrogênio "move-se" através do plano formado pelos substituintes (GREENWOOD *et al.*, 1997) e a molécula passa por um estado de transição planar (LEHN, 1970).

Em 1934 foi descoberto que o átomo de nitrogênio inverte. O par de elétrons desaparece de um lado, move-se pelo núcleo e reaparece no lado oposto, onde este ato é chamado de tunelamento mecânico quântico. Como o par de elétrons está atravessando o núcleo, o nitrogênio tem apenas três anexos, de modo que este átomo de nitrogênio é trigonal planar com hibridação sp^2 , visto numa amina tetraédrica na Figura 12.

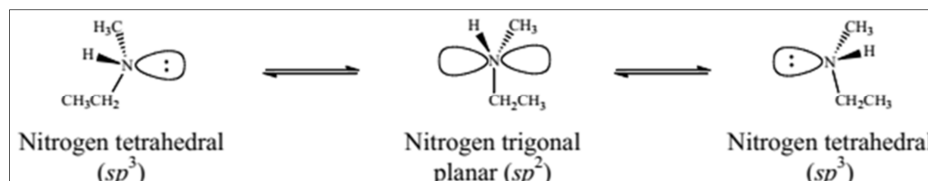


Figura 12. Comportamento do par de elétrons numa amina tetraédrica, e hibridação sp^2 do nitrogênio. (Nitrogen Inversion, 2014, documento eletrônico)

Um átomo de nitrogênio tetraédrico com quatro anexos diferentes, considerando o par de elétrons como um dos anexos, exemplificado na Figura 13, é um estereocentro. Sendo assim, podemos atribuir uma configuração absoluta de acordo com regra de

menor prioridade de Cahn-Ingold-Prelog, considerando o par de elétrons com número atômico igual a zero, por não possuir prótons.

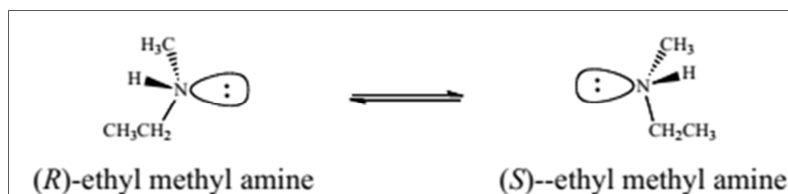


Figura 13. Configuração absoluta de uma amina tetraédrica. (Nitrogen Inversion, 2014, documento eletrônico)

Os enantiômeros de amina apresentado, possuem uma atividade óptica igual, porém por apresentar o equilíbrio 1: 1, a mistura é racêmica e torna-se opticamente inativa. Quando o átomo de nitrogênio apresenta quatro ligações σ , por exemplo, em um cátion de amônio, a inversão é evitada. Sendo assim, se um átomo de nitrogênio tem quatro anexos diferentes e nenhum par de elétrons, o átomo de nitrogênio é um estereocentro, permitindo assim com que a molécula possua todas as propriedades de um estereocentro, como, enantiômeros, opticamente ativos, etc.. Na Figura 14 a seguir, destaca-se em exemplo de um cátion-etil-metil propilamônio, como uma molécula quiral.

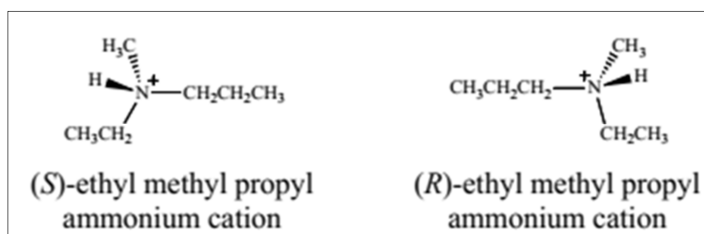


Figura 14. Inversão do nitrogênio evitada, devido a presente de quatro anexos diferentes. (Nitrogen Inversion, 2014, documento eletrônico)

Agora, diferente de um átomo de nitrogênio da molécula etilmetil amina que possui uma estrutura tetraédrica sp^3 , onde os ângulos de ligação C-N-C ou C-N-H são aproximadamente $109,5^\circ$. Quando o par de elétrons “move-se”, ocorre o tunelamento quântico através do núcleo do átomo de nitrogênio fazendo com que a estrutura torne-se planar com o nitrogênio hibridizada sp^2 , e com a mudança dos ângulos de ligação C-N-C e C-N-H de aproximadamente $109,5^\circ$ para 120° . De maneira que em seguida o par de elétrons emerge novamente, e a estrutura retoma sua forma tetraédrica com ângulos de ligação de aproximadamente $109,5^\circ$, como indicado na Figura 15.

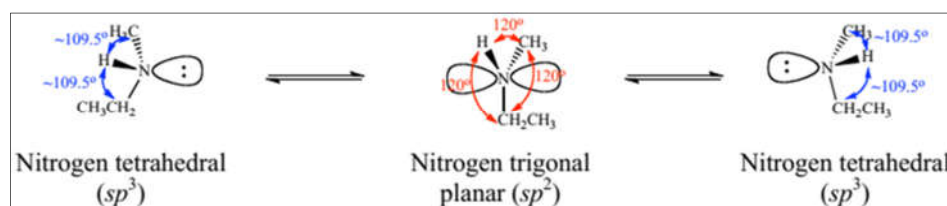


Figura 15. Inversão do nitrogênio, devido o tunelamento quântico apresentada. (Nitrogen Inversion, 2014, documento eletrônico)

Esta mudança de ângulo ocorre com maior facilidade, quando o nitrogênio amina não faz parte de um anel. Entretanto, se o átomo de nitrogênio faz parte de um anel de três membros (chamado aziridina) ou de um anel de quatro membros (chamado de azetidina), a inversão é significativamente retardada por tensão. Contudo, a relevância que o átomo de nitrogênio amina apresenta, se torna imprescindível quando o assunto é direcionado para a área farmacológica. De maneira que, a mudança da estrutura de uma molécula em estudo pode acarretar em efeitos benéficos, ou simplesmente o inverso ao paciente.

2.5. Formalismo E Uso Da Teoria Do Funcional Da Densidade (DFT)

Neste capítulo serão apresentados alguns aspectos formais utilizados nesta dissertação, assim como uma breve revisão dos principais métodos empregados na caracterização computacional de materiais.

Primeiramente será tratado o formalismo e uso da teoria do funcional da densidade (DFT), Teoria funcional da densidade dependente do tempo (TD-DFT) que foram usados em resultados obtidos nesta dissertação. E para a construção da descrição formal, em especial da DFT, foram utilizadas diversas fontes, tais como livros, artigos e *reviews*.

2.5.1. Fundamentos Teóricos Da Modelagem Molecular

Como já mencionados nesta seção serão tratados brevemente alguns conceitos de química teórica tendendo à interpretação da DFT, que será utilizada para descrever e interpretar as conformações de estudo nessa dissertação, assim como os cálculos periódicos realizados.

Um dos principais objetivos da Química Quântica é prever propriedades moleculares quantitativamente e explicar a natureza das ligações químicas. Sendo assim, a DFT surge como uma alternativa em relação aos métodos *ab initio* e semi-empíricos no estudo de propriedades do estado fundamental de sistemas moleculares. Possuindo uma vantagem de velocidade computacional e ganho de memória quando comparado com o método *ab initio* padrão, que é baseado nas equações de Hartree-Fock-Roothan (HRF). Logo, em métodos semi-empíricos o hamiltoniano é bem definido e não apresenta injustificáveis aproximações no procedimento computacional.

O DFT pode ser considerado como um método *ab initio*, por não necessitar de parâmetros para serem ajustados ou empiricamente determinados. Contudo, esse método é útil nos estudos de grandes sistemas moleculares, em que descreve realisticamente sistemas orgânicos, inorgânicos, metálicos e semi-condutores (MORGON; CUSTODIO, 1994). O estado de um determinado sistema, tais como, suas propriedades químicas e físicas, é determinado pela função de onda do mesmo. Sendo assim, para determinar a estrutura do estado fundamental de um sistema de muitos elétrons e núcleos, é necessário resolver a equação de Schrödinger independente do tempo:

$$\hat{H}(\vec{r}, \vec{R})\psi(\vec{r}, \vec{R}) = E_{total}\psi(\vec{r}, \vec{R}), \quad (3)$$

Onde o $\hat{H}$, é o operador hamiltoniano, E_{total} é energia o total do sistema, $\psi(\vec{r}, \vec{R})$ é a função de onda quântica do sistema e $\vec{r}$ e $\vec{R}$ representam as coordenadas dos elétrons e dos núcleos respectivamente. (KOHN, 1964).

$$\begin{aligned} \hat{H} = & - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{|\vec{R}_A - \vec{R}_B|} \\ & - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{|\vec{r}_i - \vec{R}_A|}, \end{aligned} \quad (3.1)$$

Onde $\vec{R}_A$ e $\vec{R}_B$ representam as posições nucleares, $\vec{r}_i$ e $\vec{r}_j$ as posições dos elétrons, Z_A e Z_B as cargas nucleares e M_A a massa do núcleo. (HAHN Y, 2002).

Cada termo da equação é apresentado como: primeiro termo da equação representa a energia cinética dos elétrons; o segundo termo, a energia cinética dos núcleos; o terceiro, a repulsão elétron-elétron; o quarto termo, a repulsão núcleo-núcleo e o último termo representa a atração entre elétrons e núcleos.

Através do Hamiltoniano $\hat{H}$, podemos resolver a equação de Schrödinger para as propriedades dos sistemas quânticos. Pelo fato de apresentar alto número de partículas envolvidas, torna-se inviável o cálculo computacional para este hamiltoniano, necessitando assim de uma aproximação. Proposta por Born e Oppenheimer (VIANNA J D M; FAZZIO A e CANUTO S, 2004), a aproximação se aplica devido a diferenças entre as massas dos núcleos e dos elétrons serem grandes e as forças aplicadas nas partículas são as mesmas, assim os elétrons reajustam-se a cada pequeníssimo movimento dos núcleos. Considera-se então que o problema da parte eletrônica, e o problema de muitos corpos são reduzidos para a resolução da dinâmica eletrônica, pois resulta na separação das coordenadas eletrônicas e nucleares da função de onda de muitos corpos (PAYANE,1992).

De fato, a aproximação de Born-Oppenheimer permitiu com que o problema quântico de muitos corpos se tornasse mais simples. Porém o Hamiltoniano Eletrônico, não apresenta uma solução exata e ainda é impossível para sistemas polieletrônicos, por causa do terceiro termo da equação (3.1) de repulsão elétron-elétron. Sendo assim, a fim de possibilitar o tratamento de diversos problemas de muitos elétrons, existe a necessidade de introduzir novas teorias. Dentre essas teorias, destacamos a Teoria do Funcional da Densidade (Density Functional Theory - DFT). A resolução da equação de Schrödinger é determinada mediante o uso de softwares computacionais especializados. Neste trabalho utilizamos o *software* Gaussian09W (GAUSSIAN, INC., WALLINGFORD CT, 2016).

2.5.2. O Modelo Contínuo De Solvente

Muitos estudos experimentais são feitos para compreender as diversas reações biológicas, no entanto, estudos teóricos a nível de Mecânica Quântica, principalmente usando métodos *ab initio*, possibilitariam um profundo entendimento teórico dessas reações.

Desde a década de 70, muitos esforços têm sido feitos para entender a interação soluto-solvente com a proposta do Campo de Reação Auto-consistente (SCRF) por Tapia e Goscinski (O. TAPIA & O. GOSCINSKI *et al.*, 1975), movidos pelas ideias de Onsager (L. ONSAGER *et al.*, 1936) e Kirkwood (J. G. KIRKWOOD & F. H. WESTHEIMER *et al.*, 1938). Esse método consiste no que conhecemos hoje como modelos contínuos, dentre os quais se destaca o Modelo Contínuo Polarizável (PCM) (J. TOMASI, 2004) que utilizamos nesta dissertação para obtenção dos resultados. Nessa abordagem, constrói-se uma cavidade contendo a molécula do soluto, que é tratada explicitamente, enquanto que o solvente é a região fora da cavidade, caracterizado por uma quantidade limitada de grandezas físicas como a constante dielétrica ou índice de refração. Os multipolos da molécula polarizam esse meio contínuo, gerando um campo que atua na molécula, rearranjando seus multipolos, levando ao procedimento iterativo SCRF.

No *software Gaussian 09W*, o comando SCRF (*Self-Consistent Reaction Field*) é a palavra-chave que solicita que um cálculo seja realizado na presença de um solvente por meio da colocação de um soluto em uma cavidade no interior do campo de reação com solvente. O método PCM no Gaussian 09W é um processo iterativo externo através do qual o programa calcula a energia em solução, através da reação do campo auto consistente com o potencial eletrostático de soluto (ELVIS S. BÖES., 2015). Existem

outros métodos de solvatação implícita, que se diferenciam pela criação da cavidade e pela descrição do potencial eletrostático de interação soluto-solvente.

2.5.3. Modelo SMD

O modelo de solvatação implícita chamado de SMD (Salvation Model - Density) foi desenvolvido para prever a energia livre de solvatação de solutos neutros e iônicos em água e em solventes não aquosos. Para solventes não aquosos, o SMD usa um conjunto de descritores do solvente que caracterizam suas propriedades (MARENICH; CRAMER & TRUHLAR; 2009). Este modelo SMD é baseado no tratamento do campo de reação auto-consistente da densidade eletrostática que envolve uma integração da equação não homogênea de Poisson e do protocolo dispersão-cavidade-solvente-estrutura para a contribuição não eletrostática da energia livre de solvatação. A energia livre padrão de solvatação, que é a energia livre no estado padrão da transferência da fase gasosa para fase condensada, podendo ser particionado de acordo com um novo modelo contínuo de solvatação dado por:

$$\Delta G = \Delta G_{ENP} + G_{CDS} + \Delta G_{conc}^{\circ} \quad (4)$$

onde o subscrito ENP representa as componentes da energia livre eletrônica (E), nuclear (N), e de polarização (P). O componente de relaxação nuclear do termo ENP é igual a diferença entre a energia total calculada da geometria em equilíbrio na fase gasosa e da geometria em equilíbrio na fase condensada. Se assumirmos que a geometria no equilíbrio nas duas fases é a mesma, então o termo ENP se torna apenas o termo (EP) de polarização eletrônica. O subscrito CDS representa as componentes associadas a

mudanças na energia livre, cavitação do solvente(C), variação na dispersão da energia (D), e mudanças na estrutura local do solvente (S). O termo final representa a variação de concentração entre o estado padrão na fase gasosa e na fase líquida.

2.5.4. Método De Hartree-Fock

Em 1947 D.R Hartree, propôs um método auto consistente, para a equação de Schrödinger, que relaciona a interação do elétron com o núcleo e com os demais elétrons de um sistema (ORTOLAN, 2014).

Conhecido como método auto consistente-SCF(*Self Consistent Field*), em que consistia em resolver as equações de Hartree, escolhendo um conjunto inicial de funções, observando o potencial obtido e com este calculava-se as novas funções, e este procedimento se repetia até que os valores de energia final não apresentassem mais variações em suas etapas.(ANTUNES *et al.*,1999)

Após a publicação de três trabalhos realizados por Hartree em menos de um anos (HARTREE, 1928a, 1928b, 1928c), Slater apresentou um avanço para a função de onda se tornar mais simples possível, satisfazendo alguns princípios que as equações de Hartree não cumpria, como a indistinguibilidade e da antissimetria, que ficou conhecida como determinantes de Slater (SILMAR; VENTURA, 2011). Um ano depois da publicação de Slater, Fock aplicou o método de Hartree na forma de determinante de Slater e deduziu as equações conhecidas hoje como Equações de HF.

O método HF, se baseia no SCF, iniciando de uma função de onda tentativa, submetendo-o num operador de Fock, e comparando a função de onda emergente com a anterior, e por fim testando a convergência da resposta (FREITAS, 2008).

2.5.5. Teoria Do Funcional Da Densidade

Na DFT a grandeza principal é a Densidade Eletrônica. Na Mecânica Quântica, o produto $\psi^*(r)\psi(r)$ refere-se à Densidade de Probabilidade descrita pela função de onda $\psi(r)$ de encontrar um elétron cujo estado físico num certo instante. Sendo assim, é viável definir a Densidade Eletrônica como sendo:

$$\rho(\vec{r}) = e\psi^*(\vec{r})\psi(\vec{r}),$$

onde e é o módulo da carga do elétron. Considerando um sistema conveniente de unidades atômicas, sendo:

$$\rho(\vec{r}) = \psi^*(\vec{r})\psi(\vec{r}) \quad (5)$$

Para um sistema microscópico possuindo N elétrons, a Densidade eletrônica pode ser definida como sendo:

$$\rho(\vec{r}) = N \int \psi^*(r, r_2, r_3 \dots r_N) \psi(r, r_2, r_3 \dots r_N) dr_2 dr_3 \dots dr_N \quad (5.1)$$

A integral representa a Densidade de Probabilidade de encontrar um elétron na posição r . O fator N é introduzido de que forma a integral $\int \rho(\vec{r}) d^3r$ seja igual ao número total de elétrons, N .

A repulsão coulombiana existe devido a interação entre os N elétrons no sistema e seus respectivos potenciais externos $\hat{V}_{ext}(\vec{r})$ determinam a hamiltoniana do sistema, ocasionando assim a correspondente Função de Onda e por consequente a obtenção da Densidade Eletrônica de cada sistema. De maneira que:

$$A: \hat{V}_{ext}(\vec{r}) \Rightarrow \rho(\vec{r}) \quad (5.2)$$

De maneira que esta aplicação é inversível:

$$A^{-1}: \rho(\vec{r}) \Rightarrow \hat{V}_{ext}(\vec{r}) \quad (5.3)$$

Contudo, pode concluir que a $\rho(\vec{r})$ determina $\hat{H}$.

Em 1964, Kohn e Hohenberg, apresentaram um trabalho utilizando funcionais de densidade eletrônica ao invés de função de onda, na qual reformularia a mecânica quântica. De maneira, que era possível determinar qualquer propriedade de um átomo ou molécula através da sua densidade eletrônica (MARQUES, BOTTI, 2006).

A Teoria do Funcional da Densidade tem como um dos princípios, os estudos de Kohn e Hohenberg, na qual foram propostos dois teoremas:

1. *A densidade eletrônica do estado fundamental determina unicamente o potencial externo presenciado pelos elétrons.*

Em outras palavras, a função de onda depende somente do potencial externo $\hat{V}_{ext}(\vec{r})$, e se o $\hat{V}_{ext}(\vec{r})$ é determinado pela densidade, então, esta determina toda a energia do sistema (MORGON *et al.*, 1994).

2. *A energia do estado fundamental é também um funcional único de $\rho(\vec{r})$, e atinge um valor mínimo quando $\rho(\vec{r})$, é a verdadeira densidade eletrônica no estado fundamental do sistema.*

Em outras palavras esse teorema indica que, mesmo existindo um número infinito de densidades, apenas a densidade do estado fundamental, pode minimizar a energia do sistema. O uso do método variacional possibilita encontrar a energia no estado fundamental.

Sendo assim, Kohn e Sham em 1965 propuseram que a energia eletrônica seria dividida por vários funcionais. Como mostra a equação 6.

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC} \quad (6)$$

O termo E^T corresponde à energia cinética decorrente o movimento dos elétrons, E^V descrevem a energia potencial de atração núcleo-elétron e repulsão entre pares de núcleos, E^J descreve repulsão elétron-elétron. Estes três primeiros termos referem a energia do sistema, de modo que o termo E^{XC} correspondem a troca – correlação, sendo dividido em E^X que descreve ao funcional de troca e E^C de correlação. Ambos são funções da densidade eletrônica ρ (FORESMAN, FRISCH, 1996).

$$E^{XC}(\rho) = E^X(\rho) + E^C(\rho) \quad (6.1)$$

A energia de correlação, por ser definida como a diferença entre a energia exata de um sistema, que representa uma solução exata não relativística da equação de Schrödinger, e a energia de Hartree-Fock, que é obtida pelo método de Hartree-Fock, têm o objetivo de se aproximar da energia exata do sistema.

De modo que, a aproximação mais simples para o funcional de troca de correlação E^{XC} é o funcional LDA (*Local Density Approximation*), proposto no mesmo trabalho de Kohn e Sham, que posteriormente foram sugeridas outras aproximações mais rigorosas para o funcional E^{XC} , conhecida como GGA (*Generalized Gradient Approximation*), em que considera o gradiente da densidade eletrônica (MARQUES, BOTTI, 2006).

Com a introdução dos funcionais GGA, a teoria do funcional de densidade teve grandes avanços permitindo em 1993 a implementação no programa computacional *Gaussian* (LEVINE, 2000).

2.5.6. Teoria Do Funcional Da Densidade Dependente Do Tempo

O método da Teoria do Funcional da Densidade dependente do tempo

(*Time - Dependent Density Functional Theory*, TD-DFT) foi utilizado para a determinação dos espectros de absorção, na região do UV-Vis Dicroísmo Circular e Transições Eletrônicas (orbitais HOMO e LUMO). Trata-se de uma extensão da DFT, para potenciais efetivos dependentes do tempo.

A abordagem de Runge e Gross considera um sistema de componente único na presença de um potencial externo dependente do tempo para o qual o hamiltoniano toma a forma:

$$\hat{H}(t) = \hat{T} + \hat{V}_{ext}(t) + \hat{W}, \quad (7)$$

onde T é o operador de energia cinética, $\hat{W}$ a interação elétron-elétron, e o $\hat{V}_{ext}(t)$ potencial externo que juntamente com o número de elétrons define o sistema. Toda a informação fornecida pelo sistema está associada a esse potencial. Aplicando esse operador na equação de Schrödinger, temos:

$$\hat{H}(t)\psi(t) = i \frac{\partial}{\partial t} \psi(t), \psi(0) = \psi_0 \quad (7.1)$$

Utilizando a equação de Schrödinger como ponto de entrada, o teorema de Runge-Gross (RG) estabelece que, num instante qualquer, a densidade eletrônica determina, de maneira única, o potencial externo.

A solução da equação de Schrödinger via teorema RG, permitiu obter os resultados dos espectros analisados.

2.5.7. Funcionais Híbridos

Os funcionais híbridos são aproximações para os funcionais de troca-correlação, que integram uma parte do termo de troca exata da teoria de Hartree-Fock, aos termos de troca e correlação, como por exemplo, GGA. De maneira que, esta hibridização permite um aperfeiçoamento de propriedades como a energia de otimização, comprimento de ligações e frequências vibracionais. Existem diversas variações de funcionais híbridos, dentre elas, algumas que são frequentemente utilizadas como exemplo B3LYP (BECKE *et al.*, 1988; Lee; Yang *et al.*, 1988) e CAM-B3LYP. Essa aproximação depende de três parâmetros empíricos, dada por:

$$E_{XC}^{B3LYP}[\rho] = (1 - a)E_X^{LDA}[\rho] + aE_x^{exato}[\rho] + bE_x^{B88}[\rho] + cE_c^{LYP}[\rho] \\ + (1 - c)E_c^{LDA}[\rho] \quad (8)$$

com $a= 0,20$, $b= 0,72$ e $c=0,81$. Logo, E_X^{LDA} refere-se à Energia de Troca na LDA; $E_x^{exato}[\rho]$ à Energia de Troca exata obtida por Becke; $E_x^{B88}[\rho]$ à Energia de Troca com limite assintótico correto, obtida por Becke; $E_c^{LYP}[\rho]$ à Energia de Correlação obtida por Lee, Yang e Parr e $E_c^{LDA}[\rho]$ é a Energia de Correlação na LDA. Já o funcional CAM-B3LYP (T. YANAI *et al.*, 2004) combina as qualidades do B3LYP, incluindo correções de longo alcance (Y. TAWADA *et al.*, 2004).

2.5.8. Funções De Bases

Com o objetivo de estudos em sistemas maiores, algumas séries de simplificações, em destaque de aproximação de Born-Oppenheimer, foram introduzidas para obtenção da função de onda. Algumas metodologias básicas, como o método *ab initio*, permitem esta obtenção da função de onda, buscando calcular a mesmo por minimização de energia do sistema. Dentre os *ab initio*, encontram-se o método autoconsistente (SCF) e o método de Hartree-Fock, que se fundamentam no método variacional.

Para a realização de cálculos atômicos e moleculares a função de onda é uma aproximação algébrica, onde os orbitais atômicos são expandidos em funções de bases. A fim de fornecer uma representação das densidades eletrônicas ou dos orbitais moleculares, com um custo computacional baixo. Sendo assim, dois tipos de funções de base que são muito utilizadas em cálculos de estruturas eletrônicas, como: Função Tipo Slater (STF), que foram inspiradas nos orbitais hidrogenóides e Funções do Tipo Gaussiana (GTF).

2.5.9. Funções Adicionais

Quando tratamos de ambiente atômico, os cálculos Hartree-Fock considera funções de bases com a mesma simetria dos orbitais atômicos ocupados. Sendo assim, funções adicionais são necessárias pelo fato de que a distribuição no ambiente molecular é extremamente mais complexa do que em ambiente atômico.

O conjunto de funções de base no ambiente atômico não considera distorções da nuvem eletrônica, como característica de sistemas multicêntricos. Sendo assim,

determinadas funções de base devem ser acrescentadas na função de base original, quando aplicadas em sistemas moleculares. Conhecidas como funções de polarização e funções difusas.

2.5.10. Funções De Polarização

Estas funções de polarização ajudam na descrição das distorções da nuvem eletrônica em ambiente molecular diferenciando da base original, por apresentar descrição das ligações químicas, e a funções adicionais com momento angular diferente. Como exemplo para o átomo de carbono uma função convencional apresentaria somente funções de base do tipo s e p . No entanto, a inclusão de funções de polarização seria de funções do tipo d , f , g , etc.

O uso das funções de polarização em cálculos moleculares exibe uma diferença entre orbitais atômicos e funções de base. Um exemplo com a molécula de amônia NH_3 , em que sua energia de ativação para formar a ligação de amônia, apresentando uma geometria piramidal, é de 9,243mHartree, entretanto, quando realizado o cálculo HF com conjuntos de base de funções s e p , resulta numa geometria planar. Isso implica pelo fato de que com o cálculo as funções s e p centradas sob átomos não permitem de maneira suficientemente a liberdade matemática para descrever a função de onda para uma geometria piramidal. Logo, os orbitais moleculares, por serem autofunções da equação de Schrödinger, envolvem diversos núcleos em que permitem mais flexibilidade matemática do que os átomos.

O uso dos orbitais atômicos como GTFs são empregados na forma de funções de base correspondentes ao número quântico principal de maior momento angular (l) do

que o orbital de valência. À medida que a adição de funções aumenta o custo computacional também. Uma forma para indicar a presença de funções é o uso de um caractere (*). Assim, 6-31G implica num conjunto de base de funções d adicionais para polarizar funções p na base 6-31G, e utilizando dois caracteres (**), sugere em funções p sobre o hidrogênio (H), como 6-31G** (ARRUDA, 2009).

2.5.11. Funções Difusas

Outro conjunto de funções usualmente incluído em cálculos moleculares é o das funções difusas. Este conjunto é normalmente necessário para o cálculo de propriedades de ânions. Sabemos que as funções de base são frequentemente desenvolvidas em sistemas atômicos neutros. Sendo assim, quando são utilizadas em sistemas aniônicos, a nuvem eletrônica desses sistemas apresenta uma tendência à expansão.

Uma vez que a distribuição eletrônica apresenta uma facilidade de expandir-se ela se relaciona diretamente ao conjunto de base utilizado. Nota-se que o conjunto de base original deve ser aumentado na região de valência, onde são incluídas funções de base do mesmo tipo das funções já existentes, mas com expoentes que descrevam melhor a região de valência. (MORGON, 2001)

A presença de funções difusas é indicada por (+) no nome do conjunto de base. Assim, 6-31+G(d) indica que átomos pesados foram ampliados com uma função s e um conjunto de funções p de expoente pequeno. E uma segunda adição indica a presença de funções s difusas sobre H, por exemplo 6-31++G(3df, 2pd) (ARRUDA, 2009).

Para obter os resultados desta dissertação utilizamos a base 6-311++G(2d,p).

3. OBJETIVOS

O objetivo proposto nesta dissertação é estudar a interação entre a molécula Dansilglicina com a proteína albumina do soro humano tanto do ponto de vista teórico como experimental. O foco deste estudo é a obtenção dos espectros de Dicroísmo Circular Eletrônico da Dansilglicina no vácuo e em solventes como: etanol, metanol, acetonitrila e água. Pretendendo-se estabelecer as conformações de menor energia adotada por esta molécula nos domínios de interação com a HSA através do cálculo da superfície de energia potencial no vácuo e nos solventes citados acima.

3.1. Objetivos Específicos

- i) Obter as estruturas de menor energia para a molécula de Dansilglicina usando do cálculo da superfície de energia potencial no vácuo,
- ii) Calcular o espectro de absorção e de dicroísmo circular eletrônico (ECD) na região do ultravioleta e do visível do espectro eletromagnético das conformações obtidas na superfície de energia potencial no vácuo,
- iii) Realizar os mesmos cálculos descritos nas etapas i e ii para os seguintes solventes: água, etanol, metanol e acetonitrila,
- iv) Comparar os resultados obtidos na simulação computacional com os resultados experimentais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes E Soluções

Dansilglicina (DanGly- $C_{14}H_{16}N_2O_4S$), Albumina do Soro Humano, isenta de ácidos graxos, livre de globulinas, 99% (HSA), Fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4), Fosfato monobásico de sódio 99% (NaH_2PO_4), Acetonitrila 99,8% (C_2H_3N), Tetrahydrofurano 99,5% (C_4H_8O), Metanol 99,9% (CH_3OH), foram fornecidos pela Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Álcool etílico 99,66% (C_2H_6O) fornecido pela J. T Baker Chemical Company (Phillipsburg, New Jersey).

4.2. Preparo De Soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. 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). Os reagentes sólidos foram utilizados com purezas conforme as especificadas anteriormente.

4.2.1. Dansilglicina (DanGly)

Para o preparo de 1,0 mL da dansilglicina (DanGly) 10 mM (Massa Molar = $308,35 \text{ g.mol}^{-1}$), foram pesados 0,00323 g de DanGly e dissolvidos em 1 mL de álcool etílico. A partir desta fizeram-se as diluições necessárias em água, metanol, etanol, acetonitrila e tetrahydrofurano. A solução estoque foi mantida na geladeira e a solução de trabalho foi descartada após a medição.

4.2.2. Albumina De Soro Humano (HSA)

A solução estoque de HSA 1 mM foi preparada medindo-se a massa de 0,066g de HSA e dissolvida em 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0. Depois utilizamos 60,0 μ L dessa solução em 2,0 mL de solução final na cubeta de análise. Apresentando uma concentração final de 30,0 μ M.

4.2.3. Tampão Fosfato

Para o preparo da solução tampão fosfato de sódio 0,05 M em pH 7,0 foram preparadas uma solução de fosfato dibásico de sódio 0,05 M (3,55 g em 500 mL de água) e uma solução de fosfato monobásico de sódio 0,05 M (3,45 g em 500 mL de água). Em um béquer foram adicionados 250 mL da solução de fosfato monobásico de sódio 0,05 M. O ajuste do pH foi realizado em um medidor de pH Analyser modelo 300 Digital (São Paulo, Brasil), adicionando cerca de 320 mL da solução de fosfato dibásico de sódio 0,05 M.

4.3. Estudo Dos Espectros Experimentais E Teóricos

4.3.1. Espectroscopia UV-Vis

As medidas foram realizadas num espectrofotômetro UV-Vis *Lambda 35* (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA). O equipamento foi ajustado para determinar o espectro de absorbância no intervalo de 250-450 nm. O volume de DanGly (100 μ M) foi mantido fixo num valor de 10,0 μ L adicionado em cada solvente num volume fixo de 990,0 μ L, apresentando um volume final de reação 1000,0 μ L. Antes de ser analisada

no equipamento, a placa transparente com as amostras foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos.

4.3.2. Elipticidade: Dicroísmo Circular Eletrônico (ECD)

Os estudos de ECD foram realizados em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Japan) equipado com controle termostatizado e agitação magnética no compartimento da amostra. Todas as medidas foram corrigidas para a absorção do tampão fosfato 0,05M, pH 7.0. Para os estudos na região UV próximo, foi utilizado um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Japan). As medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 3 mL de 10 mm de caminho óptico, concentração de 30 μ M de HSA e 30 μ M de DanGly. Os estudos foram feitos em tampão fosfato 0,05 M, pH 7.0, 25 °C. Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda entre 250- 500 nm, com uma largura de banda de 1 nm, tempo de resposta 1 s, e tempo de varredura de 50 nm/min.

4.3.3. Metodologia Computacional: Teoria Do Funcional Da Densidade E Docking Molecular

As conformações da DanGly em HSA em fase gasosa e nos solventes água, etanol, metanol, acetonitrila, e tetrahidrofurano, foram calculadas em nível DFT utilizando os funcionais híbridos B3LYP e CAM-B3LYP com o conjunto de funções de base 6-311++G(2d,p), usando o programa Gaussian09 e as facilidades computacionais do GridUNESP. No cálculo de ECD e absorção UV-Vis foram utilizados os seguintes parâmetros no programa Gaussian 09: TD(FULL,SINGLET,NSTATES=15)

SCRF(SMD, SOLVENT= solventes utilizados(água, etanol, metanol, acetonitrila e THF). A visualização dos resultados foi feita através do software GAUSSVIEWS 5.0.

Na metodologia de docking molecular foi utilizado o programa GOLD 5.5, sendo que é um programa que utiliza algoritmos genéticos, originando modelos flexíveis do ligante no sítio ativo do receptor, recombinaando segmentos desta cópia aleatoriamente até um conjunto de estruturas possa ser obtido. No programa foram adicionados os átomos de hidrogênio conforme a sua ionização e também foram consideradas as tautomerizações nos aminoácidos da proteína.

A estrutura cristalográfica da HSA foi obtida no Banco de Dados de Proteínas (PDB): código 2XVQ. Essa estrutura possui uma resolução de 2.9 Å, e é uma estrutura de HSA com complexo de Dansil-L-Sarcosina, situada no sítio II. As cavidades de interação de ancoragem na proteína foi de 6 Å, e a função de pontuação utilizada foi o GoldScore, que é uma função definida por quatro componentes: a energia da ligação de hidrogênio entre a proteína e o ligante, a energia de van der Waals entre a proteína e o ligante, a energia de van der Waals interna do ligante e a energia de deformação de torção do ligante.

O melhor resultado obtido no docking foi selecionado e com o auxílio do programa Discovery Studio Visualizer realizou-se os estudos dos resultados obtidos do redocking, no intuito de selecionar apenas os ligantes que convergiram para uma posição similar.

4.4. Tratamento Dos Dados

Os gráficos exibidos neste trabalho foram confeccionados utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00 registrado por GraphPad Software, Inc (Califórnia, USA).

4.4.1. Construção Da Molécula Dansilglicina

Inicialmente a molécula dansilglicina foi construída com o uso do programa Gauss View 5.0.9, apresentada na Figura 16:

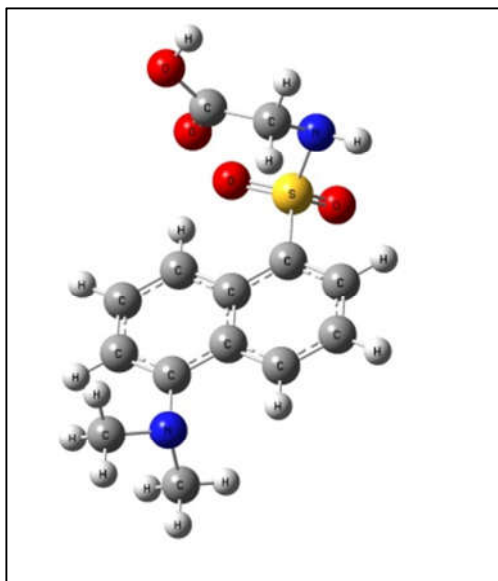


Figura 16. Estrutura molecular da Dansilglicina

Em seguida, foi realizado a otimização na estrutura com o uso do funcional CAM-B3LYP/6-311++G(2d,p) SCF=tight OPT=modredudant. O uso do SCF=tight Permite com que os critérios de convergência da função de onda sejam mais rigorosos.

5. Resultados E Discussão

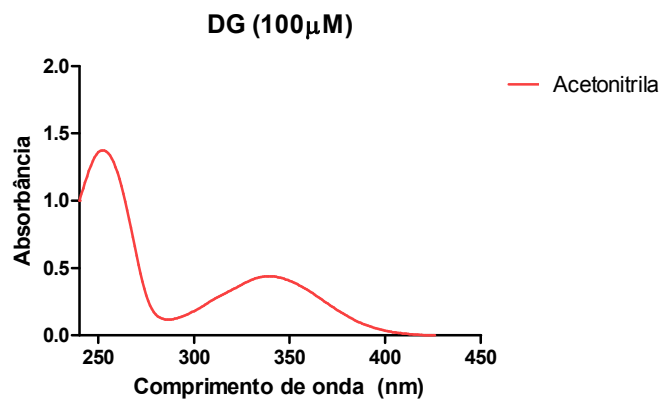
5.1. Absorbância UV-Vis Da Dansilglicina Em Diversos Solventes

Começamos o nosso estudo das propriedades fotofísicas da DanGly em 5 diferentes solventes pela espectroscopia de absorção ótica. Os solventes, numerados de 1 a 5 (Tabela 1), estão classificados de acordo com a classificação de Parker (REICHARDT, 2003) como próticos (1 a 3), apróticos (4 e 5). A Tabela 1 apresenta algumas das propriedades dos solventes: constante dielétrica (ϵ) e momento dipolar (D).

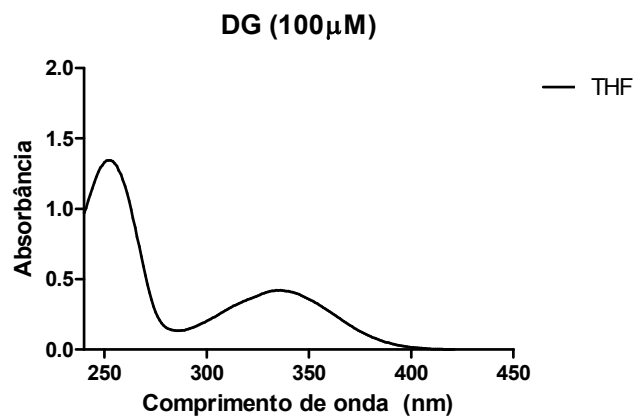
Tabela 1. Propriedades características dos solventes: constante dielétrica (ϵ) e momento dipolar (D)

	Solventes	ϵ	D
1	Água	80	1,85
2	Etanol	24,3	1,69
3	Metanol	33,0	1,7
4	Acetonitrila	36,6	3,92
5	THF	7,52	1,75

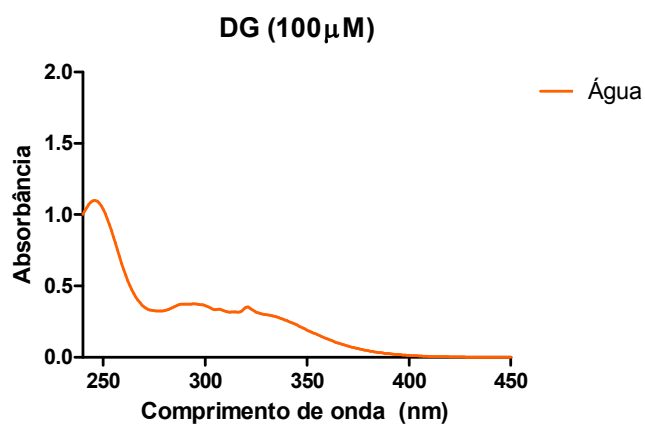
Na Figura 17 apresentamos os (a) espectros de absorção UV-Vis da DanGly nos diversos solventes. Não se observou uma variação expressiva nos máximos de absorção em função dos solventes utilizados, como mostrado na Tabela 2 a seguir. Uma exceção foi com o solvente água, na qual o espectro apresentou-se menos intenso e uma menor definição entre as bandas de absorção.



(a)



(b)



(c)

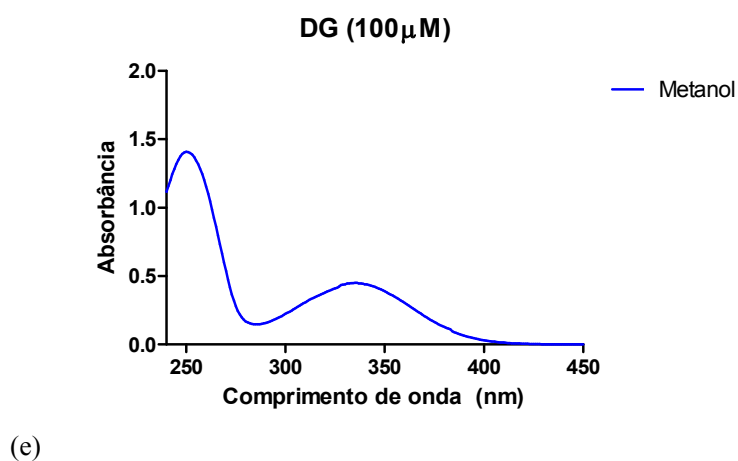
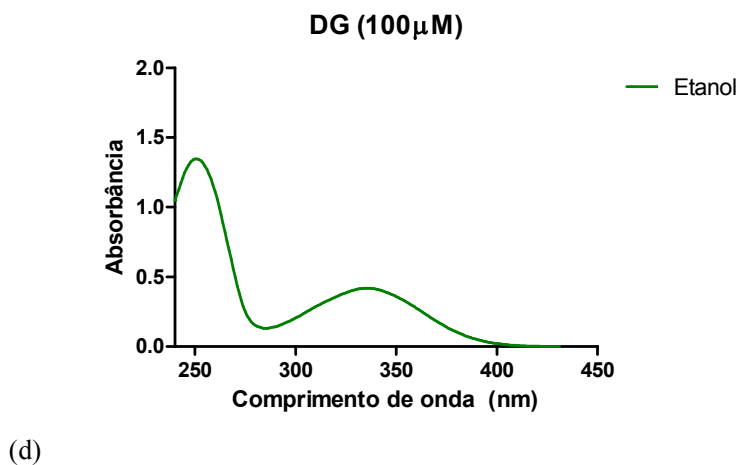


Figura 17. Espectros de absorção da DanGly 100 μ M em diversos solventes. (A) acetonitrila; (B). THF; (C) água; (D) etanol e (E) metanol

Tabela 2. Máximos de absorção nas duas bandas presentes

Solventes	Máximo de absorção ($\pi - \pi^*$)	Máximo de absorção ($n - \pi^*$)
ÁGUA	250	324
METANOL	253	338
ETANOL	253	338
ACETONITRILA	255	343
THF	255	340

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 o elétron, seja promovido de um orbital ocupado para um orbital desocupado de maior energia. Em outras palavras, a transição mais provável é do orbital ocupado de maior energia (HOMO, do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*) para orbital desocupado de menor energia (LUMO, do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Sendo assim, podemos observar que existe a relação ao tipo de transição eletrônica que explicaria as duas bandas presentes nos diversos solventes.

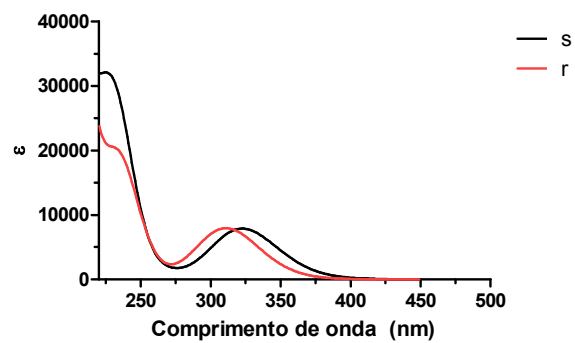
São apresentadas duas bandas de absorção em 340 nm e a de 250 nm, onde tudo indica que a primeira aproximadamente em 250 nm seja $\pi \rightarrow \pi^*$, pois além de menor comprimento de onda, possui maior intensidade (típico desse tipo de transição). A outra, portanto, sendo $n \rightarrow \pi^*$, que geralmente possui menor intensidade e maior comprimento de onda (JOSEPH R. LAKOWICZ, 2006). Sabemos que a polaridade do solvente pode alterar a diferença de energia entre os estados fundamental e excitado, sendo assim, observamos os comprimentos de onda máximos de absorção, na região de 340 nm para o Metanol e THF, devido sua classificação na Tabela 1 apresentada anteriormente, com o objetivo de indicar que esta transição é $n \rightarrow \pi^*$. Na transição $n \rightarrow \pi^*$, com o aumento de polaridade há um aumento da diferença de energia entre os estados fundamental e excitado diminuindo o comprimento de onda. Para termos certeza disso, observamos os comprimentos de ondas máximos de absorção na região de 340 nm apresentados na Tabela 2 para o metanol e comparamos com o THF, de maneira que o metanol apresentou um comprimento de onda máximo em 336 nm sendo menor que comprimento de onda máximo do THF que é de 340 nm. Esta diferença mesmo que

muito pequena refere-se ao fato do metanol apresentar maior polaridade comparado com o THF.

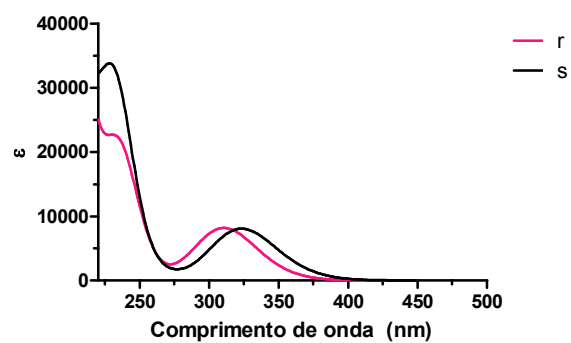
Buscando descrever os efeitos dos solventes na estrutura eletrônica da DanGly, realizamos estudos teóricos através de cálculos quânticos e simulação computacional, para a obtenção da molécula DanGly nas configurações R e S, utilizando o programa GAUSSVIEW 5.0.9 para sua otimização e com o uso do método DFT com o funcional CAM-B3LYP e o conjunto de funções base 6-311++G(2d, p).

5.2. Estudo Teórico Dos Espectros De Absorbância UV-Vis Da Dansilglicina Em Diversos Solventes

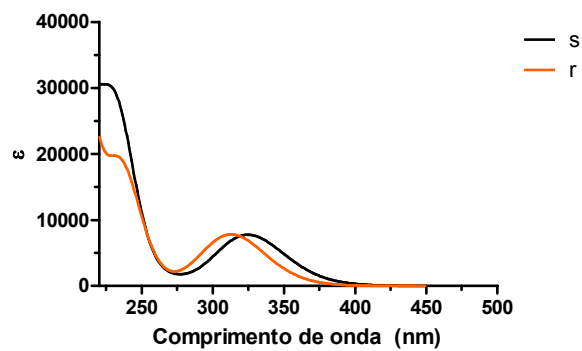
Utilizamos o funcional CAM-B3LYP e a função de base 6-311++G(2d,p), para a simulação dos espectros de absorção da DanGly nos mesmos solventes. Na Figura 18 apresentamos os espectros da DanGly com os diversos solventes e também nas configurações R e S. O comportamento apresentado da DanGly nos gráficos a seguir, confirma uma configuração R quando ligado à HSA, pois os resultados experimentais se relacionam perfeitamente com os dados teóricos apresentados com a configuração R. No entanto, em todos os solventes, observa-se um deslocamento das bandas para menor comprimento de onda em relação aos espectros experimentais. O surgimento da banda em aproximadamente 340 nm se refere a transições $n-\pi^*$, em concordância com os espectros obtidos experimentalmente. Nota-se que nas configurações R e S, observamos em 200-250 nm uma banda bem extensa e duas cristas pequenas presentes em todos os solventes. Acreditamos que sejam transições $\pi \rightarrow \pi^*$ nesta região, devido à presença dos anéis aromáticos.

Acetonitrila

(a)

THF

(b)

Água

(c)

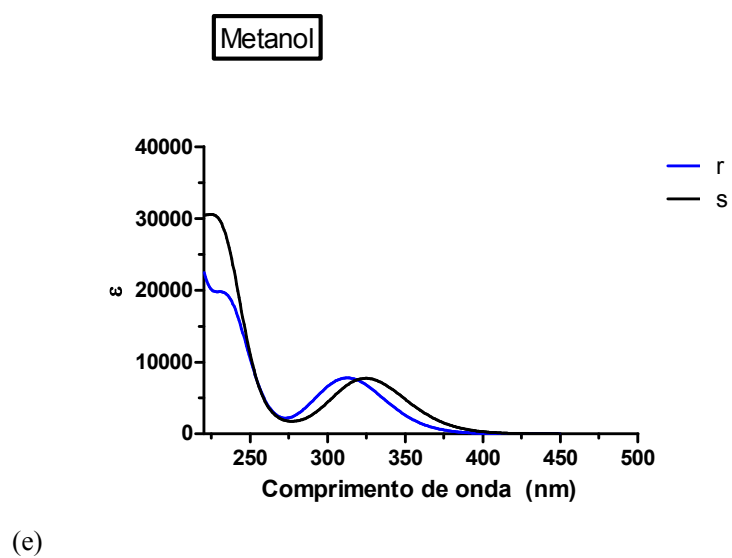
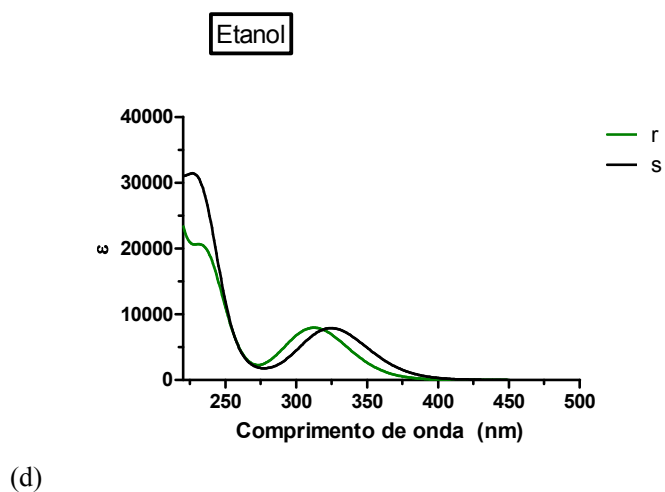


Figura 18. Espectros teóricos de absorção da DanGly (r e s) em diversos solventes. (a) acetonitrila; (b). THF; (c) água; (d) etanol e (e) metanol.

Os modelos das configurações R e S da DanGly são apresentados na Figura 19 e foram construídos com o programa GaussView 5.0.9.

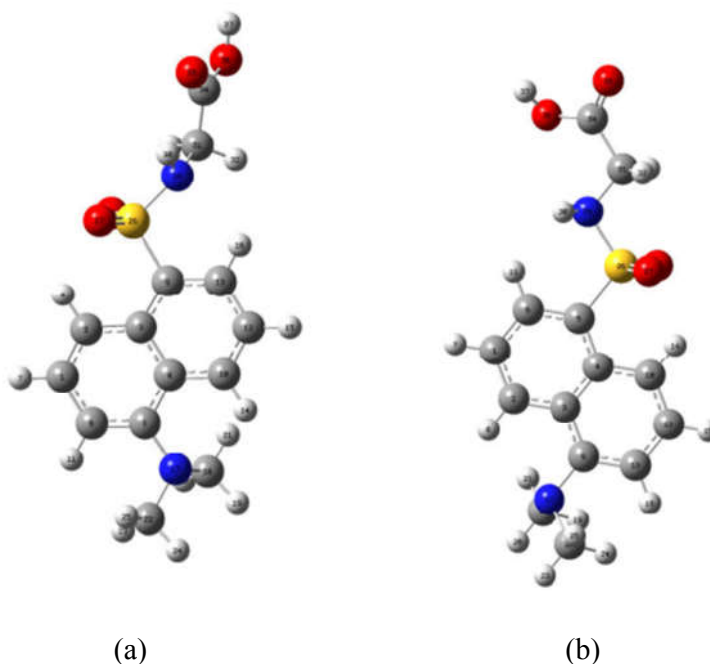
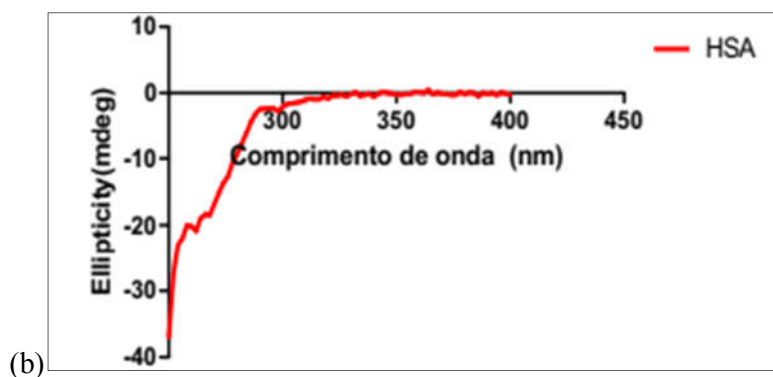
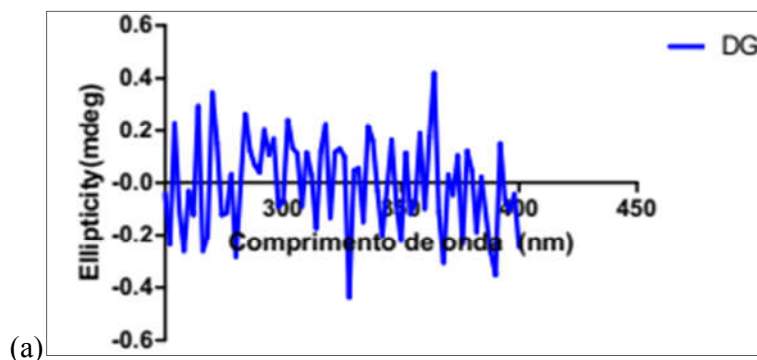


Figura 19. Configurações (a) R e (b) S da Dansilglicina

5.3. Interação Da Dansilglicina Com A Hsa: Dicroísmo Circular Induzido

Com base na descoberta que a DanGly liga-se ao sítio II da HSA (GRACIANNI; XIMENES,2013)., utilizamos a técnica de ECD para descobrir em qual configuração, R ou S, a mesma se apresenta quando complexada com a HSA. Na Figura 20 os espectros de ECD foram medidos na faixa de 250 nm a 500 nm na presença e na ausência da DanGly. Observa-se que em (a) a molécula de DanGly diluída em tampão, não

apresentou sinal de dicroísmo circular, o que já era previsto, pois não se trata de uma molécula opticamente ativa, isto é, não possui centros quirais. Em (b) a proteína HSA apresentou espectro característico de CD na região de 300 nm, com dois mínimos a 262 e 269 nm, que são atribuídos aos resíduos aromáticos e à ligação dissulfeto. Em (c) observamos que a complexação entre DanGly e HSA resultou no aparecimento de um sinal de ICD centrado em 346 nm. Esta indução de quiralidade na DanGly é devido à sua interação com a proteína, e pode ser explicada pela ligação sua ao ambiente assimétrico que caracteriza os sítios de ligação nas proteínas.



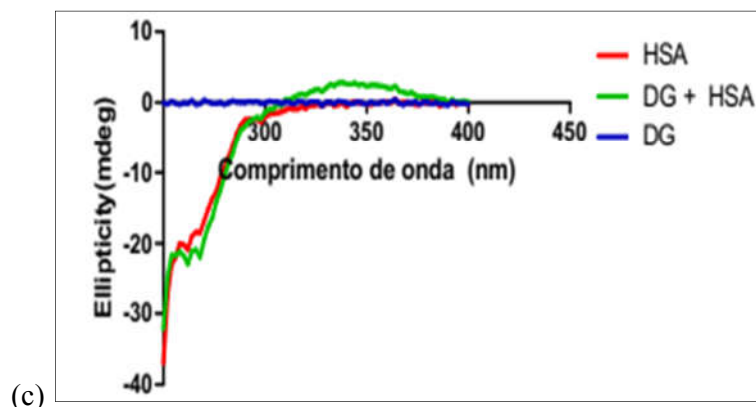
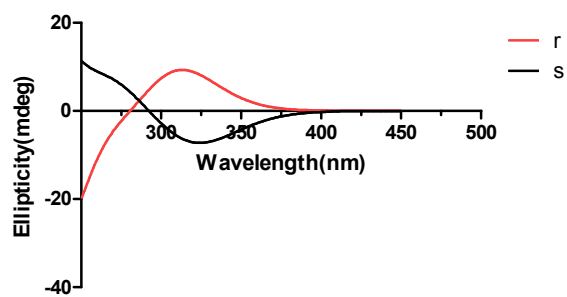


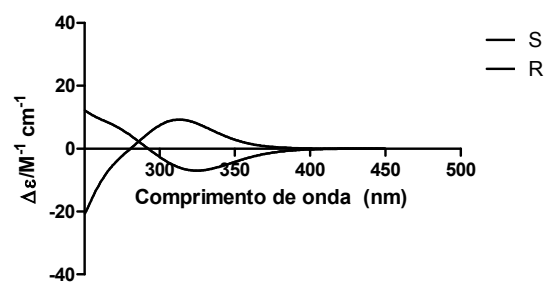
Figura 20. (a) ECD da DanGly isolada, não apresenta sinal por ser uma molécula aquiral; (b) ECD da HSA e (c) Após complexação DanGly-HSA

5.4. Estudo Teórico Do Dicroísmo Circular Eletrônico (ECD)

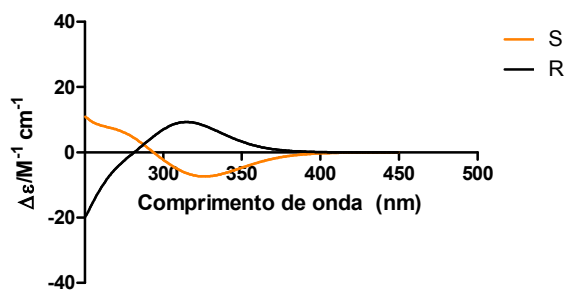
Foi utilizado o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de base 6-311++G(2d, p) para obtenção do ECD da DanGly nas configurações R e S. Na Figura 21 observamos que na presença dos diferentes solventes, a DanGly apresentou configuração R com sinal positivo, e na configuração S um sinal negativo no espectro de ECD. A comparação entre o espectro de ECD experimental com aqueles simulados em diferentes solventes nos leva a concluir que a conformação adquirida pela DanGly ao se ligar à proteína se assemelha a configuração R.

Acetonitrila

(a)

THF

(b)

Água

(c)

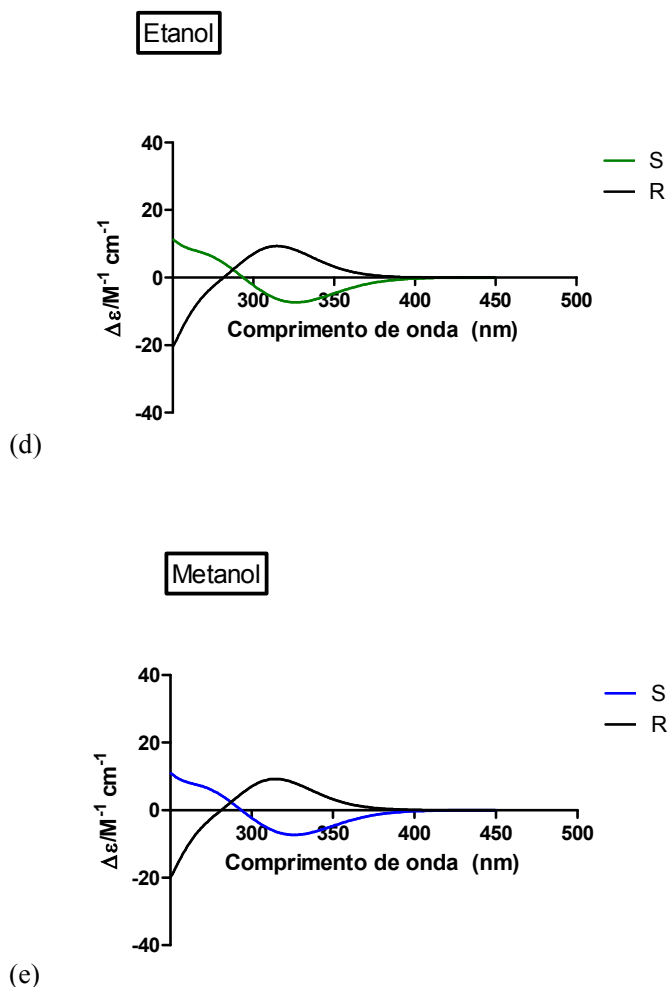


Figura 21. ECD da DanGly em diferentes solventes e suas configurações r e s. (a) acetonitrila; (b).THF; (c) água; (d) etanol e (e) metanol

No mais, a comparação entre o espectro de CD experimental com aqueles simulados em diferentes solventes nos leva a concluir que a conformação adquirida pela DanGly ao se ligar à proteína apresenta configuração R.

Analizamos algumas diferenças na energia dos isômeros R e S em função dos solventes, e notamos que a configuração R está presente quando a DanGly se complexa com a HSA, apresentando menor energia apresentada, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Valores da menor energia apresentada da DanGly nos diversos solventes

	Energia R	Energia S
	(Hartree)	(Hartree)
Acetonitrila	-1351,578	-1351,525
THF	-1351,578	-1351,521
Água	-1351,574	-1351,525
Metanol	-1351,577	-1351,526
Etanol	-1351,578	-1351,527

5.5. Dansilglicina E A Inversão Do Nitrogênio

O aparecimento de um sinal de ICD para a DanGly em presença de HSA sugere que a mesma dentro da proteína assuma uma conformação quiral. Assim, o próximo passo foi investigar o que justificaria a existência de quiralidade para a mesma. Para isso levamos em conta a presença do par isolado de elétrons no nitrogênio sp^3 da DanGly, o que permitiria a inversão do mesmo levando, em hipótese, as duas configurações possíveis. A inversão do nitrogênio na molécula livre em solução deve ser de energia baixa o suficiente para que ocorra livremente e, assim, justifique a não existência de quiralidade. No entanto, acreditamos que ao se ligar na proteína, esta inversão possa estar impedida.

Sendo assim, nossa primeira hipótese foi considerar que a inversão do nitrogênio ocorria na parte da glicina da molécula, e assim realizamos a construção da molécula e os espectros teóricos nas duas conformações R e S, como apresentado nos resultados anteriores vimos que na conformação R, o sinal do ECD se comporta o mais próximo

do experimental. O próximo passo foi realização dos scan de todas os possíveis diedros desta conformação.

5.6. Estudo Da Superfície De Energia Potencial (PES) E ECD Da Dansilglicina.

Na Figura 22 apresentamos a estrutura da molécula de DanGly com a numeração utilizada para a identificação dos átomos a serem considerados nos cálculos da PES e de ECD da DanGly referentes à cada ângulo diedro.

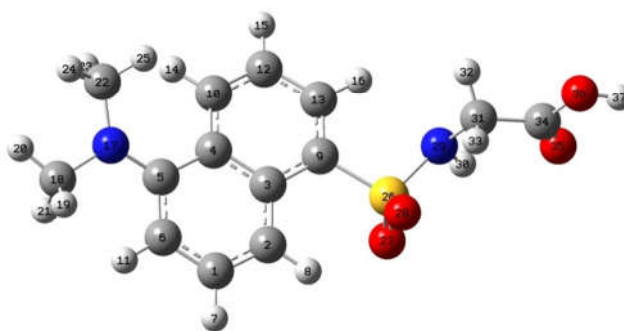


Figura 22. Estrutura da DanGly com os átomos numerados

A PES da DanGly foi calculada a partir do funcional híbrido B3LYP e a função de base 6-31G(2d, p) no vácuo. Na Figura 23 apresentamos a PES (com intervalos de 10° entre cada ponto da curva desde zero até 360°) onde podemos verificar a presença de mínimos e máximos de energia como uma função do ângulo diedro representado pelos átomos: 36, 34, 31 e 29. O cálculo do ECD da DanGly foi realizado no funcional híbrido CAM-B3LYP com o conjunto de funções de base 6-311++G(2d, p) no solvente água utilizando o modelo SMD. Na Figura 24 apresentamos o espectro da

DanGly no solvente água para os ângulos diedros de 20° , 100° , 180° e 280° onde podemos verificar que o sinal de ECD obtido foi positivo para todos os ângulos diedros considerados.

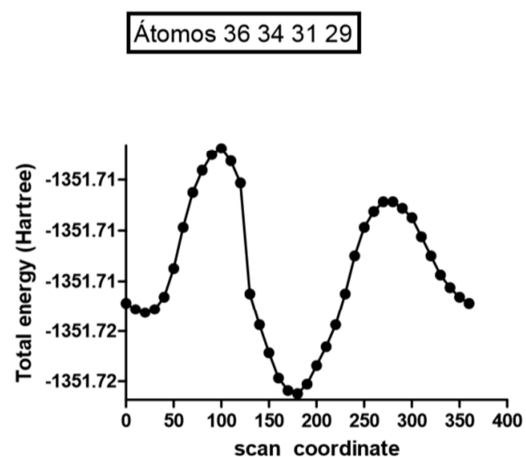


Figura 23. PES da DanGly

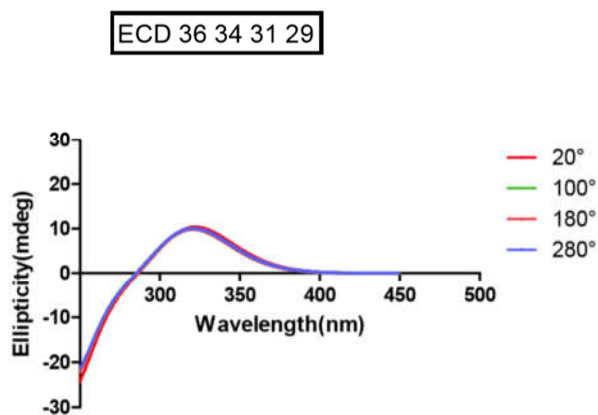


Figura 24. ECD da DanGly no solvente água

Na Figura 25 é apresentada a PES (com intervalos de 10° entre cada ponto da curva desde zero até 360°) onde podemos verificar a presença de mínimos e máximos

de energia como uma função do ângulo diedro representado pelos átomos: 37, 36, 34 e 31.

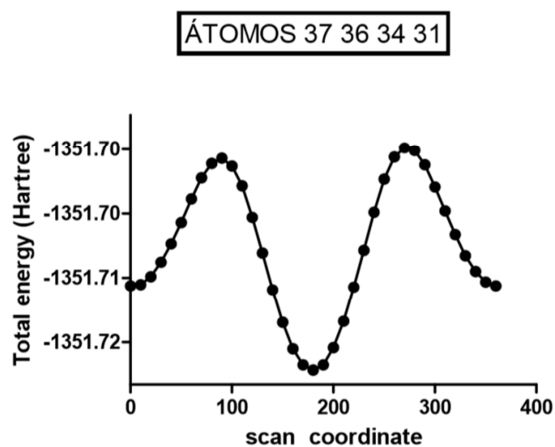


Figura 25. PES da DanGly

O espectro da DanGly, apresentado na Figura 26, no solvente água para os ângulos diedros de 90° , 180° e 270° onde pode verificar que o sinal de ECD obtido foi positivo para todos os ângulos diedros considerados.

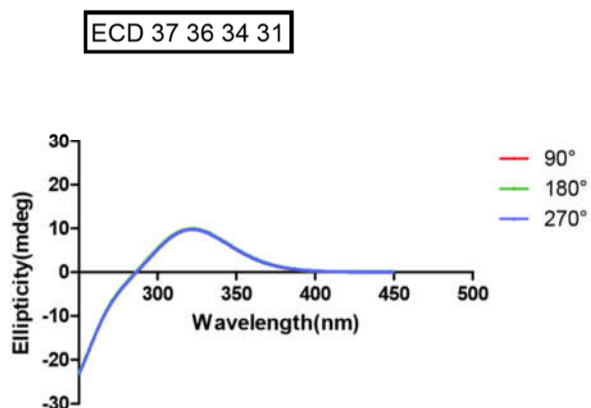


Figura 26. ECD da DanGly no solvente água

Na Figura 27 apresentamos a PES (com intervalos de 10° entre cada ponto da curva desde zero até 360°) onde podemos verificar a presença de mínimos e máximos de energia como uma função do ângulo diedro representado pelos átomos: 26, 29, 31 e 34.

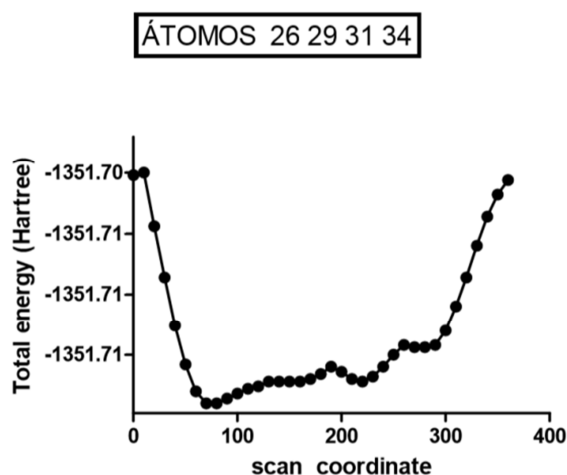


Figura 27. PES da DanGly

Para os ângulos diedros de 70° , 150° , 160° , 190° , 220° , 260° e 280° , apresentamos na Figura 28 o espectro da DanGly no solvente água onde podemos verificar que o sinal de ECD obtido foi positivo para todos os ângulos diedros considerados.

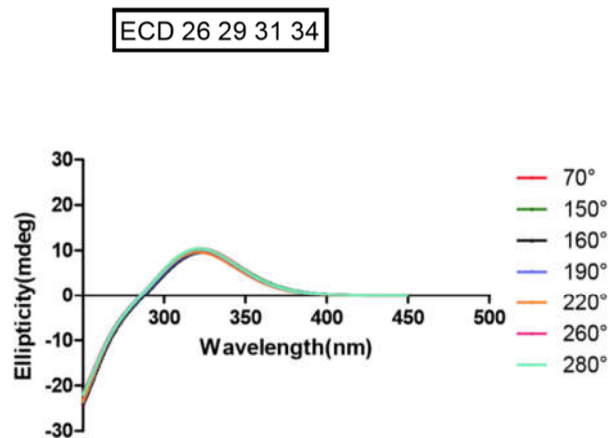


Figura 28. ECD da DanGly no solvente água

Podemos verificar na Figura 29 a presença de mínimos e máximos de energia, na PES como uma função do ângulo diedro representado pelos átomos: 29, 31, 34 e 35.

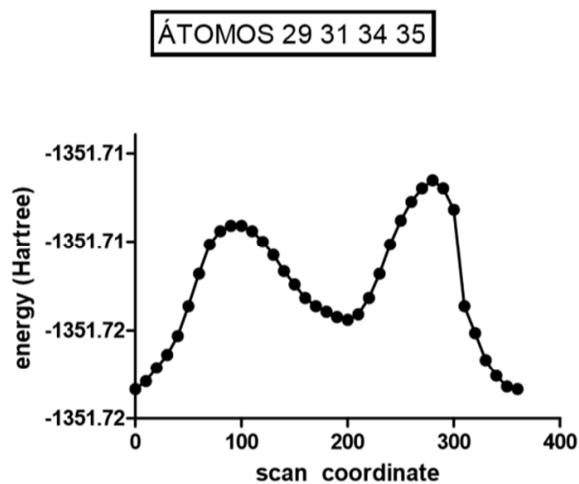


Figura 29. PES da DanGly

Verificamos que o sinal de ECD obtido foi positivo para todos os ângulos diedros considerados, apresentados na Figura 30 com os respectivos espectros da DanGly no solvente água para os ângulos diedros de 100° , 200° e 280° .

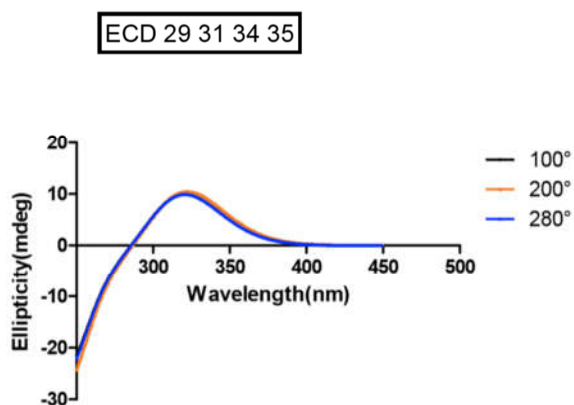


Figura 30. ECD da DanGly no solvente água

Na Figura 31 podemos verificar a presença de mínimos e máximos de energia como uma função do ângulo diedro representado pelos átomos: 27, 26, 9 e 3 na PES da DanGly no vácuo.

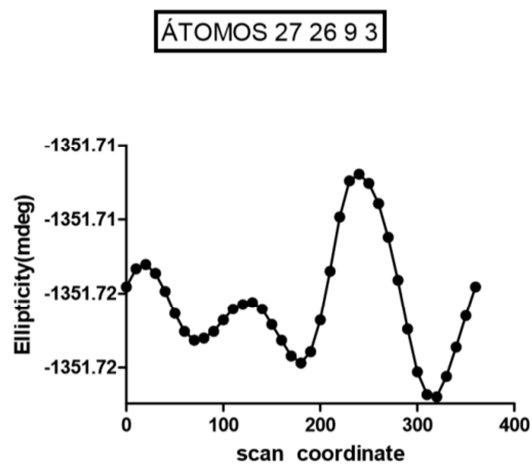


Figura 31. PES da DanGly

Na Figura 32 apresentamos o espectro da DanGly no solvente água para os ângulos diedros de 20° , 70° , 130° , 180° , 240° e 320° onde podemos verificar que o sinal de ECD obtido foi positivo para todos os ângulos diedros considerados.

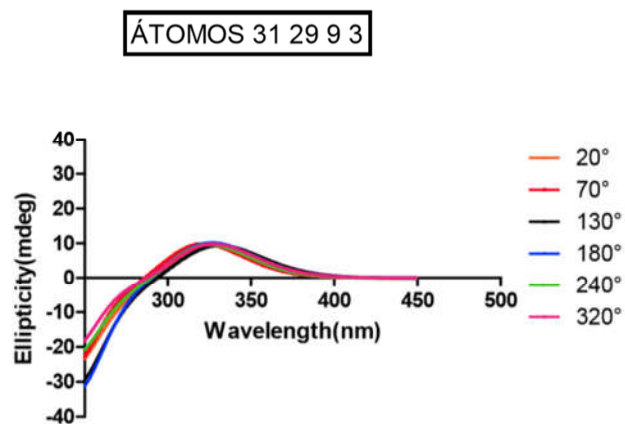


Figura 32. ECD da DanGly no solvente água

Na Figura 33 apresentamos a PES (com intervalos de 10° entre cada ponto da curva desde zero até 360°) onde podemos verificar a presença de mínimos e máximos de energia como uma função do ângulo diedro representado pelos átomos: 22, 17, 5 e 4.

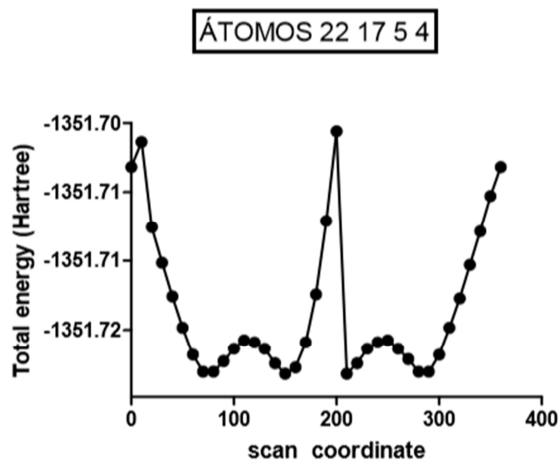


Figura 33. PES da DanGly

Na Figura 34 é apresentado o espectro da DanGly no solvente água para os ângulos diedros de 0° , 10° , 120° , 130° , 140° e 150° onde podemos verificar que o sinal de ECD obtido foi positivo para todos os ângulos diedros considerados. Para o ângulo de 0° o máximo no espectro de ECD encontra-se em 350 nm, à medida que aumentamos o ângulo diedro este máximo sofre um descolamento para comprimentos de onda menores: para o ângulo de 130° o valor máximo é igual a 310 nm e à medida que aumentamos o diedro o ângulo para 140° e 150° o valor máximo é igual 315 e 320 nm, respectivamente.

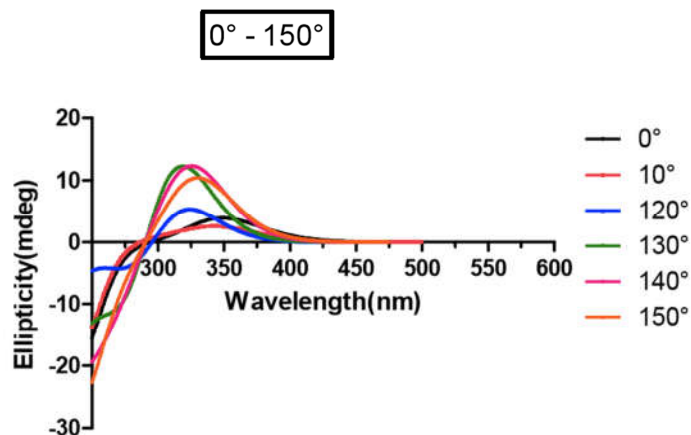


Figura 34. ECD da DanGly no solvente água

Na Figura 35 apresentamos o espectro da DanGly no solvente água para os ângulos diedros de 160°, 170°, 180°, 190° e 200° onde podemos verificar que o sinal de ECD obtido foi positivo para todos os ângulos diedros considerados. À medida que aumentamos o ângulo diedro o valor da posição do máximo do espectro de ECD sofre um deslocamento para comprimentos de onda para o vermelho: para o valor de 160° e 200° temos um valor de 323 e 333 nm, respectivamente.

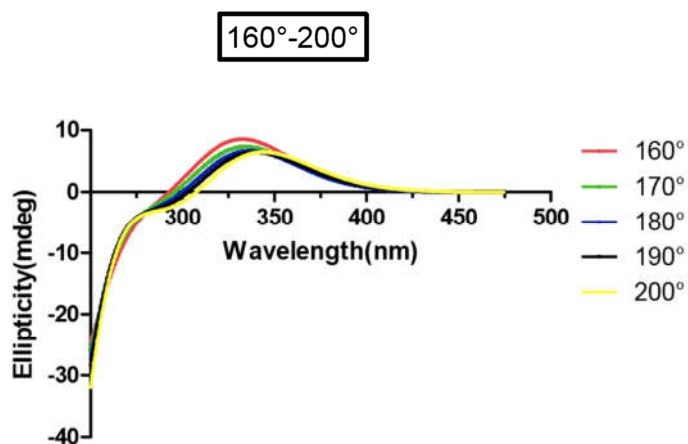


Figura 35. ECD da DanGly no solvente água

Apresentamos na Figura 36 o espectro da DanGly no solvente água para os ângulos diedros de 250°, 260°, 270°, 280°, 290° e 300° onde podemos verificar que o sinal de ECD obtido foi positivo para todos os ângulos diedros considerados. À medida que aumentamos o ângulo diedro de 250° a 280° não ocorre variação significativa no valor do máximo no sinal de ECD. Ocorre, no entanto, uma diminuição na intensidade do sinal de ECD para os ângulos diedros iguais a 290° e 300°.

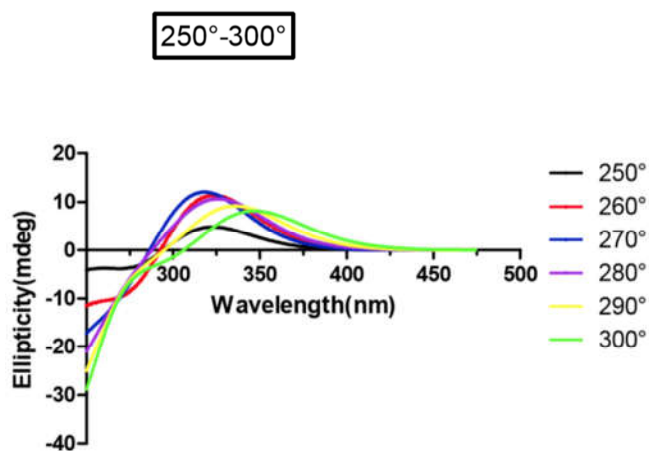


Figura 36. ECD da DanGly no solvente água

Na Figura 37 apresentamos o espectro da DanGly no solvente água para os ângulos diedros de 310°, 320°, 330°, 340°, 350° e 360° onde podemos verificar que o sinal de ECD obtido foi positivo para todos os ângulos diedros considerados. À medida que aumentamos o valor do ângulo diedro no intervalo de 310° a 350°, o sinal de ECD diminui de intensidade e o comprimento de onda sofre um descolamento para a região do vermelho do espectro eletromagnético. Para o valor de 360°, a intensidade do sinal ainda é menor do que os outros ângulos diedros, mas apresenta um valor para o máximo de intensidade igual a 349 nm.

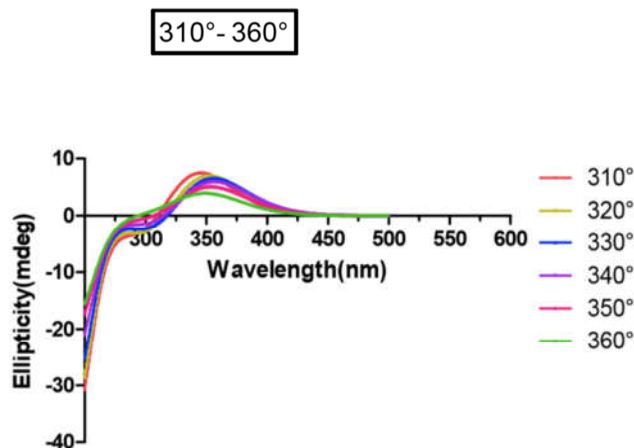


Figura 37. ECD da DanGly no solvente água

O espectro da DanGly no solvente água para os ângulos diedros de 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70° e 80° apresentados na Figura 38, verificamos que o sinal de ECD obtido foi negativo para todos os ângulos diedros considerados. À medida que aumentamos o valor do ângulo diedro no intervalo de 20° a 60°, o sinal de ECD não sofre mudanças significativas situando-se próximo a 350 nm. À medida que aumentos o valor do ângulo diedro para 70° e 80° observou um aumento na intensidade do sinal e um deslocamento para a região do azul, com valores iguais a 326 e 317 nm, respectivamente.

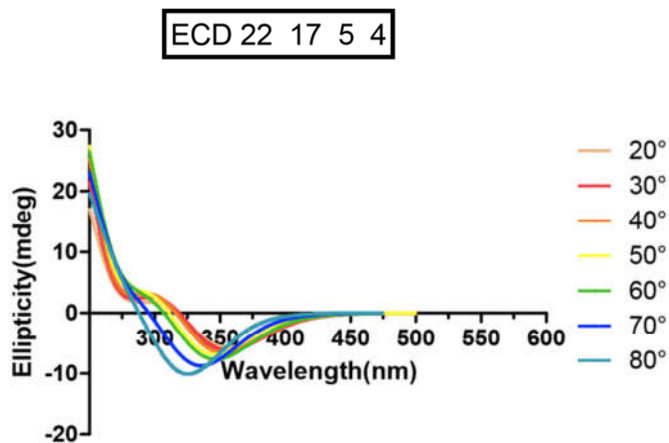


Figura 38. ECD da DanGly no solvente água

Na Figura 39 apresentamos o espectro da DanGly no solvente água para os ângulos diedros de 90°, 100°, 110°, 210°, 220°, 230° e 240° onde podemos verificar que o sinal de ECD obtido foi negativo para todos os ângulos diedros considerados. À medida que aumentamos o valor do ângulo diedro no intervalo de 90° a 230°, com exceção dos valores de 210° e 240°, o sinal de ECD não sofre mudanças significativas situando-se próximo a 320 nm. Para os valores dos ângulos diedros iguais a 210° e 240° a intensidade do sinal de ECD diminui e o valor para o comprimento de onda é igual a 320 nm.

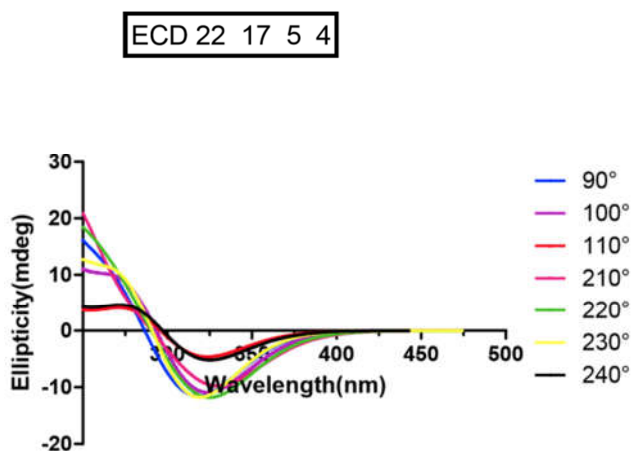


Figura 39. ECD da DanGly no solvente água

Os cálculos da PES da DanGly, considerando os ângulos diédricos formados pela ligação do grupo $-N(CH_3)_2$ do anel naftalênico, mostraram que a partir das várias conformações possíveis e seus respectivos ECDs teóricos o valor do ângulo diedro igual a 150° (ECD positivo centrado em 320 nm) apresentou excelente similaridade com o espectro obtido experimental. Por outro lado, o diedro de 80° apresentou um sinal do espectro de ECD oposto ao observado experimentalmente. Estes dois valores para o

ângulo diedro apresentam uma conformação semelhante àquele obtida através da simulação por docking molecular.

Na Figura 40 apresentamos a estrutura do sítio II de ligação da DanGly na proteína HSA obtida através do cálculo de docking molecular.

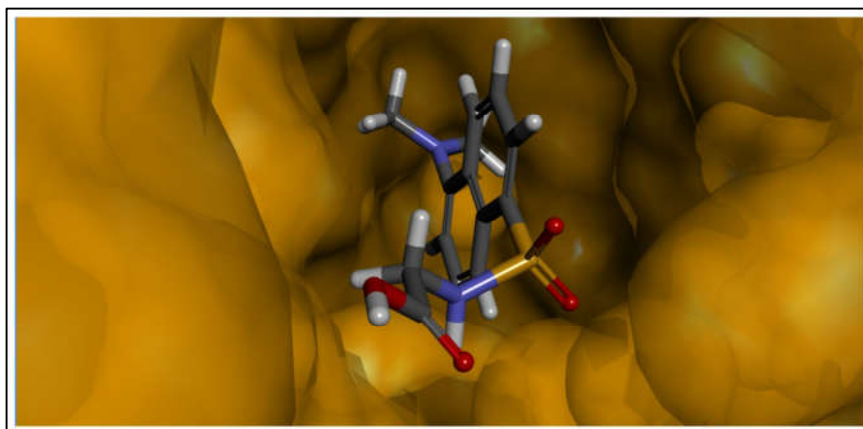


Figura 40. Estrutura da cavidade do sítio II na HSA

O alto score obtido para o sítio II está em boa concordância com os resultados experimentais, que mostra a preferência da DanGly ligar-se a este sítio. Este sítio é uma cavidade com um dos lados abertos e o outro fechado, diferente do sítio I que se assemelha a um cilindro com ambas as cavidades abertas. O valor do ângulo diedro calculado no docking molecular para os átomos 22(C), 17(N), 5(C) e 4(C) na DanGly é igual a 100°. Este valor está em boa concordância com os valores obtidos nos estudos teóricos usando DFT.

Na Figura 41 apresentamos o sítio de ligação II da HSA onde podemos verificar os aminoácidos que interagem com a DanGly. Podemos observar que a molécula de DanGly interage com o aminoácido Tirosina 411 (Tyr411) através de uma ligação de

hidrogênio entre os átomos de Oxigênio da DanGly e o átomo de Hidrogênio da Tyr411.

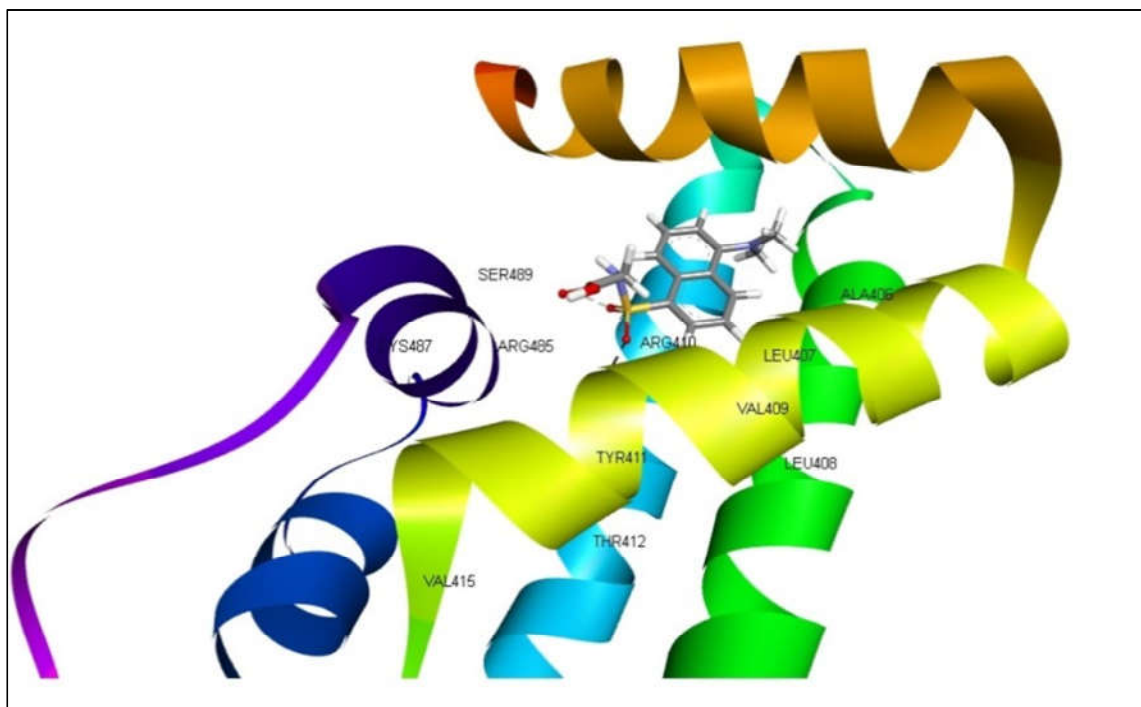


Figura 41. Sítio II de interação da HSA com a DanGly

5.7. Estudo Dos Orbitais Moleculares Homo-Lumo Da Dansilglicina

Na Figura 42 apresentamos os orbitais moleculares HOMO e LUMO para a molécula de DanGly para o ângulo diedro, formado entre os átomos 22(C), 17(N), 5(C) e 4(C), igual a 80° . O orbital HOMO (de número 81) e o LUMO (de número 82) são os responsáveis pela transição eletrônica observada no espectro de ECD, obtida no nível de teoria DFT com o funcional híbrido CAM-B3LYP e a função de base 6-311++G(2d, p) no vácuo. A transição HOMO-LUMO se refere à passagem de um elétron localizado no par de elétrons n do átomo de Nitrogênio de número 17 para

um orbital p localizado nos átomos de Carbono. Esta transição está relacionada ao sinal negativo no espectro de ECD apresentado na Figura 38 localizado em 317 nm.

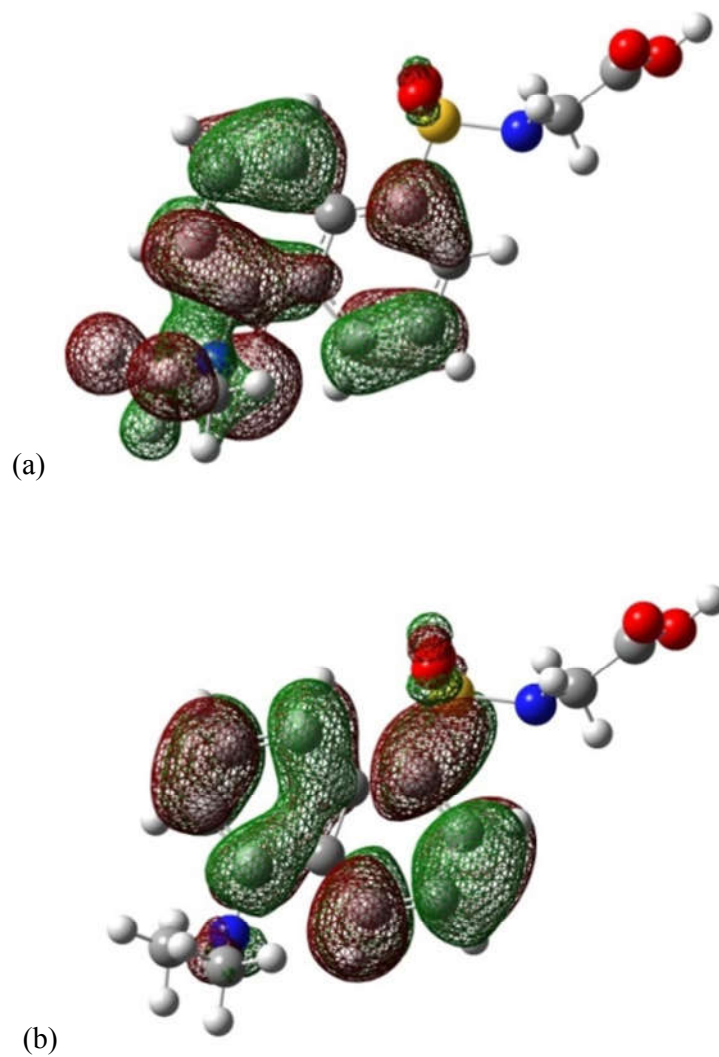
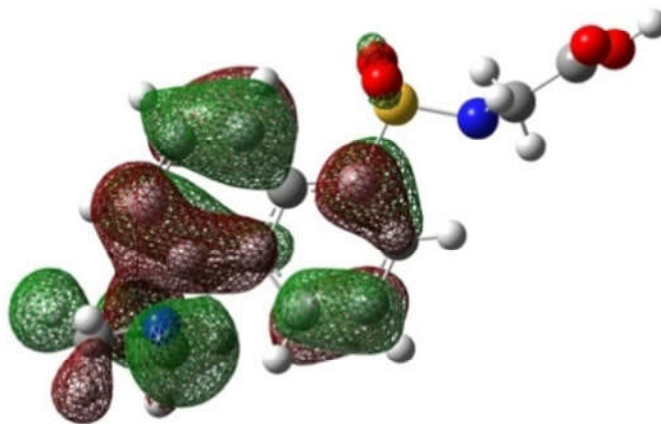
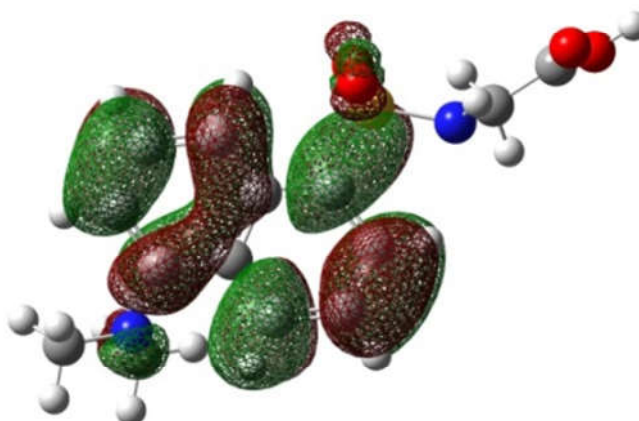


Figura 42. Principais orbitais moleculares (a) HOMO e (b) LUMO da DanGly para o diedro de 80°

Na Figura 43 apresentamos os orbitais moleculares HOMO e LUMO para a molécula de DanGly para o ângulo diedro, formado entre os átomos 22(C), 17(N), 5(C) e 4(C), igual a 150° . O orbital HOMO (de número 81) e o LUMO (de número 82) são os responsáveis pela transição eletrônica observada no espectro de ECD, obtida no nível de teoria DFT com o funcional híbrido CAM-B3LYP e a função de base 6-311++G(2d, p) no vácuo. A transição HOMO-LUMO se refere à passagem de um elétron localizado no par de elétrons n do átomo de Nitrogênio de número 17 para um orbital p localizado nos átomos de Carbono. Esta transição está relacionada ao sinal positivo no espectro de ECD apresentado na Figura 34 localizado em 333 nm.



(a)



(b)

Figura 43. Principais orbitais moleculares (a) HOMO e (b) LUMO da DanGly para o diedro de 150°

Na Tabela 4 apresentamos os valores das contribuições dos orbitais atômicos da DanGly para os orbitais moleculares HOMO e LUMO em função do ângulo diedro. As contribuições foram obtidas a partir da análise dos orbitais moleculares da DanGly e foram escolhidos aqueles que são predominantes para a formação do orbital molecular que descrevem as transições eletrônicas.

Podemos verificar que para o ângulo diedro igual a 80° a maior contribuição para o orbital molecular HOMO está relacionada aos átomos de Carbono (5) com o orbital atômico 5s e para o LUMO a maior contribuição está relacionada ao átomo de Carbono (4) com o orbital atômico 5s.

Para o ângulo diedro igual a 150° , a contribuição para o HOMO e LUMO está associada aos átomos de Nitrogênio (17) com o orbital 4pz e o átomo de Carbono (5) com o orbital 5pz.

Tabela 4. Contribuição dos orbitais atômicos no HOMO e LUMO da DanGly

Ângulo diedro (graus)	Orbital molecular	
	HOMO	LUMO
0°	17N/4pz/0,26080	4C/5s/0,86916
10°	17N/4pz/0,25542	4C/5s/0.81395
20°	4C/5s/0,31993	4C/5s/0.48608
30°	4C/5s/0,28698	4C/5s/0,37834
40°	5C/5s/0.22081	5C/5pz/0.22488
50°	17N/4pz/0.20558	5C/5pz/0.26654
60°	17N/3pz/0.18699	5C/5pz/0.29714
70°	17N/4py/0.19040	4C/5s/0.39995
80°	5C/5s/0.19531	4C/5s/0.55544
90°	17N/4py/0.21283	4C/5pz/0.54882
100°	17N/4py/0.22109	4C/5s/0.40104
110°	17N/4py/0.21152	5C/5pz/0.40271
120°	17N/4py/0.21715	4C/5pz/0.60845
130°	17N/4py/0.20904	5C/5pz/0.39393
140°	5C/5s/0.19520	5C/5s/0.53294
150°	17N/4pz/0.20168	5C/5pz/0.32987
160°	17N/4pz/0.32987	5C/5pz/0.30692
170°	17N/4pz/0.21308	5C/5pz/0.26706
180°	17N/4pz/0.21486	4C/5s/0.45569
190°	17N/4pz/0.21346	4C/5s/0.64638
200°	17N/4pz/0.20929	5C/5s/0.71483
210°	17N/4py/0.20082	4C/5s/0.47089
220°	17N/4py/0.22364	4C/5s/0.57756
230°	17N/4py/0.24052	4C/5s/0.45061
240°	17N/4py/0.23639	5C/5pz/0.40353
250°	17N/4py/0.19939	5C/5pz/0.39204
260°	5C/5s/0.19360	5C/5pz/0.39715
270°	5C/5s/0.17969	5C/5s/0.52783
280°	17N/4pz/0.19232	5C/5s/0.53447
290°	17N/4pz/0.21318	5C/5pz/0.31031
300°	17N/pz/0.23121	5C/5pz/0.24959
310°	17N/4pz/0.24707	4C/5s/0.40922
320°	17N/4pz/0.25778	4C/5s/0.56351
330°	4C/5s/0.28055	4C/5s/0.68933
340°	4C/5s/0.31868	4C/5s/0.79210
350°	4C/5s/0.30344	4C/5s/0.85734
360°	17N/4pz/0.26082	4C/5s/0.86896

6. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a DanGly nos solventes: água, metanol, etanol, acetonitrila e THF, apresenta um comprimento de onda máximo de absorção em aproximadamente em 340 nm, indicando uma transição $n \rightarrow \pi^*$. Além disso, o uso desses dados experimentais foram úteis para relacionarmos com os espectros teóricos, utilizando o método DFT com o conjunto de base B3LYP/6-311++G(2d,p) e notamos que os espectros com as configurações R e S não apresentaram mudanças significativas em relação ao comprimento de onda máximo. Com os dados de ECD, pudemos demonstrar que a complexação de HSA com DanGly leva ao aparecimento de uma banda CD positiva centrada em 346 nm. Esse fenômeno pode ser explicado pelo aparecimento da quiralidade na DanGly quando induzida pelo meio, no presente caso o sítio II da HSA. A comparação entre o espectro de ECD experimental com os obtidos por DFT, em diferentes solventes, nos leva a concluir que a conformação adquirida pela DanGly ao se ligar à proteína se assemelha a configuração R.

Cálculos da superfície de energia potencial (PES) da DanGly nos mostram que os grupos envolvidos no fenômeno do aparecimento do sinal de ECD está relacionado ao grupo -N(CH₃)₂ do anel naftalênico. A análise das várias conformações obtidas e seus respectivos ECDs teóricos revelaram que o diedro de 150° (ECD positivo centrado em 320 nm) apresentou excelente similaridade com o espectro experimental. Por outro lado, o diedro de 80° apresentou um sinal do espectro de ECD oposto ao observado experimentalmente. Além disso, observamos que o átomo de nitrogênio do grupo -N(CH₃)₂ apresentou a maior contribuição para a transição HOMO-LUMO que dá origem à transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ envolvida na geração do sinal de ECD. A análise de

docking molecular da complexação entre DanGly e HSA revelou uma conformação com um diedro igual a 100° , muito similar àquele obtido teoricamente (DFT) e cujo ECD está em acordo com o resultado experimental. Em conclusão, através do estudo das possíveis conformações para a dansilglicina e o cálculo do seu ECD teórico, foi possível identificar a origem do sinal de ECD obtido pela complexação entre DanGly e HSA.

7. REFERÊNCIAS

ALI J. R.; GHUMAN, J.; ZUNSZAIN, P. A.; CHUNG, C. W.; CURRY, S. Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin. **J. Struct. Biol.** April, n.174(1), p.84-91, 2011.

ALLENMARK, S. Induced circular dichroism by chiral molecular interaction. **Chirality**, n.15, p.409–422, 2003.

ANTUNES, A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. F.; RAGI, R.; BAGNATO, V. S. Método de Hartree-Fock: Dois Exemplos Analiticamente Solúveis. **Rev. Bras. Ensino de Física** v.21, n.2, p.221–232, 1999.

ARRUDA, P. M. **Algumas considerações sobre conjuntos de bases para cálculos de propriedades elétricas**. Dissertação (Mestrado em Física) - Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.

BACH, R. D.; WOLBER, G. J. **J. Org. Chem.**, v.47, n.2, p.239-245, 1982.

BARRETO, F. C. *et al.* Associação entre indoxil sulfato e histomorfometria óssea em pacientes renais crônicos pré-diálise. **J. Bras. Nefrol.**, v.36, n.3, p.289-296, 2014.

BECKE, A. D. **Phys. Rev. A**, v.38, p.3098, 1988.

BECKE, A. D. **J. Chem. Phys.**, v.98, p.5648, 1993.

BEROVA, N.; DI BARI, L.; PESCIPELLI, G. Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. **The Royal Society of Chemistry**, Department of Chemistry, Columbia University, New York, New York, n.36, p.914–931, 2007.

BERTUCCI, C.; DOMENICI, E. C. **Med. Chem**, n.9, p.1463-1481, 2002.

BERTUCCI, C.; PISTOLOZZI, M.; SIMONE, A. D. Circular dichroism in drug discovery and development: an abridged review. **Analytical and bioanalytical Chemistry**, n.398, p.155–166, 2010.

BERTUCCI, C.; PISTOLOZZI, M. Species-Dependent Stereoselective Drug Binding to Albumin: A Circular Dichroism Study. **Chirality**, v.20, p.552–558, 2008.

BHATTACHARYA, A. A.; CURRY, S.; FRANKS, N.P. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin: high-resolution crystal structures. **J. Biol. Chem**, n.275, p.38731–38738, 2000.

BUJACZ A, TALAJ J. A, ZIELINSKI K, PIETRZYK-BRZEZINSKA A. J., NEUMANN P. Crystal structures of serum albumins from domesticated ruminants and their complexes with 3,5-diiodosalicylic acid. **Acta Crystallogr D Struct Biol**, n.73, p.896-909, 2017.

CAPELLE, K. A Bird's Eye View of Density- Functional Theory. **B. J. of Physics**, v.36, p.1318-1343, 2006.

CAREY, F. **Org. Chem**. 2^a ed. New York, Mc GrawHill, 1992.

CHATTERJEE, T.; PAL, A.; DEY, S.; CHATTERJEE, B. K.; CHAKRABARTI, P. Interaction of virstatin with human serum albumin: spectroscopic analysis and molecular modeling. **Plos One**, v.7, 2012.

CURRY, S.; MANDELKOW, H.; BRICK, P.; FRANKS, N. **Nat. Struct. Biol**, n.5, p.827-835, 1998.

DEB, B. D. **The Force Concept in Chemistry**, Van Nostrand, New York, 1981.

DI BARI, L. *et al.* Interactions between quercetin and warfarin for albumin binding: A new eye on food/drug interference. **Chirality**, v.6, n.22, p.593–596, 2010.

DOCKAL, M.; CARTER, D. C.; RÜKER F. Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. **J. Biol. Chem.**, v.275(5), p.3042–3050, 2000.

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H. **Stereochemistry of Organic Compounds**, New York, John Wiley, 1994.

EPSTEIN, S. **The Variational Method**, New York, 1974.

ELVIS S. BÖES, **Estudo teórico da solvatação de ânions em solventes orgânicos**. Dissertação de mestrado. UFRS, 2005.

FANALI G.; DI MASI A.; TREZZA V.; MARINO M.; FASANO M. Human serum albumin: from bench to bedside. **Mol. Aspects Med.**, v.33, n.3, p.209–290, 2012.

FEIXAS, F.; LINDERT, S.; SINKO, W.; MCCAMMON, J. A. **Biophysical Chemistry**, n.186, p.31-45, 2014.

FORESMAN, J. B.; FRISCH, E. Exploring chemistry with electronic structure methods. 2ed. **Gaussian Inc.**, Pittsburg, 1996.

FREITAS, A. C. DE. **Aplicação de métodos de mecânica quântica no estudo do termocromismo de alcóxidos de vanádio(IV) em solução**, Universidade Federal do Paraná, 2008.

GAUSSIAN 09W, Revision D.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

GHUMAN, J.; ZUNSZAIN, P. A.; PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A.; OTAGIRI, M.; CURRY, S. **J. Mol. Biol.**, n.353, p.38-52, 2005.

GONZALES, C.; SCHLEGEL, H. B. An improved algorithm for reaction- path following. **J. Chem. Phys.**, v.94, p.5523-5527, 1990.

GONZALES, C.; SCHLEGEL, H. B. Reaction-path following in massweighted internal coordinates. **J. Chem. Phys.**, v.90, p.2154-2161, 1989.

GOTTARELLI, G. The use of circular dichroism spectroscopy for studying the chiral molecular self-assembly: an overview, **Chirality**, v.20, p.471–485, 2008.

GRACIANI, F. S.; XIMENES, V. F. Investigation of human albumininduced circular dichroism in dansylglycine. Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, SP, Brasil, **Plos One**, v.8, n.10, p.1-7, 2013.

GRAHAM, A.; LI, G.; CHENM Y.; MORGAN, J.; OSEROFF, A.; DOUGHERTY, T. J.; PANDEY, R. K. **Photochem. Photobiol.**, v.77, n.5, p.561-566, 2003.

GREENWOOD, N. N.; EARNSHAW, A. **Chemistry of the Elements**, 2^a ed. Butterworth-Heinemann, p.423, ISBN 0-08-037941-9, 1997.

GUNDRY, R. L. Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. **Proteomics clinical**, p.73–88, 2007.

GUSTEREN, W. F. V.; DOLENC, J.; MARK, A. E. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v.18, p.149-153, 2008.

HAHN Y. **Phys. Lett. A.**, n.293, p.266–271, 2002.

HARMSSEN, B.J.M.; DE BRUIN, S.H.; JANSSEN, L.H.M.; DE MIRANDA, J.F.R.; VAN OS G.A.J. **Biochemistry**, n.10, p.3217-3221, 1971.

HARTREE, D. R. The Wave Mechanics of an Atom with a Non-Coulomb Central Field. Part I. Theory and Methods. **Math Proc Camb Phil Soc.**, v.24, n.1, p.89–110, 1928a.

HARTREE, D. R. The Wave Mechanics of an Atom with a non-Coulomb Central Field. Part III. Term Values and Intensities in Series in Optical Spectra. **Math Proc Camb Phil Soc.**, v.24, n.3, p.426, 1928b.

HARTREE, D. R. The Wave Mechanics of an Atom with a Non-Coulomb Central Field. Part II. Some Results and Discussion. **Math Proc Camb Phil Soc.**, v.24, n.1, p.111, 1928c.

HARTREE, D. R. The calculation of atomic structures. **Rep. Prog. Phys.**, v.113, n.11, p.113–143, 1947.

HOHENBERG P AND KOHN W. **Phys. Rev.**, v.136, p.864–871, 1964.

JENSEN, F. **Introduction to Computational Chemistry**. Chinchester: John Wiley & Sons, p.429, ISBN 0471984256, 1998.

JOSEPH R. LAKOWICZ; **Principles of Fluorescence Spectroscopy**; 3^a Ed.; University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA; p.961, 2006.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the Investigation of protein structure and function. **Current protein and peptide science**, v.1, n.4, p.349-384, 2000.

KIRKWOOD J .G.; WESTHEIMER F.H., “The Electrostatic Influence of Substituents on the Dissociation Constants of Organic Acids.”, **J. Chem. Phys.**, vol. 6, p. 506, 1938.

KNORR, R.; RUHDORFER, J.; MEHLSTÄUBL, J.; BÖHRER, P.; STEPHENSON, D. S. **Eur. J. Inorg. Chem.**, n.126, p.747-754, 1993.

KOCH, W.; HOLTHAUSEN, M. C. **A Chemist’s Guide to Density Functional Theory**. 2^a Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH, ISBN 978-3-527-303724, 2001.

KRAGH-HANSEN, U.; CHUANG, V.T.G.; OTAGIRI, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, n.25, p.695–704, 2002.

LAKOWICZ , J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer, p.954, 2006.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. **Phys. Rev. B**, v. 37, p. 785, 1988.

LEHN, J. M. Nitrogen Inversion: Experiment and Theory. **Fortschr. Chem. Forsch.**, v.15, p. 311–377, 1970.

LEVINE, I. N. Quantum Chemistry. 5^a Ed. **Prentice Hall**, New York, 2000.

LINDUP, W. E.; ORME, M. C. Clinical pharmacology: plasma protein binding of drugs. **British Medical Journal**, Clin. Res. Ed., n.282, p.212–214, 1981.

L. ONSAGER, Electric Moments of Molecules in Liquids, **Journal of the American Chemical Society**, vol.58, p.1486, 1936.

MADESCLAIRE M.; **Stéréoisomérie. Généralités et incidences en chimie thérapeutique**, Paris, Ellipses, 1987.

MALLIK, R.; HAGE, D. S. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 46, p. 820-830, 2008.

MAROIYAMA, Y. *et al.* Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumin in ionic surfactant solutions: a comparative study of the two and one tryptophan(s) of bovine and human albumins. **Journal Of Protein Chemistry**, n.15, p.265–72, 1996.

MARENICH, A. V.; CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. **Phys. Chem. B** v.113, p.6378-6396, 2009.

MARQUES M. A. L.; BOTTI, S. O que é a teoria dos funcionais da densidade? **Gazeta de Física**, v.29, n.4, p. 10-15, 2006.

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

MORGON, N. H.; CUSTODIO, R. Funções de Base: O Ajuste Variacional. **Chemkeys**, 2001.

MULLER, N. Binding sites of fluorescent probes on human serum albumin. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v.4, n.46, p.300–304, 1994.

NOZAKI, A. Interaction of polyphenols with proteins: binding of (-)-epigallocatechin gallate to serum albumin, estimated by induced circular dichroism. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.57, n.2, p.224–228, 2009.

ORTOLAN, A. O. **Apostila de práticas de química computacional**, p.6, 2014.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**, Oxford University Press, 1995.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. F. **Introdução à espectroscopia** - tradução da 5ª Ed. norte-americana. Cengage, p.559, 2016.

PAYNE, M. C.; TETER, M. P.; ALLAN, D. C.; ARIAS, T. A.; JOANNOPOULOS, J. D. Iterative Minimization Techniques for ab initio Total-Energy Calculations: Molecular Dynamics and Conjugate Gradients. **Rev. Mod. Phys.**, n.64, p.1045-1097, 1992.

PEDROZA, A. C. Teoria do funcional da densidade uma possível solução para o problema de muitos elétrons da mecânica quântica, **Physicae Organum**, Brasília, v.2, n.1, 2016

PESCITELLI, G.; DI BARI, L.; BEROVA, N. Application of electronic circular dichroism in the study of supramolecular systems, **Chem. Soc. Rev.**, n.43, p.5211–5233, 2014.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. **Phys. Rev.** n.77, p.3865, 1996.

PETERS, T. **All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications**. San Diego, Academic Press, 1996.

PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A.; TWINE, S.; EAST, M.; CURRY, S.; Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I. **J. Biol. Chem.**, n.276, p.22804-22809, 2001.

RODE, J. E.; DOBROWOLSKI, J. C.; SADLEJ, J. **J. Phys. Chem. B**, v.117, p.14202-14214, 2013.

RYAN, A. J.; GHUMAN, J.; ZUNSZAIN, P. A.; CHUNG, C. W.; CURRY, S. Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin. **J. Struct. Biol.**, v.174(1), p.84–91, 2011.

SHAVITT, I. **Methods in Computational Physics**, v. 2, Academic Press, New York, 1963.

SILMAR, A.; VENTURA, E. A importância do método de Hartree no ensino de química quântica. **Química Nova**, v.34, n.3, p.527–534, 2011.

SIMARD, J. R.; ZUNSZAIN, P. A.; HAMILTON, J. A.; CURRY, S. Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis. **J. Mol. Biol.**, n.361, p.336–351, 2006.

STEARNS, M. E.; JENKINS, D. P.; TEW, K. D. Dansylated estramustine, a fluorescent probe for studies of estramustine uptake and identification of intracellular targets. **Cell Biology**, v.82, p.8483-8487, 1985.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular Pharmacology**, v.12, p.1052–1061, 1976.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D.J.; WADE, D. N. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular Pharmacology**, n.11, p.824–832, 1975.

SUGIO, S. *et al.* Crystal structure of human serum albumin at 2.5Å resolution. **Protein Engineering**. n.12, p.439–446, 1999.

TAPIA O.; GOSCINSKI O. Self-Consistent reaction field theory of solvent effects, **Molecular Physics**, v.29, p.1653-1661, 1975.

TAWADA Y.; TSUNEDA T.; YANAGISAWA S.; YANAI T.; HIRAO K., **J. Chem. Phys.** v.120(18), p.8425, 2004.

TEDESCO, D.; BERTUCCI, C. Induced circular dichroism as a tool to investigate the binding of drugs to carrier proteins: classic approaches and new trends. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n.11, p.34-42, 2015.

TOMASI J. Thirty years of continuum solvation chemistry: & review, and prospects for the near future, **Theoretical Chemistry Accounts**, v.112, p. 184-203, 2004.

VIANNA J. D. M.; FAZZIO, A.; CANUTO, S. **Teoria Quântica de Moléculas e Sólidos**, v.1, 2004.

XIANGPING, L.; YINGXIANG, D. Study on the binding of chiral drug duloxetine hydrochloride to human serum albumin. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.4043-4049, 2010.

YAMASAKI, K.; MARUYAMA, T.; KRAGH-HANSEN, U.; OTAGIRI, M. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1295, p.147-157, 1996.

YANAI T.; TEW D. P.; HANDY N. C., **Chem. Phys. Lett.** v.393(1), p.51 ,2004.

SITES ACESSADOS

Fundamentos da Espectrofotometria. Disponível em:

<<http://www.ufjf.br/quimica/files/2016/08/Espectrometria-UV-vis.pdf>>.

Acesso em: 20/12/2017.

An introduction to circular dichroism spectroscopy, 2013. Disponível em:

<<https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/CD%20spectroscopy.pdf>>

Acesso em: 20/12/2017.

PINTO, I., RODRIGUES, S. **Centro de Ciências da Saúde Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Disciplina de Bioinformática, 2016.** Disponível em:

<<http://cbeb2020.org/Bioinformatica/DicroismoCircular.pdf>>

Acesso em: 20/12/2017.

LIMA, V. L. E. **Os Fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem.** Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/qn/v20n6/v20n6a15.pdf>>.

Acesso em: 07/12/2017.

PUC RIO. **Certificação Digital N° 0321142/CA.** Disponível em:

<http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0321142_07_cap_02.pdf>.

Acesso em: 15/12/2017.

Nitrogen Inversion, 2014. Disponível em:

<http://www.chem.ucla.edu/~harding/tutorials/nitrogen_inversion.pdf>

Acesso em: 15/12/2017.