



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Victor Santos de Paiva

**CARACTERIZAÇÃO DA AFINIDADE DA  
INTERAÇÃO DE FÁRMACOS COM ALBUMINA  
DO SORO, COMPARAÇÃO DE VÁRIAS  
METODOLOGIAS.**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, na área de especialização em Química Avançada e Industrial, orientada pela Professora Doutora Maria João Moreno, coorientada pelo Professor Doutor Rui M. M. Brito e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus e aos meus pais, Adail Moreira dos Santos e Braulino José de Paiva, sem a vossa ajuda e suporte esse mestrado não seria possível, obrigado por todo apoio financeiro, psicológico e familiar ao longo desses dois anos, estar longe de casa e sem a presença física de vocês certamente foi um desafio. Os primeiros dias foram os mais críticos, mas com o tempo acabei me adaptando a saudade, apesar de ela nunca ter ido embora, as ligações por chamada de vídeo amenizaram o problema, o qual chega ao fim juntamente com o fim desta jornada. Agradeço aos meus irmãos Sandra Soares de Paiva e Vinícius Santos de Paiva, em especial ao meu irmão por ser um exemplo para mim em tudo que faço, excelência, dedicação, mansidão e generosidade são ensinamentos valiosos que você transmite todos os dias, obrigado por tudo. Essa dissertação não é e nunca foi somente minha, essa conquista se estende a todos vocês por méritos nossos, estudo e conhecimento sempre foram um incentivo em nossa família e por chegar aqui devo tudo a vocês.

Agradeço imensamente a minha orientadora Professora Doutora Maria João Pedrosa Ferreira Moreno Silvestre, obrigado por sempre estar à disposição sempre que precisei, por todo suporte, paciência e tutoria durante esse um ano e meio. Por vezes lhe enxerguei como uma figura materna, nas conversas e nos puxões de orelha quando algo correu mal, garanto-lhe que aprendi o máximo que pude junto da Senhora e serão ensinamento que carregarei para a vida. Ao meu co-orientador Professor Doutor Rui Manuel Pontes Meireles Ferreira de Brito por toda tutoria, paciência e orientação ao longo dessa jornada.

Agradeço ao Jaime Amadeu Samelo, ao Pedro Cruz, a Cristiana Lages Pires e a Zaida L. Almeida por toda a ajuda no laboratório sempre que precisei, por toda tutoria, disponibilidade e paciência de ensinar. Sem vocês certamente a jornada teria sido mais difícil e bem menos divertida, todas as conversas no laboratório sobre bioquímica e a vida em si tornaram os dias mais leves quando necessário, levarei os vossos ensinamentos e experiência para sempre comigo.

Agradeço ao João Victor Rocha, Paulo Nunes, Carolina Domingos e Raquel Cadete (las chiquititas) por serem amigos incríveis e uma importante rede de apoio que o

mestrado me deu, a vossa ajuda foi sem dúvidas uma das coisas mais importantes que tive na universidade. Obrigado por todas as conversas, estudos, convívios, finos, festas e experiências que tivemos juntos, espero tê-los para o resto da vida.

Agradeço novamente ao João Victor Rocha, o filhão, a Jade Ferreira Lopez, a Karolina Ramalho Palermo e a Karen Ramalho Palermo, a tropinha do katchau. Obrigado por serem uma família que tive em Coimbra, vocês são peças-chaves nessa jornada, nunca esquecerei tudo que vivemos, ideias, rolês, viagens, rango brabo, noites de jogos, gins, inquestionavelmente a minha estadia em Coimbra foi melhor com a vossa presença em minha vida.

Agradeço a Iara Lúcia Pinho Souza e Ângelo Manuel Neves Hernandez por terem me recebido em Coimbra assim que cheguei, obrigado por terem cuidado tão bem de mim e me recebido em vossa casa. Foi muito importante para mim ter o vosso apoio no início dessa jornada em Portugal.

Agradeço a Portugal, país que me recebeu, e aos portugueses. Sempre dizemos que somos povos irmãos e isso é uma verdade, a troca cultural que tive foi gratificante, muito aprendi com essa gente e lugar. Não obstante, agradeço a Coimbra e a Universidade de Coimbra, por toda a experiência e seus encantos, dizem que Coimbra é mais bela na despedida e certamente é, despeço-me com o coração apertado pois nesses dois anos foi minha casa e sinto que sempre será.

Por fim, agradeço a mim por todo trabalho feito noites a fio, por não desistir mesmo quando a caminhada parecia ser algo impossível, por não desistir no início nas noites de solidão e frio quando a angústia apertava meu peito, por toda a dedicação no laboratório, pela busca do conhecimento e sabedoria, por reconhecer a jornada enriquecedora e de aprendizado que foi este mestrado, e a todos que participaram direta e indiretamente desse percurso.

## ÍNDICE

Capítulo 1	– Proteínas: Composição, estrutura e interações. ....	7
Capítulo 2	– Interação Proteína-Ligando: A importância do entendimento da ligação de fármacos às proteínas no plasma sanguíneo. ....	17
Capítulo 3	– Uma breve descrição das técnicas utilizadas. ....	26
Capítulo 4	– Materiais e Métodos. ....	30
Capítulo 5	– Resultados e Discussão.....	35
Capítulo 6	– Conclusões.....	59
Capítulo 7	– Bibliografia.....	61

# 1. RESUMO

“Qualquer um que pretenda ter, mais que uma compreensão extremamente superficial da vida, em todas suas diversas manifestações, necessita da Bioquímica” – Hans Krebs. O estudo das interações entre fármacos e proteína é de grande interesse e valia, o equilíbrio e dinâmica entre molécula e macromolécula determina as características físico-químicas que o sistema terá nas condições em que se encontre. Logo é de suma importância entender os mecanismos que governam essas interações e suas respectivas consequências no sistema de estudo. Portanto o objetivo do presente trabalho é investigar a interação de fármacos com a albumina sérica, estimar suas constantes de associação e dinâmica de interação, para que o sistema aqui descrito sirva como um modelo *in vitro* para os parâmetros dessas interações.

O Capítulo 1, foi baseado nos Capítulos 3 e 4 do Princípios de Bioquímica de Lehninger, e descreve os aminoácidos, proteínas e suas estruturas, bem como aspectos que justificam a formação das ligações peptídicas, e conformações estruturais adotadas por peptídeos e proteínas, em estruturas primárias, secundárias e terciárias. As forças que levam a formação desses complexos e justificam sua estruturação. No Capítulo 2 foi apresentado a ligação de moléculas às proteínas do plasma e suas implicações nas propriedades dos fármacos no plasma, a fração ligada e suas consequências metabolismo do princípio ativo, tempo de meia vida, volume de distribuição e depuração. No Capítulo 3 foram descritas as técnicas utilizadas para estimar as constantes de associação  $K_a$ , através dos hidrogéis de BSA-PEG, os parâmetros termodinâmicos das interações  $K_a$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $T\Delta S$ , através da Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC), e no final foram apresentados os fármacos selecionados para o estudo (ácido salicílico, diclofenac, clorpromazina, acetaminofeno, verapamil e labetalol) e os motivos de serem escolhidos. No Capítulo 4, encontra-se a descrição das condições experimentais utilizadas nos ensaios com os respectivos métodos, caracterização do polietileno glicol ativado e reagentes utilizados nos ensaios. No capítulo 5, estão os resultados obtidos e toda sua análise, de onde tirou-se as constantes de associação para todos os fármacos com o uso dos hidrogéis de BSA-PEG em concordância com a literatura, parâmetros termodinâmicos no ITC para o ácido salicílico e diclofenac. Por fim, no Capítulo 6 é sumarizado todo o trabalho feito nas conclusões tiradas, as vantagens e desvantagens de cada técnica bem como a aplicação das

metodologias para otimizar um modelo *in vitro* que seja capaz de elucidar e prever as propriedades *in vivo* dos princípios ativos utilizados na medicina.

Palavras chave: Ligação de fármacos às proteínas do plasma, Equilíbrio e Dinâmica de interações, Hidrogéis BSA-PEG, Calorimetria de Titulação Isotérmica.

## 2. ABSTRACT

“Anyone who wishes to have more than an extremely superficial understanding of life in all its various manifestations need biochemistry” – Hans Krebs. The study of the interactions between drugs and protein is of great interest and value, the equilibrium and dynamics between molecule and macromolecule determines the physico-chemical properties that the system will have under the conditions in which it is. It is, therefore, of utmost importance to understand the mechanisms that rule these interactions and their consequences in the system. Therefore, the objective of the present work is to investigate the interaction of drugs with serum albumin, to estimate their association constants and dynamics of interaction, so that the system described here serves as an *in vitro* model for the parameters of these interactions.

Chapter 1, was based on Chapters 3 and 4 of Lehninger's Principles of Biochemistry, and describes the amino acids, proteins and their structures, as well as aspects that justify the formation of peptide bonds, and structural conformations adopted by peptides and proteins, in primary, secondary and tertiary structures. The forces that lead to the formation of these complexes and justify their structuring. In Chapter 2 was presented the binding of molecules to plasma proteins and their implications in the properties of the drugs in plasma, the bound fraction and their consequences on the drug metabolism, half-life, volume of distribution and clearance. In Chapter 3 were described the techniques used to estimate the  $K_a$  association constants, through the hydrogels of BSA-PEG, the thermodynamic parameters of the interactions  $K_a$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  and  $T\Delta S$ , through Isothermic Titration Calorimetry (ITC), and in the end were presented the drugs selected for the study (salicylic acid, diclofenac, chlorpromazine, acetaminophen, verapamil and labetalol) and the reasons for being chosen. Chapter 4 contains a description of the experimental conditions used in the tests with their respective methods, characterization of the activated polyethylene glycol and reagents used in these tests. In chapter 5 are the results obtained and all their analysis, from where the association constants for all drugs were obtained with the use of the hydrogels of BSA-PEG in accordance with the literature, thermodynamic parameters in the ITC for salicylic acid and diclofenac. Finally, in Chapter 6 is summarized all the work done in the conclusions drawn, the advantages and disadvantages of each technique as well as the application of the methodologies to optimize an

*in vitro* model that is able to elucidate and predict the *in vivo* properties of the active ingredients used in medicine.

Key words: Plasma protein binding, equilibrium and dynamics, BSA-PEG Hydrogels, Isothermal Titration Calorimetry.

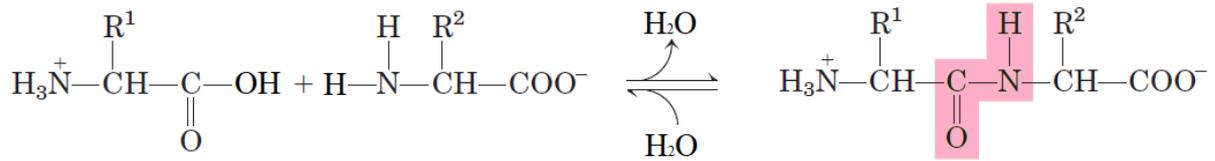
### 3. Abreviações

- $T$  – Temperatura.
- $R$  – Constante universal dos gases.
- $\Delta H$  – Variação de entalpia.
- $\Delta S$  – Variação de entropia.
- $\Delta G$  – Variação da energia livre de Gibbs.
- $\Delta C_p$  – Variação da capacidade calorífica.
- HSA – Albumina humana do soro.
- BSA – Albumina bovina do soro.
- AAG –  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida.
- PEG – Polietilenoglicol.
- PEGa- Polietilenoglicol ativado.
- DMAP – 4-dimetilamino piridina.
- DMSO – Dimetil sulfóxido.
- PBS – Tampão fosfato.
- AC – Acetaminofeno.
- LB – Labetalol.
- VP – Verapamil.
- CP – Clorpromazina.
- SL – Ácido salicílico.
- DC – Diclofenac.
- RMN – Ressonância magnética nuclear.
- ITC – Calorimetria de titulação isotérmica.
- PPB – Ligação às proteínas do plasma.
- $f_b$  – Fração ligada.
- $f_u$  – Fração livre.
- HPLC – Cromatografia líquida de alta performance.
- UV-Vis – Ultravioleta visível.
- FDT – Teoria da droga livre.
- CI – Depuração.
- $V_{dss}$  – Volume de distribuição.
- $t_{1/2}$  – Tempo de meia vida

## **Capítulo 1– PROTEÍNAS: COMPOSIÇÃO, ESTRUTURA E INTERAÇÕES.**

As proteínas desempenham uma função fundamental na regulação dos processos celulares, oferecendo uma ampla gama de funções. Para entender os mecanismos moleculares dos processos biológicos, os bioquímicos concentram-se na análise das proteínas. Estas macromoléculas são onipresentes em todas as células e suas partes, representando as ferramentas moleculares que traduzem a informação genética em ação biológica. As proteínas são formadas a partir de subunidades monoméricas chamadas aminoácidos, que totalizam 20 tipos distintos. Esses aminoácidos são os blocos de construção que determinam a estrutura de uma ampla variedade de proteínas, desde organismos simples até seres humanos. [1]

Esses aminoácidos comuns compartilham a característica de serem  $\alpha$ -aminoácidos, o que significa que possuem um grupo carboxilo e um grupo amino ligados ao mesmo carbono  $\alpha$ . A distinção entre eles reside nas cadeias laterais, que variam em estrutura, tamanho e carga elétrica. A ligação peptídica, formada por meio de uma reação de condensação entre os grupos  $\alpha$ -amino e  $\alpha$ -carboxila dos aminoácidos adjacentes, permite a ligação covalente entre as moléculas de aminoácidos, resultando na formação das proteínas. Isso estabelece uma sequência linear de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica, conferindo uma estrutura tridimensional única e funcional às proteínas. Estes aminoácidos, unidos por ligações peptídicas, formam sequências únicas que determinam a estrutura e a função das proteínas. A variedade de aminoácidos e suas combinações possibilitam a diversidade de proteínas e funções biológicas. Portanto, o estudo das proteínas e sua composição aminoacídica é essencial para decifrar os processos vitais que ocorrem nas células e organismos.[1]



**Figura 1** – Esquema da formação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos, onde o grupo  $\alpha$ -amino, com grupo  $\text{R}^2$ , de um aminoácido atua como nucleófilo para substituir o grupo hidroxilo do outro aminoácido, com grupo  $\text{R}^1$ , para a formação da ligação peptídica que está sombreada.

A estrutura de moléculas complexas pode ser abordada em diversos níveis de complexidade, organizados em uma hierarquia conceitual. No contexto das proteínas, quatro níveis de estrutura são comumente reconhecidos. A primeira delas, a estrutura primária, é descrita pela sequência covalente de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica. O segundo nível, a estrutura secundária, refere-se a arranjos estáveis de resíduos de aminoácidos que resultam em padrões estruturais recorrentes. Já a estrutura terciária engloba o enovelamento tridimensional completo do polipeptídeo. Quando uma proteína é composta por múltiplas subunidades polipeptídicas, suas configurações são denominadas estrutura quaternária. A função de um peptídeo é intrinsecamente ligada à sua sequência única de aminoácidos. Cada proteína possui uma sequência de aminoácidos específica, que dá origem a uma estrutura tridimensional particular, determinando, por sua vez, uma função específica. [1]

Ao comparar proteínas funcionalmente semelhantes em diferentes espécies, foi observado que frequentemente apresentam sequências de aminoácidos semelhantes. Isso ressalta a conexão substancial entre a estrutura primária da proteína e sua função. O entendimento da estrutura primária não apenas fornece insights sobre a estrutura tridimensional e função das proteínas, mas também pode revelar informações sobre sua localização celular e evolução. É importante notar que a sequência de aminoácidos não é absolutamente fixa para uma determinada proteína. Existem exemplos de mutações na estrutura primária, embora algumas variações em certas regiões não impactem a função biológica. A maioria das proteínas apresenta regiões cruciais para suas funções, e a sequência dessas regiões é preservada ao longo da evolução. [1]

A relação entre a sequência de aminoácidos, a estrutura tridimensional e a função das proteínas é uma área complexa e fascinante da biologia molecular. Embora a relação exata entre a sequência e a estrutura nem sempre seja clara, as semelhanças entre sequências de

aminoácidos permitem a identificação de famílias de proteínas com características estruturais ou funcionais compartilhadas. Membros de uma família proteica geralmente compartilham pelo menos 25% de suas sequências, o que reflete algumas propriedades estruturais e funcionais comuns. Embora as ligações entre os resíduos de aminoácidos permitam uma rotação livre, levando a uma variedade virtualmente infinita de conformações possíveis, cada proteína possui uma estrutura tridimensional única e uma função química específica. A cristalização de proteínas indicou que mesmo moléculas muito grandes possuem estruturas distintas e separadas. [1]

O arranjo espacial dos átomos em uma proteína, chamado de conformação, é crucial para a função. Essas conformações possíveis são variações estruturais que uma proteína pode assumir sem romper suas ligações covalentes. Mudanças conformacionais podem ser provocadas por rotação de ligações simples e alterações de pH. Em geral, as conformações mais estáveis termodinamicamente são adotadas em condições específicas. Quando uma proteína está dobrada em uma de suas conformações funcionais, ela é chamada de proteína na sua conformação nativa. A estabilidade da estrutura nativa é definida pela tendência de manter essa conformação específica. A compreensão desses conceitos é essencial para desvendar a complexa relação entre a sequência de aminoácidos, a estrutura e a função das proteínas. [1]

Proteínas nativas são apenas marginalmente estáveis: o  $\Delta G$  que separa os estados dobrados e não dobrados em proteínas comuns, sob condições fisiológicas, está na faixa de somente 20 a 65  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Uma cadeia polipeptídica pode, teoricamente, assumir inúmeras conformações e, como resultado, o estado não dobrado de uma proteína é caracterizado por um alto grau de entropia conformacional, essa alta entropia juntamente com as ligações de hidrogênio dos diversos grupos da cadeia polipeptídica com o meio, tendem a manter o estado não dobrado. As interações químicas que contrabalançam esses efeitos e estabilizam a conformação nativa incluem ligações dissulfeto, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas. Para todas as proteínas de todos os organismos, as interações fracas são especialmente importantes para o enovelamento das cadeias polipeptídicas em suas estruturas secundárias e terciárias, bem como para formação das estruturas quaternárias. [1]

Ao analisarmos a contribuição das interações fracas para a estabilidade das proteínas, fica evidente que as interações hidrofóbicas geralmente desempenham um papel predominante. No entorno aquoso, a água forma uma rede intrincada de ligações de hidrogênio, destacando-se

pela singularidade do seu potencial de ligação. No entanto, a presença de outras moléculas na solução interfere nesse arranjo único entre as moléculas de água. Quando uma molécula hidrofóbica é envolvida pela água, a disposição otimizada das ligações de hidrogênio resulta em uma camada altamente estruturada, conhecida como camada de solvatação. Essa camada se forma ao redor da molécula hidrofóbica. No entanto, a ordem crescente das moléculas de água nessa camada resulta em uma redução desfavorável da entropia da água. [1]

Em contraste, quando grupos hidrofóbicos se agregam, a dimensão da camada de solvatação diminui. Isso ocorre porque cada grupo hidrofóbico não expõe completamente sua superfície à solução. Essa mudança resulta em um aumento favorável da entropia. Essa é a principal contribuição termodinâmica que governa a associação de grupos hidrofóbicos em solução aquosa. Em um contexto polar, grupos normalmente conseguem formar ligações de hidrogênio com a água, tornando-se solúveis em meio aquoso. No entanto, o número de ligações de hidrogênio por unidade de massa é significativamente maior para a água do que para qualquer outro líquido ou solução. Isso pode levar a limites de solubilidade mesmo para substâncias polares, devido à diminuição no total de ligações de hidrogênio por unidade de massa. [1]

A energia de formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre grupos polares em uma macromolécula é em grande parte anulada pela eliminação dessas interações entre esses grupos e a água. No entanto, a liberação da água estruturada, na forma de interações intramoleculares, contribui para a força entrópica que impulsiona o enovelamento. A variação mais significativa de energia livre ocorre por meio das interações fracas dentro da proteína, principalmente devido ao aumento da entropia na solução aquosa circundante. Isso supera a perda de entropia conformacional, já que o polipeptídeo é confinado à sua conformação dobrada. [1]

As interações hidrofóbicas são importantes na estabilização da conformação: o interior de uma proteína geralmente é um núcleo altamente empacotado de cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos. Vale ressaltar que cada grupo polar ou carregado no interior da proteína tenha um par adequado para fazer ligação de hidrogênio ou interação iônica, uma ligação de hidrogênio parece contribuir pouco para a estabilidade da estrutura nativa, porém a presença de grupos que fazem ligação de hidrogênio sem par no núcleo hidrofóbico pode ser tão desestabilizadora que conformações contendo esses grupos são termodinamicamente

instáveis. A variação favorável da energia livre resultante da combinação de vários desses grupos com parceiros na solução que o circunda pode ser maior que a energia livre entre os estados dobrados e não dobrados. Além disso, ligações de hidrogênio entre os grupos em uma proteína se formam cooperativamente em estruturas secundárias repetidas que otimizam essas interações. Dessa maneira, ligações de hidrogênio normalmente têm um papel na condução do processo de enovelamento de proteínas. [1]

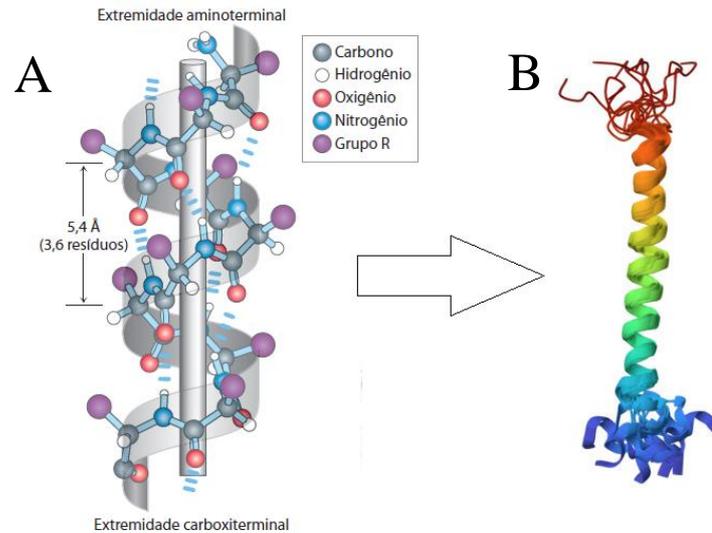
A interação entre grupos carregados com cargas opostas, que formam um par iônico ou uma ponte salina, pode exercer tanto estabilizar bem como desestabilizar a estrutura proteica. Como no caso das ligações de hidrogênio, cadeias laterais de aminoácidos carregados interagem com a água e saís quando a proteína não está dobrada, e a perda dessas interações deve ser considerada quando se avalia o efeito das interações iônicas na estabilidade geral de um polipeptídeo dobrado. Entretanto, a força de uma interação iônica aumenta à medida que se desloca para um ambiente com constante dielétrica mais baixa, do meio aquoso polar para o interior apolar da proteína. Pontes salinas, especialmente aquelas parciais ou totalmente internas na proteína, podem proporcionar uma estabilização significativa da estrutura proteica. Interações iônicas também limitam a flexibilidade estrutural e conferem uma singularidade a uma determinada estrutura proteica que as interações hidrofóbicas não específicas não conseguem proporcionar. [1]

No ambiente atômico empacotado de uma proteína, mais um tipo de interação fraca pode ter efeito significativo, interações de van der Waals são do tipo dipolo-dipolo envolvendo os dipolos elétricos permanentes de grupos, tal como os carbonilos, dipolos transitórios derivados das alterações das nuvens eletrônicas em torno de qualquer átomo, e dipolos induzidos pela interação de um átomo com outro que possui um dipolo permanente ou transitório. À medida que os átomos interagem uns com os outros, essas interações dipolo-dipolo fornecem uma força intermolecular atrativa que opera somente sob uma distância intermolecular limite – 0,3 a 0,6 nm. Essas interações são fracas e individualmente contribuem pouco para a estabilidade da proteína no geral, porém em uma proteína bem empacotada ou na interação de uma proteína com outra proteína ou com uma molécula, o número de tais interações pode ser substancial. [1]

Tendo em mente as forças que envolvem a formação da estrutura proteica, é possível analisar as estruturas secundárias. O termo se refere a qualquer segmento da cadeia polipeptídica e descreve o arranjo espacial de seus átomos na cadeia principal, sem considerar

a posição de suas cadeias laterais ou sua relação com outros segmentos. Uma estrutura secundária comum ocorre quando cada ângulo diedro,  $\phi$  e  $\varphi$ , permanece igual, ou quase igual, ao longo do segmento. Existem alguns tipos de estruturas secundárias que são particularmente estáveis e ocorrem extensamente em proteínas, as mais conhecidas são as hélices  $\alpha$  e as conformações  $\beta$ . Quando um padrão regular não é observado, a estrutura secundária por vezes é chamada de indefinida ou espiral aleatória. Esta última, entretanto, não descreve a estrutura desses segmentos. O curso da maioria dos esqueletos polipeptídicos em uma proteína típica não é aleatório, ele é altamente específico e inalterado na estrutura e função de uma proteína em particular. [1]

Pauling e Corey, em 1948, chamaram de hélice- $\alpha$  uma estrutura helicoidal cujo esqueleto polipeptídico é firmemente enrolado em torno de um eixo imaginário disposto longitudinalmente no centro da hélice, e os grupos R dos resíduos de aminoácidos para fora do esqueleto helicoidal. Os átomos do esqueleto dos resíduos de aminoácidos em uma hélice  $\alpha$  típica têm um grupo de particular de ângulos diedros que definem a conformação da hélice  $\alpha$ , e cada volta de hélice é formada por 3,6 aminoácidos. Os segmentos de hélice  $\alpha$  em proteínas normalmente se desviam ligeiramente desses ângulos diedros, podendo gerar curvaturas ou torções no eixo da hélice. Essas estruturas formam-se mais facilmente do que outras conformações devido à otimização das ligações de hidrogênio internas. [1]



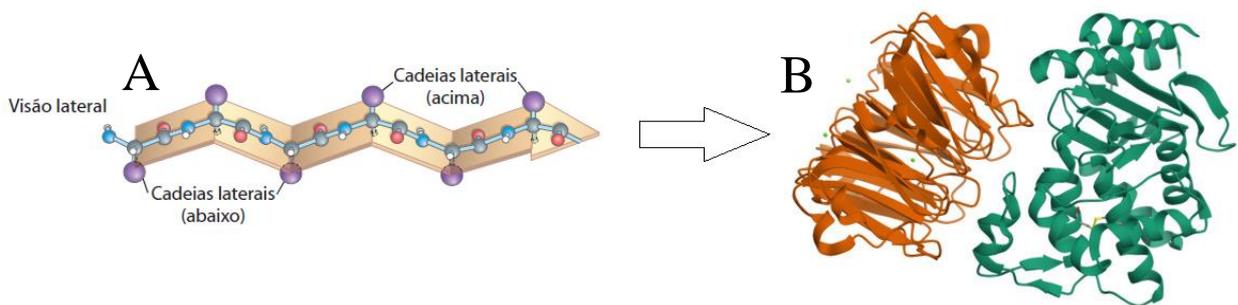
**Figura 2** – Modelo de hélice  $\alpha$ . **A** Modelo de bastão e esfera elucidando as ligações de hidrogênio internas da cadeia [1]. **B** Estrutura secundária do polipeptídeo LH1, composto por 32 resíduos de aminoácidos, grande parte estruturados em hélices  $\alpha$ . [2]

A estrutura é estabilizada por uma ligação de hidrogênio entre o átomo de nitrogênio de uma ligação peptídica e o átomo de oxigênio da carbonilo do quarto aminoácido no lado aminoterminal da ligação peptídica, na hélice  $\alpha$ , cada ligação peptídica participa de tais ligações de hidrogênio com exceção daquelas que estão próximas às extremidades. Cada volta sucessiva da hélice  $\alpha$  é mantida por voltas adjacentes por três ou quatro ligações de hidrogênio, a proporcionar uma significativa estabilidade à estrutura global, nas extremidades do segmento  $\alpha$  helicoidal há sempre três ou quatro grupos carbonilo ou amino que não podem participar desse padrão helicoidal de ligações de hidrogênio. Esses estabelecem interações com o meio, em que suas ligações de hidrogênio podem ser feitas com a água ou outras partes da proteína que podem proteger a hélice e proporcionar os compostos necessários para que a interação ocorra. [1]

Nem todos polipeptídeos podem formar uma hélice  $\alpha$  estável, cada resíduo de aminoácido tem uma propensão intrínseca de formar uma hélice  $\alpha$ , consequência das propriedades do seu grupo R e como elas afetam na capacidade de seus átomos que fazem as ligações da cadeia principal em se ajustar aos ângulos diedros característicos. A posição de um resíduo de aminoácido em relação a seus vizinhos também é importante, interações entre cadeias laterais dos aminoácidos podem estabilizar ou desestabilizar a estrutura  $\alpha$ -helicoidal. [1]

Já em 1951, Pauling e Corey reconheceram um segundo tipo de estrutura recorrente, a conformação  $\beta$ . Essa é uma conformação mais estendida das cadeias polipeptídicas, e sua

estrutura é novamente definida pelos esqueletos dos átomos arranjados de acordo com grupo característico de ângulos diedro. Na conformação  $\beta$ , a sequência de resíduo de aminoácidos está estendida em forma de ziguezague, o arranjo de vários segmentos na conformação  $\beta$  é chamado de folha  $\beta$ . As ligações de hidrogênio são formadas entre segmentos adjacentes da cadeia polipeptídica dentro da folha, os segmentos que formam a folha  $\beta$  normalmente estão próximos na cadeia polipeptídica, mas também podem estar distantes uns dos outros na sequência linear do polipeptídeo, eles podem até estar em cadeias polipeptídicas diferentes. Os grupos R dos aminoácidos adjacentes se projetam da estrutura  $\beta$  em direções opostas, a criar um padrão alternado. Cadeias polipeptídicas adjacentes em uma folha  $\beta$  podem ser tanto paralelas quanto antiparalelas, as estruturas são, de certa forma, semelhantes, apesar de o período de repetição ser menor na conformação paralela e o padrão das ligações de hidrogênio ser diferente. As ligações de hidrogênio entre os segmentos são alinhadas na folha  $\beta$  antiparalela, enquanto elas são distorcidas ou não alinhadas na variante paralela. [1]



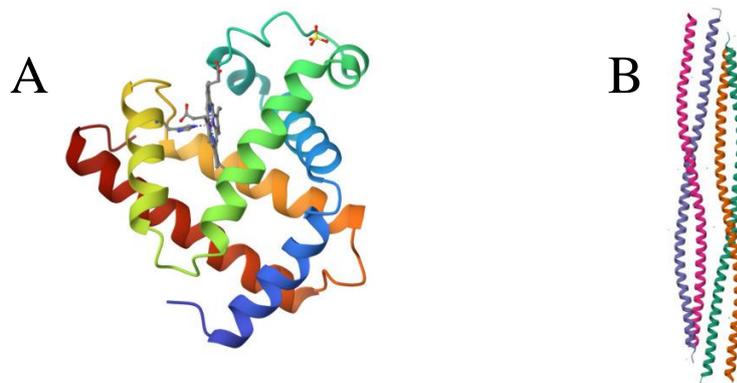
**Figura 3** – **A** conformação  $\beta$  da sequência polipeptídica. **B** Estrutura do complexo formado entre BLIP-II em marrom e TEM-1  $\beta$ -lactamase em verde, as estruturas secundárias do BLIP-II são predominantemente folhas  $\beta$ . [3]

Qualquer forma de assimetria estrutural em uma molécula leva a diferenças de absorção de luz circularmente polarizada para a esquerda em relação à direita, a medida dessa diferença é chamada de espectroscopia de dicroísmo circular. Uma estrutura ordenada, como uma proteína dobrada, resulta em um espectro de absorção que pode ter picos ou regiões com valores tanto positivos como negativos, para proteínas os espectros são obtidos na região do UV distante de 190 a 250 nm. A entidade que absorve a luz, ou cromóforo, é a ligação peptídica, um sinal é obtido quando essa ligação se localiza em uma estrutura dobrada. A diferença do coeficiente de extinção molar para luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita é colocada no gráfico em função do comprimento de onda, as hélices  $\alpha$  e folhas  $\beta$  possuem espectros característicos, e com isso bioquímicos podem determinar se proteínas estão dobradas, estimar

a fração das duas estruturas secundárias e monitorar transições entre os estados dobrados e não dobrados. [1]

O arranjo tridimensional total de todos os átomos de uma proteína é chamado de estrutura terciária. Enquanto o termo estrutura secundária refere-se ao arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos em sequência de uma cadeia polipeptídica, a estrutura terciária inclui aspectos de alcance mais longo da sequência de aminoácidos. Aminoácidos que estão distantes na estrutura primária e em diferentes tipos de estruturas secundárias podem interagir na conformação da proteína inteiramente dobrada, a localização das curvaturas nas cadeias polipeptídicas e sua direção e ângulo são determinados pelo número e localização de resíduos específicos que tendem a formá-las. Algumas proteínas contêm duas ou mais cadeias polipeptídicas distintas, ou subunidades, que podem ser idênticas ou não, o arranjo dessas subunidades proteicas em complexos tridimensionais constitui a estrutura quaternária. [1]

Considerando esses níveis mais altos de estrutura, é conveniente designar dois grandes grupos nos quais muitas proteínas podem ser classificadas: proteínas fibrosas, com cadeias polipeptídicas arranjadas em longos filamentos ou folhas, e proteínas globulares, com cadeias polipeptídicas dobradas em forma esférica ou globular. Os dois grupos são estruturalmente diferentes, as proteínas fibrosas no geral são formadas por um único tipo de estrutura secundária, e sua estrutura terciária é relativamente simples, já as proteínas globulares normalmente têm diferentes tipos de estruturas secundárias. Os dois grupos também se diferenciam funcionalmente, as estruturas que garantem o suporte, a forma e proteção externa aos vertebrados são feitas de proteínas fibrosas, como a  $\alpha$ -queratina por exemplo, enquanto enzimas e proteínas reguladoras em sua maioria são globulares, a exemplo da mioglobina. [1]



**Figura 4** – **A** Estrutura quaternária da mioglobina, uma proteína globular [4]. **B** A estrutura dos filamentos proteicos de queratina, uma proteína fibrosa. [5]

O conhecimento da estrutura tridimensional de uma proteína é importante para entender seu funcionamento, no entanto a estrutura mostrada em duas dimensões em uma página é meramente ilusória. As proteínas são macromoléculas dinâmicas cujas funções dependem de modo quase invariável de interações com outras moléculas, e essas interações são influenciadas de maneiras fisiologicamente importantes por mudanças sutis ou súbitas na conformação proteica. As interações moleculares são de suma importância para a função protéica, a qual envolve interações com uma grande variedade de moléculas diferentes, a maioria dessas interações são transitórias embora possam ser a base para de processos fisiológicos complexos, como transporte de moléculas, função imune e contração muscular. [1]

As funções de muitas proteínas envolvem a ligação reversível com outras moléculas, uma molécula que interage de modo reversível com uma proteína é chamada de ligando, que pode ser qualquer tipo molécula, até mesmo outra proteína. A natureza transitória das interações proteína-ligando é fundamental para a vida, pois permite que um organismo responda de maneira rápida e reversível a mudanças ambientais e condições metabólicas. Um ligando liga-se com uma região da proteína chamada de sítio de ligação, a qual é complementar a ele em tamanho, forma, carga e caráter hidrofóbico ou hidrofílico, além disso a interação pode ser específica, ou seja, as proteínas podem distinguir milhares de moléculas distintas em seu ambiente e interagir seletivamente somente com uma ou algumas. Determinada proteína pode possuir sítios de ligação diversos para ligandos diferentes, essas interações moleculares específicas são cruciais na manutenção do alto grau de ordem em um sistema vivo. [1]

É de suma importância compreender a estrutura proteica como um todo, desde sua sequência de aminoácidos ao seu arranjo tridimensional, são esses fatores que irão determinar suas funções e propriedades no meio seja ele qual for. Isso pode ajudar a elucidar a interação de proteínas com diversas substâncias e solventes, e é justamente nesse tópico que iremos focar adiante no presente trabalho, na interação entre proteínas globulares e diferentes moléculas. Para que possamos estudar suas propriedades no equilíbrio e na dinâmica molecular entre as espécies envolvidas no sistema, e assim obter dados termodinâmicos e cinéticos que ajudem a entender e modular tais sistemas.

## **Capítulo 2 – INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANDO: A IMPORTÂNCIA DO ENTENDIMENTO DA LIGAÇÃO DE FÁRMACOS ÀS PROTEÍNAS NO PLASMA SANGUÍNEO.**

A alta concentração de proteínas no plasma e a tendência de inúmeras substâncias a se ligarem a elas, levaram os grupos de desenvolvimento de medicamentos a reconhecer a importância da ligação à proteína plasmática (PPB do inglês *plasma protein binding*) na modulação da concentração efetiva do princípio ativo em locais de alvo farmacológicos. A teoria da droga livre (FDT do inglês *Free Drug Theory*) está sendo cada vez mais usada para explicar as relações de farmacocinética e farmacodinâmica, a FDT afirma que, na ausência de processos energéticos (transportadores de absorção e de efluxo, gradiente de pH), após o estado de equilíbrio dinâmico tenha sido alcançado, a concentração de fármaco livre no plasma (espaço extracelular) é igual à concentração do fármaco livre nos tecidos (espaços intracelulares) e apenas a fração livre da substância em tecidos está disponível para a ligação no receptor alvo e, portanto, a atividade farmacológica. Logo, a fração livre do fármaco no plasma deve refletir a concentração do fármaco livre no sítio alvo nos tecidos. [6]

A concentração total do fármaco no plasma pode ser significativamente diferente da concentração total do fármaco nos tecidos, mas para uma substância com uma rápida taxa de permeação, a concentração livre intracelular do fármaco é igual à concentração livre no plasma. É, portanto, uma preocupação comum que, quando a concentração de fármaco livre do medicamento A aumenta devido à ligação de outro medicamento B, que possui uma interação forte, com proteínas plasmáticas ou devido a alterações nos níveis de proteína endógena em certos estados de doença. O aumento da concentração da substância A livre potencialmente pode causar toxicidade e precisar de ajuste. Além da eficácia/toxicidade mediada pelo alvo, no caso de metabolismo relacionado com interações fármaco-fármaco, as informações do PPB também são úteis para estimar a concentração livre/eficaz de drogas que mediam a inibição de medicamentos, capazes de metabolizar enzimas e transportadores, que podem gerar uma reação adversa. [6]

As propriedades farmacológicas estão frequentemente diretamente relacionadas com a concentração de fármacos livres no plasma, esta noção repousa no conceito de que apenas a substância não ligada está disponível para a permeação passiva para o sítio de ligação para

interagir com o alvo molecular. Consequentemente, a fração ligada não pode difundir passivamente para o sítio de ligação e, portanto, é incapaz de interagir com o alvo, este conceito é refletido pelo par de equações de equilíbrio abaixo, onde D é fármaco livre, PP são proteínas plasmáticas, DPP é o fármaco ligado à proteína plasmática, R é o alvo molecular no sítio de ligação, e DR é o fármaco alvo-ligada. [7]



Embora a constante de equilíbrio para a formação de DR possa ser ordens de magnitude maior do que para a ligação às proteínas plasmáticas, para fármacos difundidos passivamente a fração livre do composto no sítio de ligação ainda será limitada pela concentração do fármaco livre no plasma. No entanto, se a migração do fármaco livre para o alvo molecular for mediada por outros processos que não a difusão passiva, como a presença de um gradiente de pH sobre membrana que pode afetar a solubilidade do medicamento ou a ocorrência de efluxo celular ativo. A formação de DR, e, portanto, a resposta biológica, pode não ser uma função direta da concentração de medicamento livre no plasma. Nestes casos, as equações de equilíbrio ainda permanecerão, mas a taxa de formação de DR pode não mais ser limitada pela difusão da fração livre para o sítio de ligação, mas sim pela taxa de transporte ativo e/ou efluxo. [7]

A remoção de fármacos do corpo pode ser influenciada pelo PPB, mas a tendência dependerá da rota de eliminação, por exemplo, a extensão da ligação às proteínas plasmáticas pode melhorar a remoção, disponibilizando o princípio ativo ao fígado através do fluxo sanguíneo, enquanto limita a distribuição para os tecidos do sistema. Por outro lado, a remoção renal através da filtração glomerular pode ser retardada pela extensa ligação às proteínas plasmáticas, eliminando essencialmente a fração através da filtração [8]. O PPB de possíveis fármacos, podem ser medidos *in vitro* usando plasma de várias espécies, incluindo humanos. A comparação da fração livre entre espécies e em uma gama de concentrações de fármacos é útil na obtenção de resultados pré-clínicos de farmacocinética e farmacodinâmica, bem como na previsão das propriedades de um possível fármaco em humanos. [7]

A ligação às proteínas plasmáticas tenha uma influência significativa na taxa de difusão da substância entre o plasma e os tecidos, e, portanto, influencia na sua depuração (Cl do inglês *clearance*):

$$Cl_{hep} = \frac{Q_H \cdot f_u \cdot Cl_{int}}{Q_H + f_u \cdot Cl_{int}}$$

Onde  $Q_H$  é fluxo sanguíneo para o fígado,  $f_u$  a fração livre no plasma,  $Cl_{int}$  a depuração intrínseca e  $Cl_{hep}$  a depuração hepática.

E no volume de distribuição ( $V_{dss}$ ) dos princípios ativos:

$$V_{dss} = V_P + V_T \frac{f_u}{f_{u,T}}$$

Onde  $V_{dss}$  é o volume aparente de distribuição,  $V_P$  volume do plasma,  $V_T$  volume do tecido e  $f_{u,T}$  fração livre no tecido.

A maioria dos medicamentos depurados por vias renais são hidrofílicos e demonstram baixo PPB, no caso de fármacos submetidos a depuração hepática, o grau de PPB não desempenha um papel importante na eliminação pelo fígado de fármacos de alta depuração. Para os fármacos de baixa depuração, no entanto, as mudanças no PPB afetarão a remoção hepática do medicamento. [6]

Como o PPB desempenha um papel parcial na determinação da depuração e do volume de distribuição, dois parâmetros chave que determinam a meia-vida dos medicamentos, bem como na farmacologia, é muito comum avaliar o PPP já durante a otimização do composto como uma ferramenta primária ou em etapas posteriores a serem incorporadas em modelos farmacocinéticos/farmacodinâmicos e explicar a separação entre as relações de potência/eficácia e concentração. Em geral, é desejável evitar medicamentos altamente ligados às proteínas plasmáticas, uma vez que pequenas alterações no PPB de um medicamento altamente ligado podem levar a alterações significativas na sua fração livre. [6]

O tempo de meia vida  $t_{1/2}$  é determinado tanto pela Cl quanto pelo  $V_{dss}$ , ambos são parcialmente dependentes do PPB. Portanto, o efeito do PPB no  $t_{1/2}$  é difícil de prever, clorambucil um quimioterápico é mais de 99% ligado à albumina sérica, porém tem  $t_{1/2}$  de

somente 1-2 horas, enquanto labetalol possui uma fração ligada de 50% em plasma e um  $t_{1/2}$  de 3 a 3,5 horas [9]. É sugerido que além de extensa, uma forte ligação à proteína (alto  $K_a$ ) pode ser um pré-requisito para que o PPB prolongue o tempo de meia vida de substâncias. Tentativas de explicar através de modelos recentes o porquê drogas com alto PPB também têm uma eliminação alta (mediada por metabolismo e transporte), tem sido destacado que a taxa de CI de drogas é uma combinação de não só da taxa de eliminação via órgãos ( $k_{out}$ ) mas também é altamente dependente de  $k_{on}$  e  $k_{off}$ , as constantes de taxas de associação e dissociação, respetivamente, de ligação às proteínas. Na maioria dos casos, valores de  $k_{off}$  não são baixos o suficiente para limitar compostos altamente ligados às proteínas. [6]

Embora a avaliação do PPB seja rotineiramente realizada tanto nas fases de descoberta como de desenvolvimento, ainda assim, não há estratégia comum sobre como utilizar esses dados para seleção de compostos ou mitigação de riscos. Inúmeras aplicações em várias áreas terapêuticas demonstram como diferentes equipes de pesquisa adotaram estratégias para modular a ligação/afinidade de compostos com HSA para maximizar a potência *in vitro*, e tentaram melhorar a eficácia *in vivo* de séries existentes ou descobrir novas séries superiores. Uma compreensão completa das propriedades fisiológicas de uma substância, a localização do receptor alvo e como um composto alcança o alvo é vital para avaliar o papel da fração livre no plasma na ação farmacológica do composto. [6]

Relações de potência do fármaco versus fração livre são mais fáceis de estabelecer quando a permeabilidade celular e o transporte ativo não são levados em consideração, ou seja, os alvos farmacológicos residem no espaço extracelular. Nos casos em que os receptores alvo estão localizados no espaço intracelular, correlações inequívocas entre a fração livre no plasma e a eficácia *in vivo* são mais difíceis de serem estabelecidas, a principal razão para isso é a indisponibilidade de métodos confiáveis para determinar a concentração de droga livre dentro da célula/tecido em comparação com concentração total/livre de droga no plasma, e estabelecer se a fração livre em plasma é igual à fração livre no tecido, que é a principal suposição da teoria da droga livre. Deve-se ter em mente que a concentração total do fármaco, medida no plasma ou nos tecidos, pode não ser uma representação precisa da substância farmacologicamente ativa no local do receptor biológico. [6]

A otimização do PPB provou ser muito útil no desenvolvimento de inibidores de peptidil peptidase DPP-IV, para o tratamento de diabetes melitus tipo 2. Compostos de referência

farmacologicamente ativos de primeira geração, apesar de serem potentes, precisavam de uma concentração plasmática muito maior que a esperada (baseada nos ensaios *in vitro*) para atingir eficiência. Para entender a dissociação entre potência e eficácia, foram realizados ensaios *in vitro* utilizando plasma humano e indicaram um alto PPB no caso do composto A. Alterações feitas no composto de referência levaram a produção de um novo composto, um inibidor DPP-IV oralmente ativo e potente, com um PPB reduzido e com eficácia, potência *in vitro*, concentração no plasma, e fração livre bem correlacionadas. [6]

Têm inúmeras publicações destacando a otimização do PPB no desenvolvimento de drogas. No entanto, generalizar essa ideia não funciona durante os estágios iniciais de otimização no planejamento de fármacos, ou seja, não existe um valor ou medida de PPB padrão que vá garantir o sucesso de uma droga ou uma classe de drogas. Otimização do PPB de um fármaco deve ser feito somente quando houver um bom entendimento de farmacocinética e farmacodinâmica estiver estabelecido, é crítico saber o mecanismo de ação da droga antes de avaliar o efeito da ligação às proteínas na sua eficácia. PPB pode ser como uma faca de dois gumes, decréscimo da fração ligada gera um aumento apreciável de droga livre no local do receptor alvo, mas um aumento na fração livre também pode resultar em uma eliminação mais rápida do fármaco e, portanto, exige maiores doses para manutenção da ação farmacológica. Um PPB alto pode proteger a droga de eliminação, e com isso manter níveis elevados em tecidos necessários para sua ação farmacológica. [6]

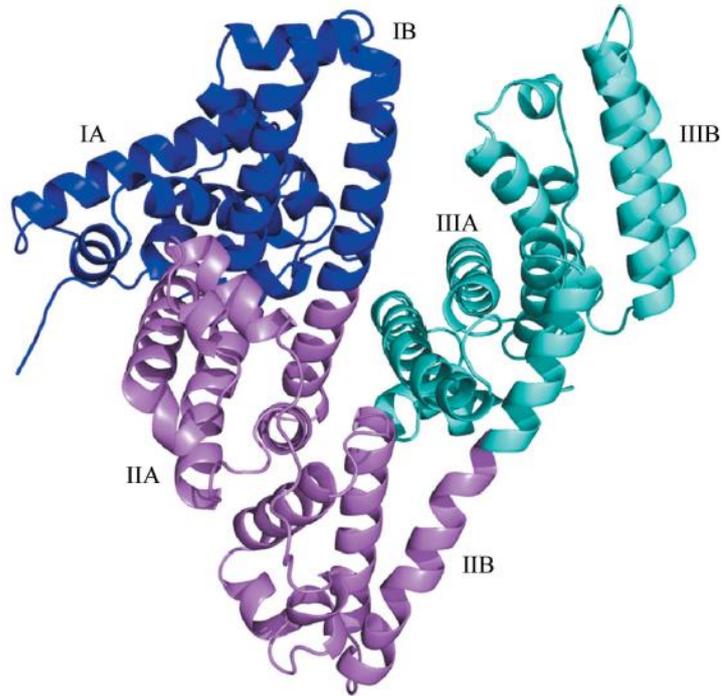
O plasma contém várias proteínas que funcionam como transportadoras de moléculas endógenas e exógenas em todo o sistema circulatório, sendo que as proteínas plasmáticas mais frequentemente associadas à ligação de drogas com baixo peso molecular no plasma são a albumina sérica e a  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida (AAG do inglês  *$\alpha$ -1-acid glycoprotein*) e, em menor grau, as globulinas e lipoproteínas [10]. A importância relativa dessas proteínas para a ligação de drogas é determinada pela presença de locais de ligação específicos de alta afinidade contidos nas proteínas e pela abundância das mesmas.

Em concentrações de 500 a 700  $\mu$ M, a albumina sérica humana (HSA do inglês *Human Serum Albumin*) é a proteína mais abundante no plasma humano e ajuda a manter a pressão osmótica e o pH na corrente sanguínea. A HSA atua como uma carreadora de drogas, peptídeos, ácidos gordos, bilirrubina e outros compostos endógenos. HSA é composta por 585 resíduos de aminoácidos e é em sua maior parte composta por hélices  $\alpha$ , contendo três domínios homólogos,

sendo eles I, II e III. Cada domínio é separado em dois subdomínios separados A e B, conectados por voltas aleatórias. Devido à sua alta afinidade para os ácidos gordos de cadeia longa, a albumina desempenha um papel chave no transporte e na modulação indireta do seu metabolismo, enquanto para muitas hormônas e vitaminas provavelmente funciona como uma proteína de ligação secundária, já que transportadores mais específicos têm sido identificados. Em alguns casos, a ligação de moléculas pequenas é responsável pelo papel protetor da albumina ou a ligação de toxinas exógenas, ou produtos de peroxidação lipídica. Quanto às drogas, a HSA representa a maior parte da ligação no plasma junto com a AAG. [11]

Como regra geral, as moléculas ácidas ligam-se principalmente à albumina, enquanto que as moléculas básicas, como a maioria dos agentes beta-bloqueadores, têm maior afinidade para a  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida. A ligação de drogas às proteínas plasmáticas controla as concentrações livres e ativas bem como fornece um reservatório para uma ação mais longa, portanto, a interação de uma droga com, e a concorrência por locais de ligação nas proteínas plasmáticas pode afetar fortemente a distribuição, a eliminação, bem como suas propriedades farmacodinâmicas e tóxicas. A competição entre dois fármacos para a ligação à proteína plasmática pode afetar fortemente a disposição medicamentosa de ambas as substâncias, com possíveis graves consequências fisiológicas [11]. Estes fenômenos são importantes no caso de medicamentos fortemente ligados, como por exemplo a administração concomitante de warfarina com fenilbutazona resulta em um risco aumentado de hemorragia em pacientes, devido a maior concentração de anticoagulante livre, causada pela diminuição de sua ligação à albumina devido a ligação da fenilbutazona com a proteína. [12]

Difrações de raio X mostram que a albumina em cristais, ao menos livre de ácidos graxos, possui um formato triangular ou de coração. Isso favorece a imagem arredondada em detrimento da alongada obtida por estudos físico-químicos, estudos mostram que em solução a albumina tem um formato elipsoidal semelhante a um submarino [13]. As duas noções distintas podem surgir da flexibilidade da molécula de albumina, que lhe permite assumir diferentes configurações quando empacotada em um cristal ou livre em solução. A tempos a albumina tem sido reconhecida como uma molécula altamente helicoidal, e difrações de raio X mostram que 67% da HSA envolvidos em um total de 28 regiões hélice  $\alpha$ , o restante da cadeia é cadeia peptídica estendida com 10% de voltas  $\beta$  [14]. Estudos de dispersão rotatória ótica e dicroísmo circular previram uma composição de hélice  $\alpha$  de 54 a 68%, espectroscopia Raman encontrou 60% baseado na análise de linhas de amida III. [15]



**Figura 5** – Estrutura quaternária da albumina, o domínio I destacado em azul, II em roxo e III em azul claro, cada um com seus respectivos subdomínios A e B. [19]

A flexibilidade da albumina, juntamente com uma carga distribuída de forma não homogênea ao longo da molécula, torna possível a ligação para muitas classes de compostos caracterizados por estruturas diferentes. Substâncias aniônicas hidrofóbicas são as mais fortemente ligadas à albumina. A ligação à albumina é muitas vezes altamente específica, pelo menos para baixa concentração do ligando, vários locais de ligação estão frequentemente presentes possuindo afinidades de ligação diferentes. Dois desses locais de ligação, sítios I e II de acordo com a definição de Sudlow, são melhor caracterizados e estão envolvidos na ligação de um número incrivelmente alto de classes de compostos. Sítio I, ou sítio de ligação da warfarina-azapropazona, é o sítio de ligação de maior afinidade para, entre outros, anticoagulantes e medicamentos anti-inflamatórios não esteroides. Por outro lado, o sítio II, sítio da ligação triptofano-benzodiazepina, também é um sítio específico importante para a classe de derivados de ácido propiônico. A estrutura tridimensional da albumina sérica humana obtida pela análise de raios-X de diferentes complexos de ligando-proteína apoia esta hipótese, mostrando a existência de duas cavidades de ligação principais no domínio IIA e IIIA do polipeptídeo. [11]

Estes dois locais de ligação pré-formados e estáveis de alta afinidade sítiam a ligação da maioria das drogas. A ligação apenas a este local é observada para concentrações terapêuticas, embora para concentrações mais elevadas do fármaco este se possa ligar também

a outros locais de ligação, com menor afinidade e seletividade. No entanto, uma representação mais dinâmica da proteína, uma proteína flexível que muda de forma dependendo de seu ambiente, é um modelo melhor para explicar completamente as propriedades de ligação da albumina, incluindo a ligação estereoespecífica dos ligandos quirais. Além disso, as propriedades de ligação da HSA podem ser significativamente afetadas pela variabilidade intra e interindividuais devido a diferentes fatores fisiológicos ou patológicos, esses aspectos podem influenciar as propriedades de ligação da HSA em virtude de mudanças na sua estrutura, concentração, e através de ligações reversíveis ou covalentes com substâncias endógenas e xenobióticos, como no caso da administração concomitante de medicamentos que interagem entre si. [11]

Por ser a proteína mais abundante no plasma e possuir todas essas propriedades de ligação a diversas substâncias endógenas e exógenas, a HSA é tida como uma proteína modelo para estudar as interações ligando-proteína *in vitro*. Não obstante, a albumina sérica bovina (BSA do inglês *Bovine Serum Albumin*) também tem sido estudada largamente nos últimos anos, principalmente pela sua alta similaridade com a albumina sérica humana. [16]

BSA e HSA são parecidas em termos de interações proteína-ligando, muitos estudos nessa área obtiveram sucesso ao empregar a BSA como uma substituta da HSA devido à similaridade em tamanho e ambiente dos sítios de ligação. A albumina sérica bovina é utilizada em testes de ligação e farmacocinética de drogas no lugar da humana, pois é muito mais barata e fácil de se obter em comparação com a HSA. BSA possui 583 resíduos de aminoácidos e uma sequência 75,6% equivalente à HSA. Como a HSA, contém três domínios e 17 pontes de sulfeto conservadas que contribuem para alta estabilidade da proteína. Propriedades estruturais e dinâmicas parecidas, acessibilidade do solvente em locais de ligação comparáveis e movimentos dos domínios tanto na BSA quanto HSA indicam afinidades similares nas interações proteína-ligando, e essas propriedades ajudam a explicar o porquê a BSA pode ser utilizada como uma substituta da HSA em experimentos *in vitro* [17]. No entanto, o número diferente de resíduos aromáticos na HSA (W214 no subdomínio IIA) e BSA (W135 e W214 localizados nos subdomínios IB e IIA) podem afetar a interação de ligandos aromáticos no sítio Sudlow I e algumas propriedades espectroscópicas. [18]

O objetivo desse trabalho será utilizar a albumina sérica bovina como uma proteína modelo para ensaios *in vitro*, visando estudar a termodinâmica e cinética das interações entre a

proteína e alguns fármacos modelo. As técnicas utilizadas serão discutidas no próximo capítulo, bem como a informação que esperamos obter de cada uma.

## Capítulo 3 – UMA BREVE DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS UTILIZADAS.

### 3.1 - Ensaio de ligação utilizando Hidrogéis de PEG-BSA

Como já foi dito, a ligação de moléculas à albumina sérica é de grande interesse. Nesse sentido, hidrogéis feitos com proteínas são de suma relevância devido ao seu alto conteúdo de água que facilita a difusão de xenobióticos e o rápido estabelecimento do equilíbrio entre o meio aquoso e a proteína. Além disso, em comparação com a proteína em solução, o uso de hidrogéis facilita a quantificação da ligação de moléculas devido ao acesso direto ao meio aquoso e a possibilidade de regeneração e reuso em diferentes ensaios de ligação [20]. Contudo, para avaliar a ligação de moléculas à proteína no hidrogel, é necessária uma alta porosidade. Isso deve-se a difusão limitada do ligando através do hidrogel que diminuiria significativamente sua associação com a proteína, e por causa da redução na flexibilidade conformacional da proteína em um hidrogel altamente reticulado leva à uma diminuição da afinidade proteína-ligando. [21]

Tentativas de aumentar a porosidade e diminuir restrições conformacionais impostas as proteínas do hidrogel, incluem o uso de agentes ativados maiores, e a diminuição do número de grupos reativos na proteína. O uso de hidrogéis para quantificar afinidade de interação proteína-ligando pode de facto corresponder a uma melhor estratégia em relação as condições achadas *in vivo*. Isso é particularmente relevante para proteínas que estão presentes em grandes quantidades no plasma e tecidos. Enquanto a ligação a albumina *in vivo* tem de competir com vários outros ligandos presentes, diminuindo a quantidade de ligando associado à albumina. Quando é o uso de sistemas *in vitro* para caracterizar a interação, concentrações de proteína bem menores precisam ser utilizadas para estimar com precisão a afinidade da interação. [22]

Fortier et.al sintetizaram hidrogéis formados por polietilenoglicol (PEG) e albumina sérica bovina. Os hidrogéis são translúcidos e vítreos, e quando hidratados, apresentam propriedades mecânicas semelhantes aos géis de poli(acrilamida) [23]. A mistura de polietilenoglicol ativado (PEGa) com BSA em uma proporção otimizada, em que a liberação de proteína após a lavagem seja a mínima possível, gera um hidrogel com um bom *swelling* em pH 7,4 e tampão fosfato 0,1M). Medidas que podem reforçar o possível uso do hidrogel em ensaios de ligação entre drogas e BSA. [20]

Seguindo a metodologia feita por Fortier, Coelho et.al utilizou os hidrogéis para avaliar a ligação de sondas fluorescentes (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il; NBD-Cn com n = 4,6 e 8)

à albumina sérica bovina, bem como analisar as possíveis alterações estruturais na proteína devido a incorporação ao hidrogel. O hidrogel mostrou uma boa capacidade de incorporar água, com um fator de 10 no *swelling*, correspondendo a 91% de água no hidrogel. Uma pequena quantia, mas crescente, de BSA foi observada no meio aquoso, com aproximadamente 2% da proteína total do hidrogel sendo liberada após vinte dias. Para tempos de incubação maiores que esse, a integridade do hidrogel é comprometida e a suspensão torna-se turbida. [20]

Dicroísmo circular indicou que as estruturas secundárias da BSA foram preservadas após a polimerização, sugerindo fortemente que suas propriedades de ligação são também mantidas. Isso reflete nos dados de interação dos NBD-Cn com a proteína, uma vez que sua concentração diminuía no meio aquoso com o tempo, isso mostrou que o NBD-C<sub>8</sub> ligou ao hidrogel com alta eficiência, em concordância com a afinidade de ligação à BSA em solução. A diminuição da concentração, no meio aquoso, em relação ao tempo dos NBD-Cn e os valores obtidos para as frações no equilíbrio foram utilizados para calcular a constante de associação com o hidrogel, e os resultados obtidos foram bem semelhantes aos obtidos para BSA livre em solução. Isso mostra que as propriedades de ligação da BSA são mantidas, e por isso iremos utilizar os hidrogéis para estimar a ligação de drogas à albumina bovina com o objetivo de obter constantes de associação. [20]

### 3.2 - Calorimetria de Titulação Isotérmica

Calorimetria de titulação isotérmica (ITC do inglês *Isothermal Titration Calorimetry*) é a única técnica que consegue medir diretamente a energia de ligação de processos biológicos, incluindo interação proteína-ligando, proteína-proteína, proteína-carboidrato, proteína-lípido e antígeno-anticorpo. ITC tem a capacidade de determinar precisamente a energia livre de Gibbs, entalpia, entropia e diferenças na capacidade calorífica associadas à ligação. O equipamento utilizado foi um calorímetro de fluxo de calor operando de acordo com o princípio de compensação de potência dinâmica, ou seja, mede a quantidade de potência ( $\mu\text{cal}/\text{sec}$ ) necessária para manter uma diferença de temperatura constante (quase zero) entre a amostra e a célula de referência. [24]

Cada injeção da seringa contendo uma solução, geralmente de ligando, ativa a reação de ligação e, dependendo da afinidade de ligação e as concentrações dos reagentes na célula, uma certa quantidade de complexo macromolécula-ligando é formado, a formação do complexo é acompanhada pela liberação (fenômeno exotérmico) ou consumo (fenômeno endotérmico) de calor que causará uma diferença de temperatura entre as duas células. Então o sistema de

resposta abaixa ou aumenta a potência térmica aplicada para compensar a alteração de temperatura, após cada injeção o sistema atinge o equilíbrio e o balanço de temperaturas é restaurado. Logo, o sinal registrado mostra um típico padrão de deflexão na forma de um pico e o integral da área abaixo do pico dá a quantidade de calor associada a cada injeção. [24]

Ligandos com uma afinidade de ligação moderada em relação à macromolécula alvo constituem a maioria dos casos em sistemas biológicos, e com a albumina não é diferente, contudo, ligandos com baixa ou alta afinidade também são encontrados. Quando a constante de associação entre a macromolécula e o ligando é moderada,  $10^4 < K_a < 10^8 \text{ M}^{-1}$ , é possível determinar a constante e a entalpia de ligação simultaneamente numa única experiência e é também a faixa útil para uma medida precisa da afinidade de ligação por ITC padrão, sem a necessidade de estratégias experimentais mais elaboradas. [24]

ITC tem sido utilizado na caracterização e otimização de séries de compostos como possíveis drogas já que fornece informações completas sobre a associação de um ligando ao seu alvo em termos de componentes termodinâmicos  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta C_p$ . As últimas estratégias para identificação e caracterização dependem quase totalmente da energia livre de Gibbs da ligação. O  $\Delta G$  é um resultado de um balanço delicado entre as contribuições entálpicas e entrópicas, e diferentes combinações de  $\Delta S$  e  $\Delta H$  podem dar resultado ao mesmo valor de  $\Delta G$  e, portanto, causam a mesma afinidade de ligação. Uma alta afinidade pode ser alcançada de duas maneiras: a primeira é obtendo uma variação de entalpia mais favorável (negativa), melhorando a interação proteína-ligando com o solvente, ou a segunda, gerar uma variação entrópica mais favorável (positiva), que pode ser feita tornando o ligando mais hidrofóbico para maximizar a entropia de solvatação. [24]

### **3.4 - Fármacos cuja interação com a BSA foi caracterizada neste trabalho**

Os compostos utilizados, para o estudo de ligação com a albumina sérica bovina, foram diclofenac de sódio (DC), ácido salicílico (SL), clorpromazina (CP), verapamil (VP), Labetalol (LB) e acetaminofeno (AC). Diclofenac de sódio foi introduzido no Japão em 1974 numa formulação em comprimido de revestimento entérico de liberação lenta. É um anti-inflamatório não esteroide (NSAID do inglês *Non Steroidal Anti-Inflammatory*) que possui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas, e tem mostrado eficácia no tratamento de uma variedade de dores agudas e crônicas bem como condições inflamatórias [25]. Ácido salicílico também é um NSAID e o principal metabólito da aspirina (ácido acetilsalicílico) responsável pela ação anti-inflamatória e pode causar redução no risco de câncer colo retal. [26]

Clorpromazina foi sintetizada pela primeira vez em dezembro de 1951, e em 1952 surgiu no contexto psiquiátrico em Paris. Era mais eficiente do que qualquer uma das drogas anteriores, incluindo a combinação de morfina e escopolamina, para controlar emoção e agitação, e podia também aliviar sintomas psicóticos, como delírios e alucinações. [27]

Verapamil é um derivado da fenilalquilamina que antagoniza o influxo de cálcio pelos canais vasculares de músculo liso e membranas de células cardíacas, é também bem estabelecido no tratamento de angina, arritmias cardíacas e cardiomiopatias [28].

Labetalol é um agente bloqueador combinado de alpha- e beta-adrenoreceptor para uso oral ou intravenoso no tratamento de hipertensão, é um não seletivo antagonista competidor em beta-adrenoreceptores e um competidor antagonista de alpha-adrenoreceptores pós-sinápticos. [29]

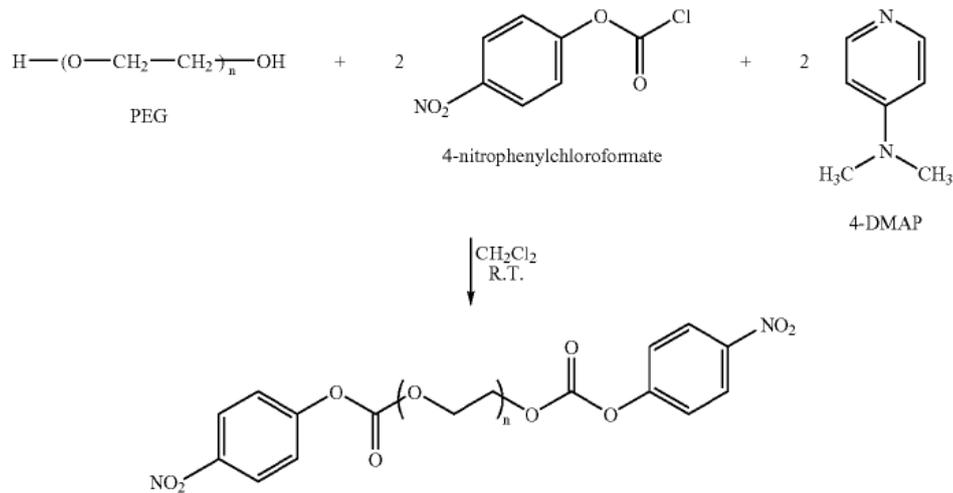
Acetaminofeno ou paracetamol possui um efeito analgésico que é mediado através da ativação de vias serotoninérgicas descendentes, é ainda o analgésico/antipirético mais popular no uso em crianças. Apesar da sua popularidade como fármaco, o mecanismo pelo qual o AC realiza seus efeitos em febres e dores ainda é debatido. [30]

Os fármacos foram selecionados justamente por terem diferentes características moleculares, como massa molecular, acidez, polaridade, possuírem valores de PPB em plasma e afinidades de interação com a BSA diferentes entre si. O que permitiu avaliar a extensão e aplicabilidade das técnicas utilizadas para moléculas com propriedades distintas para os ensaios *in vitro*.

## Capítulo 4 – MATERIAIS E MÉTODOS.

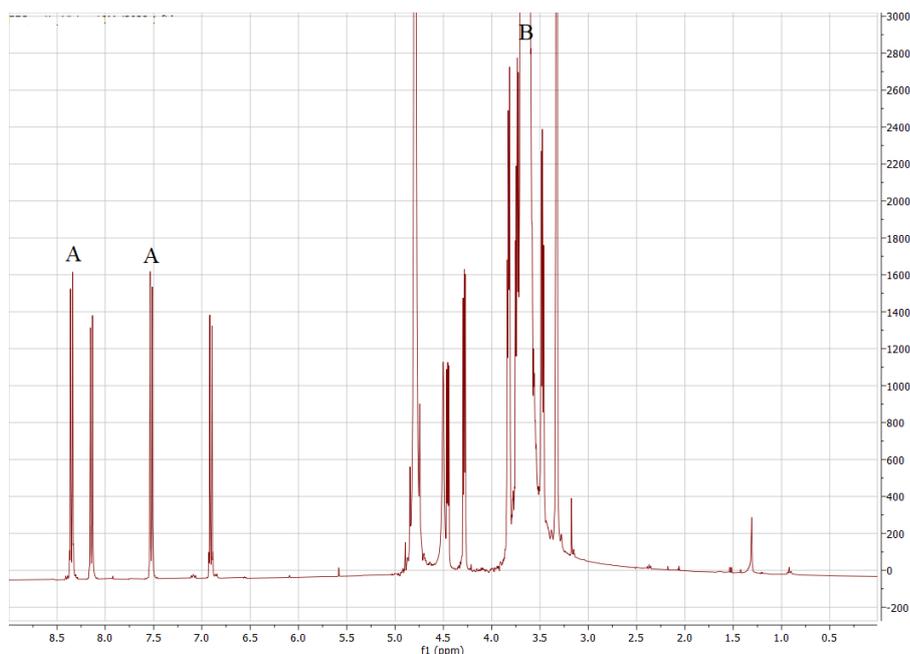
### 4.1 Ativação do PEG e ensaio BSA-PEG.

A ativação do PEG foi feita de acordo com a metodologia criada por Marrie-Pierre e Michel Ibea [31]. Preparou-se uma solução de 90 mM de polietilenoglicol 6000 (PEG) em diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e esta foi deixada de um dia para o outro em peneiras moleculares, de forma a remover a água na solução. Foram ainda preparadas mais duas soluções, uma de ativador, onde se pesou 390 mg de p-nitrofenil cloroformato e se dissolveu em 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e outra de 4-dimetilamino piridina (DMAP) onde se pesou 245 mg e se dissolveu em 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , o diclorometano usado para preparar estas soluções foi previamente seco por incubação durante 24 h com peneiras moleculares 3A. Em seguida, a 10 mL da solução de PEG adicionou-se então a solução de ativador (2 equivalentes molares em relação ao PEG), manteve-se sobre agitação durante 1 minuto, adicionou-se a solução de DMAP (2 equivalentes molares em relação ao PEG) e deixou-se a reação ocorrer durante 15 minutos. Ao fim deste tempo a solução reacional foi sujeita a precipitação por adição de éter etílico a 4 °C, resultando numa suspensão que foi mantida a -20 °C durante 30 minutos. A suspensão foi filtrada e lavada extensivamente com Éter Etílico a 4° C. Em seguida, ressuspendeu-se o precipitado em 40 mL de água e realizaram-se 3 extrações líquido-líquido utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , as 3 frações de Diclorometano foram adicionadas ao mesmo frasco e filtradas sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para remoção de água residual. O produto final foi precipitado sobre agitação por adição de Éter Etílico a 4 °C, por fim filtrou-se e lavou-se o precipitado com éter etílico e secou-se sobre vácuo. Foi obtido um pó branco amarelado que corresponde ao PEG ativado (PEGa).



**Figura 6** – Esquema reacional para ativação do polietilenoglicol. [31]

O espectro RMN do PEG possui sinais típicos de prótons metilenos a 3.65 ppm, correspondendo a 135 unidades, 542 prótons, por molécula de PEG com um peso molecular médio de 6000 Da. Após a reação de ativação, o espectro do PEGa surge com dois dubletos com desvios de 7.55 e 8.35 ppm, correspondendo aos 4 prótons dos grupos terminais em cada molécula de PEGa. Há ainda a presença de dois dubletos com desvios de 6.95 e 8.15 ppm correspondentes ao p-nitrofenol ainda presente na amostra de PEGa. O grau de ativação foi calculado através da razão entre as áreas obtidas em 7.55 + 8.35 ppm e 3.65 ppm, cada uma dividida pelo número respectivo de prótons:



**Figura 7** – Espectro 1D <sup>1</sup>H RMN do PEG ativado utilizado no presente trabalho, os picos A (7.55 e 8.35 ppm) correspondem aos prótons do grupo substituído no polímero e são utilizados no cálculo de ativação, enquanto que o sinal marcado com a letra B (3.65 ppm) é dos prótons alifáticos da cadeia.

$$\text{Grau de ativação} = \frac{\frac{A(7.55 + 8.35 \text{ ppm})}{4}}{\frac{A(3.65 \text{ ppm})}{542}}$$

O PEGa utilizado para os ensaios possui um grau de ativação igual a 0,45.

O hidrogel foi preparado seguindo a metodologia descrita por Fortier [23], uma solução de BSA em tampão fosfato (PBS do inglês *Phosphate Buffer Saline*) com pH 8,5 foi misturada com uma solução de PEGa em água, para uma concentração final de BSA e PEGa de 50 e 90 mg/mL respectivamente. Essas concentrações foram escolhidas com o objetivo de atingir a proporção molar de OH/NH<sub>2</sub> de grupos ativados no PEG versus grupos amino livres da BSA. Alíquotas de 100 µL foram pipetadas e colocadas em plataformas de plástico em forma de gota, gerando um disco após a reação completa de polimerização e secagem. Após o período de 24 horas, os hidrogéis foram lavados com água até ficarem incolores e depois equilibrados em PBS pH 7,4.

Os ensaios de ligação dos compostos à albumina presente nos hidrogéis foram conduzidos a uma temperatura de 37 °C e agitação de 140 rpm (rotações por minuto) em banho maria. Foram preparadas duas soluções de 10 mL com a mesma concentração de ligando e 2% dimetilsulfóxido (DMSO) e equilibradas a 37 °C. Foram adicionados os hidrogéis a uma das soluções, para caracterizar a ligação à BSA, e a outra solução serviu de controle. O momento da adição dos hidrogéis foi contabilizado como tempo inicial  $t_0$  e foi imediatamente recolhida uma alíquota de 200 µL ( $t_0$ ), antes da adição dos géis. As soluções foram deixadas em agitação e foram coletadas mais 4 alíquotas em tempos diferentes, 5 ( $t_5$ ), 20 ( $t_{20}$ ), 40 ( $t_{40}$ ) e 110 ( $t_{110}$ ) minutos, com o objetivo de quantificar a diminuição do analito na fase aquosa devido à interação com a BSA no hidrogel.

Acetaminofeno, verapamil e labetalol foram analisados em conjunto. À solução com os ligandos a uma concentração de 40 µM foram adicionados 6 discos de hidrogéis, cada disco contém 4,5 mg de BSA, correspondendo a uma concentração total de 40 µM de BSA. Esses ligandos foram analisados em conjunto devido à fraca interação que possuem com a proteína ( $K_d$  na ordem de  $10^{-4}$  M). Diclofenac, ácido salicílico e clorpromazina foram também analisados em simultâneo, à solução com os ligandos em 20 µM foram adicionados 4 discos de hidrogéis, a dar uma concentração total 27 µM de BSA. Esses ligandos foram analisados em simultâneo pela média/forte interação que possuem com a proteína (DC  $K_d$  na ordem de  $10^{-6}$  e SL, CP  $K_d$

na ordem de  $10^{-5}$ ). Tanto a solução de controlo quanto a solução de ligação foram colocadas em erlenmeyers de 25 mL, 37 °C e 140 rpm em banho maria, as frações de ligando livre foram quantificadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) com uma coluna de fase reversa Zorbax ODS C18, 250x4,6 mm, 5  $\mu$ m, acoplada a um detetor por fluorescência e absorção Agilent 1200 series G.

Os eluentes utilizados no HPLC foram metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN), água (H<sub>2</sub>O) e tampão formato de amônio 50 mM (HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>) pH 6,5. Programas distintos foram feitos para os dois ensaios, um para a separação do AC; LB; VP, descrito na tabela 1, e outro para separação do SL; DC; CP, descrito na tabela 2.

**Tabela 1** – Programa gradiente separação acetaminofeno, labetalol e verapamil, temperatura da coluna 30 °C.

Tempo (min)	% MeOH	% H <sub>2</sub> O	% HCO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>
0	20	0	80
7	80	0	20
20	95	0	5
22	20	0	80
25	20	0	80

**Tabela 2** – Programa gradiente separação ácido salicílico, diclofenac e clorpromazina, temperatura da coluna 50 °C.

Tempo (min)	% MeOH	% H <sub>2</sub> O	% HCO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>
0	20	0	80
7	80	0	20
9	95	0	5
25	95	0	5
27	20	0	80
29	20	0	80

## 4.2 Soluções para o ensaio no ITC.

As soluções para as titulações no ITC foram preparadas em um volume de 2,5 mL em PBS pH 7,4 2% DMSO, ambas as soluções, da célula e seringa, feitas com as mesmas pipetas

e volumes finais para minimizar uma eventual diferença na proporção de DMSO em ambas as soluções. As titulações ocorreram a temperatura de 37 °C, 199 rpm de agitação, 29 injeções de 10 µL e intervalo de 350 segundos entre cada injeção, ambas as soluções desarejadas por 5 minutos antes de iniciar o experimento. No ensaio do diclofenac a solução de BSA era preparada para 20 µM e ligando 400 µM numa proporção de 1:20 proteína-ligando, enquanto ácido salicílico numa proporção 1:12,5 com 40 µM de BSA e 500 µM de ligando. As proporções utilizadas foram pensadas levando em conta os sítios de ligação de cada molécula com a proteína, dois para o DC e um para o SL. Os ensaios foram realizados em um Malvern Microcal VP-ITC. A BSA utilizada nos ensaios foi previamente dialisada e quantificada por absorção no UV-Vis, com uma membrana Thermo Scientific de 10.000 MWCO, em PBS pH 7,4 a 4 °C sob agitação e duas corridas eram feitas de 750 mL cada, para fins de purificação, a solução tampão da segunda corrida era então filtrada (filtros com poros de 0,45 µm) e guardada para utilização nos ensaios.

As soluções foram quantificadas previamente por absorção no UV-Vis em um Spectronic Unicam UV 500. O coeficiente de absorvidade molar da BSA de  $43.824 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 279 nm [32], ácido salicílico  $3.475 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 298 nm [33], diclofenac  $11.263 \pm 388 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  determinado em triplicata a partir de 3 soluções padrão distintas.

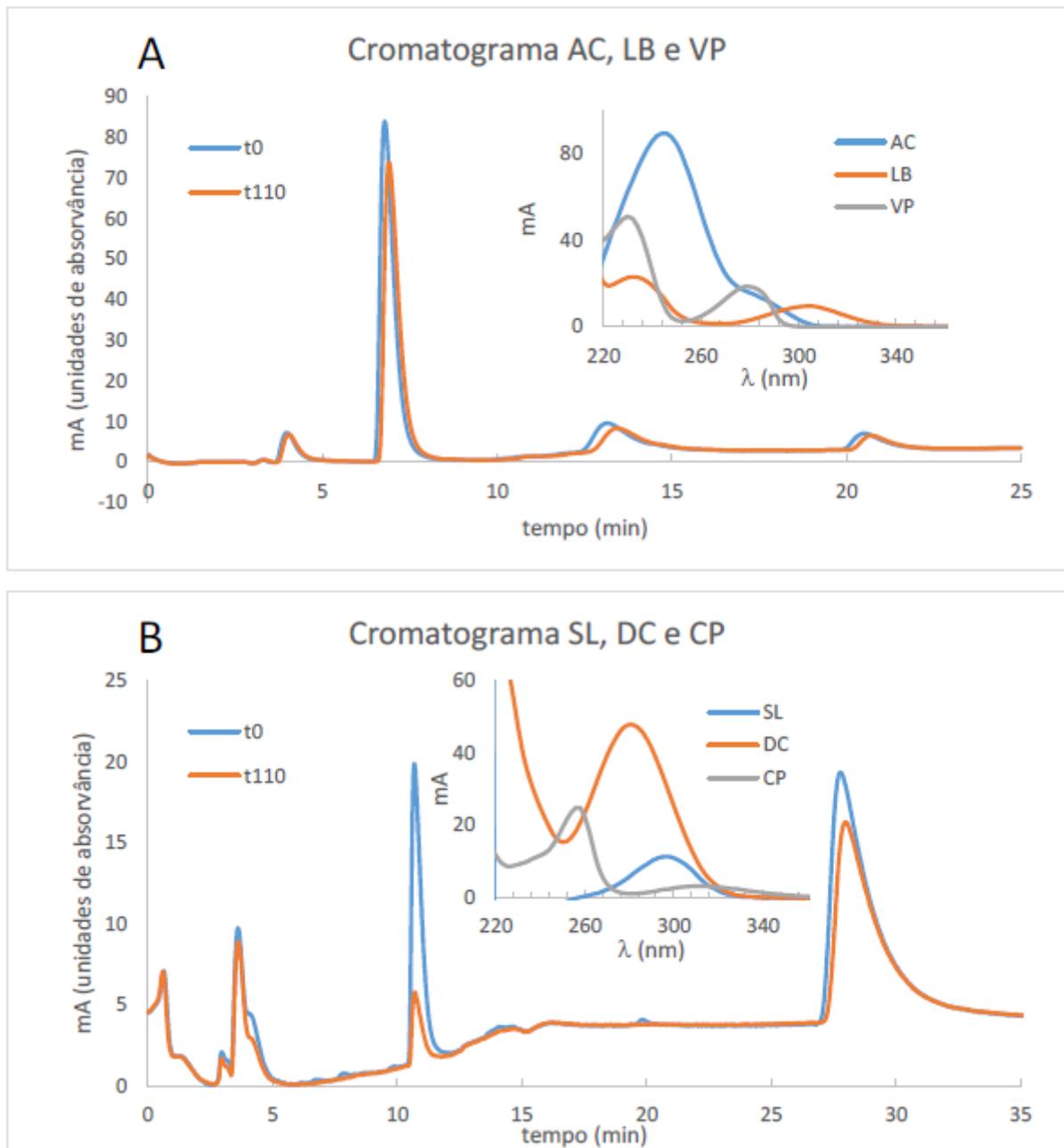
### 4.3 Materiais

Acetaminofeno, labetalol, verapamil hidrocloreto, diclofenac de sódio, clorpromazina hidrocloreto, ácido salicílico, éter etílico e dimetilsulfóxido deuterado foram adquiridos da Sigma Aldrich, todos grade analítica. D<sub>2</sub>O 99,90% foi adquirido da Eurisotop. Albumina sérica bovina ≥ 98% adquirida da Fisher Scientific. Polietilenoglicol 6000 foi adquirido da Merck, 4-nitrofenil cloroformato 97% foi adquirido da Acros Organics, 4-dimetilamino piridina 99% foi adquirida da Thermo Scientific. Diclorometano foi adquirido da Riedel-de Haën, metanol e acetonitrilo foram adquiridos da Honeywell ambos ≥ 99,9%. O tampão fosfato (PBS) utilizado em todos os ensaios era composto de NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM com pH ajustado em 7,4.

## Capítulo 5– RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Hidrogéis BSA-PEG

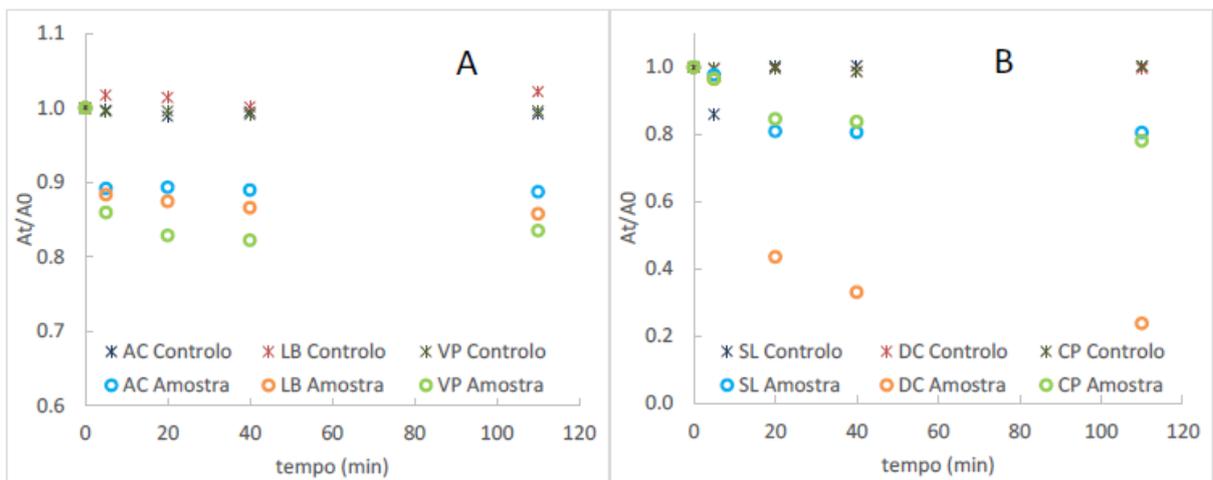
A primeira estratégia para estudar a interação dos compostos com a albumina sérica bovina foram os hidrogéis feitos com PEG ativado e BSA. Os resultados obtidos com os hidrogéis são encorajadores, com esse recurso foi possível quantificar, utilizando HPLC, a diminuição da concentração do ligando em solução nos erlenmeyers contendo BSA-PEG em relação aos erlenmeyers contendo as soluções de controlo, bem como estimar as constantes de associação dos compostos com a proteína. A separação e quantificação dos compostos foi realizada com sucesso em cada um dos experimentos, para as diferentes substâncias. Na figura 7 estão representados cromatogramas típicos obtidos para cada um dos conjuntos de ligandos. Os diferentes ligandos foram identificados com base no espectro de absorção, apresentado no *insert* de cada figura, e na injeção de cada ligando individualmente. Com exceção do SL, o método utilizado conduz a uma boa separação e interação eficiente dos ligandos com a coluna de HPLC, obtendo-se um tempo de retenção superior a 5 minutos e picos bem separados dos restantes componentes na solução. No caso do SL o tempo de retenção foi próximo do volume morto da coluna e observa-se um pico complexo quando detectado por absorção no UV (Figura 7B) devido a interferência com outros componentes da solução com eluição a tempos semelhantes. Este método de detecção não é assim adequado para a quantificação do SL. A quantificação do SL foi assim efectuada através da sua fluorescência a 406 nm quando excitado a 310 nm.



**Figura 7** – **A** Cromatograma referente ao método para separação e quantificação do acetaminofeno, labetalol e verapamil, composição do eluente indicada na tabela 1, antes ( $t_0$ ) e após incubação com 6 discos de BSA-PEG hidrogel durante 110 minutos a  $37^\circ\text{C}$  ( $t_{110}$ ). **B** Cromatograma referente ao método para separação e quantificação do ácido salicílico, diclofenac e clorpromazina, composição do eluente indicada na tabela 2, antes ( $t_0$ ) e após incubação com 4 discos de BSA-PEG hidrogel durante 110 minutos a  $37^\circ\text{C}$  ( $t_{110}$ ). A linha azul corresponde as amostras coletadas em  $t_0$  e laranja em  $t_{110}$ . Em A o pico entre 5 e 10 minutos corresponde ao acetaminofeno, entre 10 e 15 minutos ao labetalol e entre 20 e 25 minutos ao verapamil. Em B o primeiro pico, próximo dos 4 minutos, corresponde ao ácido salicílico, o segundo, próximo a 10 minutos, ao diclofenac e o último, próximo do minuto 30, à clorpromazina. Os espectros de absorção correspondente a cada pico estão apresentados nos *inserts*.

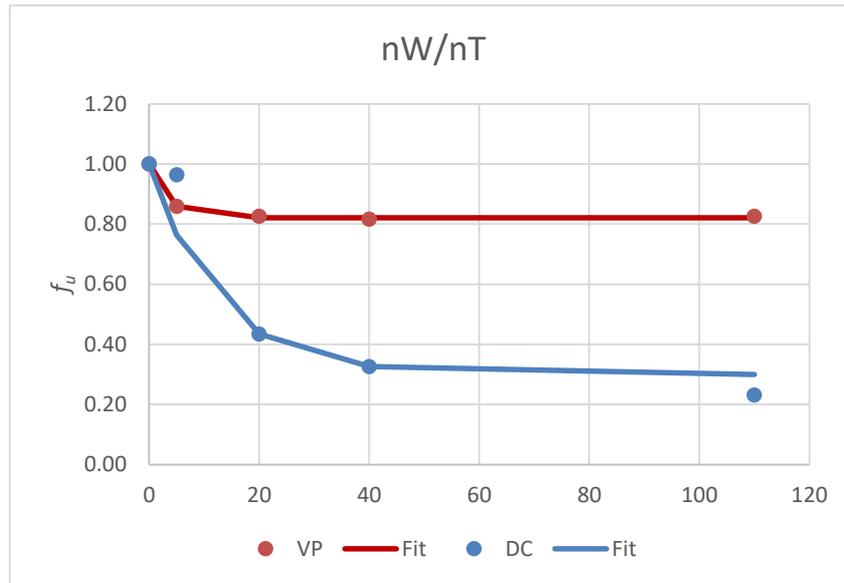
Observa-se uma diminuição significativa na área correspondente aos vários ligandos após incubação com os hidrogéis de BSA-PEG ( $t_{110}$  vs  $t_0$ ). Esta diminuição é mais pronunciada para o diclofenac, indicando uma interação mais efetiva com os hidrogéis, a variação da área

correspondente aos vários picos com o tempo de incubação com os hidrogéis está apresentada na Figura 8. Nota-se que as áreas correspondentes às soluções controlo se mantêm essencialmente inalteradas ao longo do tempo de incubação, indicando que a solução dos ligandos é estável e que o método de deteção é adequado. No caso das amostras incubadas com os géis de BSA-PEG é possível enxergar uma diminuição significativa logo ao fim de 5 minutos de incubação, mantendo-se estável ou diminuindo pouco mais ao longo do tempo de incubação. No gráfico B estão apresentados os resultados para o conjunto de ligandos onde se esperava uma ligação mais eficiente à BSA. Os resultados obtidos estão de acordo com a expectativa, com uma maior diminuição da fração de ligando livre em solução (notar a diferente escala do eixo dos y nos gráficos A e B). Para este conjunto de resultados observa-se uma variação mais lenta na fração de ligando livre, estabilizando apenas para tempos de incubação superiores a 20 minutos (SL e CP) ou mesmo 40 minutos (DC).



**Figura 8** – Variação da área dos picos correspondentes aos vários ligandos numa experiência típica com os ligandos AC, LB e VP (gráfico A), ou SL, DC e CP (gráfico B). As áreas correspondentes às soluções controlo (sem hidrogel) estão apresentadas com os símbolos \*, e as áreas correspondentes às soluções incubadas com os hidrogéis estão apresentadas com os símbolos •, ambos segundo o código de cores apresentado na figura. Notar a diferente escala no eixo dos y dos gráficos A e B.

A partir da área obtida foi calculada a concentração de ligando livre na fase aquosa, tomando como referência a área obtida para a amostra antes da incubação com o hidrogel ( $t_0$ ). A concentração total de ligando em solução a cada tempo foi calculada tendo em atenção a quantidade removida para análise no HPLC nos tempos anteriores e a variação no volume total da solução. Por fim, a concentração de ligando associado aos hidrogéis foi calculada por subtração da concentração de ligando livre à sua concentração total. A variação da fração de ligando associado aos hidrogéis de BSA-PEG ( $[PL]/[L]_T$ ) em função do tempo de incubação está apresentada na figura 9.



**Figura 9** –  $f_u$  no ensaio de ligação para diclofenac (pontos azuis) e verapamil (pontos vermelhos) em função do tempo. Os pontos são referentes aos dados experimentais enquanto que a linha é proveniente do ajuste. O mesmo tratamento foi feito para todos os fármacos estudados.

Os resultados experimentais estão representados por símbolos e as linhas correspondem ao melhor ajuste de uma função exponencial para cada um dos ligandos, equação (1).

$$f_u(t) = f_u(\infty) + (f_u(0) - f_u(\infty))e^{-kt} \quad (1)$$

Onde  $f_u(t)$  corresponde à fração de ligando livre em solução ao tempo  $t$ ,  $f_u(0)$  antes da adição dos hidrogéis,  $f_u(\infty)$  após atingido o equilíbrio, e  $k$  a constante de velocidade em que o equilíbrio é atingido, a fração ligada ao gel  $f_b(\infty)$  foi então calculada como  $1 - f_u(\infty)$ .

O equilíbrio proteína-ligando pode ser descrito em função das concentrações de ligando total ( $[L]_T$ ), ligando livre ( $[L]_W$ ), proteína total ( $[P]_T$ ), equações 2 e 3.



$$K_a = \frac{[PL]}{[P]_T[L]_W} \quad (3)$$

Em sistemas que a concentração de albumina é significativamente maior que a dos compostos o regime de saturação entre proteína ligando não é atingido. Logo o sistema pode ser descrito pela equação (4):

$$K_a = \frac{[PL]}{[P]_T[L]} = \frac{f_b(\infty)}{[P]_T \cdot f_u(\infty)} \quad (4)$$

Por outro lado, quando a concentração de proteína é ligeiramente maior, e os compostos ligam-se ao mesmo sítio de ligação na proteína, como é o caso envolvendo os ensaios feitos neste trabalho, a seguinte relação precisa ser utilizada para obter a constante de ligação:



$$K_a^i = \frac{[PL^i]}{[L_W^i][P_w]} = \frac{f_b^i(\infty)}{[P_w] \cdot f_u^i(\infty)} \quad (6)$$

A fração de ligando livre em solução aquosa (obtida a partir da experiência de ligação) depende da constante de associação e da concentração de proteína livre, equação 7:

$$f_u^i(\infty) = \frac{1}{1 + K_a^i \cdot [P_w]} \quad (7)$$

As concentrações de ligando livre e ligado são calculadas conforme indicado anteriormente, e a concentração de proteína é obtida da seguinte equação:

$$[P]_T = [P]_W + \sum [PL_1^i] = [P]_W \left( 1 + \sum K_a^i [L_W^i] \right) \quad (8)$$

No caso da presença de apenas uma espécie de ligando, as equações (6) e (8) podem ser resolvidas analiticamente conduzindo à uma equação quadrática em que a solução com significado físico é a  $x$ - [34], equação (9).

$$[PL] = \frac{(K_d + [L]_T + [P]_T) \pm \sqrt{(K_d + [L]_T + [P]_T)^2 - 4[L]_T[P]_T}}{2} \quad (9)$$

Onde  $K_d$  representa a constante de dissociação do complexo proteína-ligando ( $K_d = 1/K_a$ ).

Quando há presença de diversos ligandos em solução, não existe solução analítica para o conjunto de equações (6) e (8), e o valor das constantes de ligação têm de ser obtido através do ajuste global para os resultados de todos os ligandos e calculado por métodos numéricos.

Nas equações acima foi feita a aproximação de que a proteína possui apenas um local de ligação. A BSA possui vários locais de ligação onde as moléculas se ligam com afinidade semelhante. Neste caso, se a concentração de ligandos for inferior à de proteína apenas uma molécula de ligando está ligada a cada molécula de proteína, mas este pode encontrar-se em diversos locais de ligação. As equações (6) e (8) continuam válidas, mas a constante de afinidade corresponde, neste contexto, à constante global para a ligação da primeira molécula de ligando,  $K_1^i$ . Esta constante global de associação relaciona-se com as constantes microscópicas de ligação do ligando  $i$  a cada um dos sítios de ligação na proteína,  $K_a^i(j)$ , através da equação (10).

$$K_1^i = \sum_{j=1}^m K_a^i(j) \quad (10)$$

Os resultados experimentais coletados para a fração de ligando livre após estabelecido o equilíbrio com os hidrogéis de BSA-PEG foram analisados através do ajuste global para cada conjunto de ligandos testados em simultâneo (AC+LB+VP, e SL+DC+CP) utilizando a função Solver do Excel para encontrar as constantes globais de associação de cada ligando, através da solução numérica das equações (6) e (8), e minimização dos desvios entre a fração de ligando livre calculada pela equação (7) e os valores experimentais obtidos. Devido à amostragem ao longo da incubação com o hidrogel, o volume total da solução diminuiu ligeiramente, de 10 mL a  $t_0$  para 9,2 mL após amostragem aos 40 minutos. Portanto, a concentração de proteína em solução aumentou ligeiramente, de 40,6 para 43,2  $\mu\text{M}$  no caso de 6 discos de hidrogel e de 27 para 28,8  $\mu\text{M}$  para 4 discos de hidrogel. Na análise dos resultados foram considerados ambos os valores limites para a concentração de BSA, correspondendo à maior incerteza associada aos parâmetros obtidos para uma dada experiência. Foram realizadas duas experiências independentes (novos discos de hidrogel, incubações e análises por HPLC). O valor médio foi calculado para o logaritmo da constante de associação pois esta é a variável aleatória que apresenta uma distribuição Normal [35], e está apresentado na Tabela 3 juntamente com o

desvio padrão correspondente. O valor característico da constante de associação foi calculado a partir do valor médio de  $\log(K_1)$ . Na tabela estão também apresentados os valores encontrados na literatura para a constante de associação, preferencialmente quando obtido por diálise em equilíbrio que é a metodologia *standard* para a obtenção desses parâmetros.

As constantes estimadas para os seis compostos, utilizando os hidrogéis BSA-PEG, são próximas das já estabelecidas na literatura para interação entre os fármacos com a albumina em técnicas distintas. Ainda que algumas condições experimentais sejam diferentes como pH e temperatura. Por isso o sistema possui potencial para ser utilizado como um modelo *in vitro* para estimar a fração ligada de compostos a proteína em um programa de desenvolvimento de fármacos por exemplo.

**Tabela 3** – Constantes de globais de associação ( $K_1/M^{-1}$ ) ao hidrogel de BSA-PEG obtidas para o melhor ajuste a equação (1). Os valores da constante de associação obtidos por diálise ao equilíbrio estão também indicados, juntamente com a referência de onde foram obtidos, as condições experimentais do ensaio e o método utilizado. A fração ligada  $f_b$  foi calculada a partir de  $K_1$  assumindo a concentração de albumina no plasma de 600  $\mu M$ , ou seja, excesso de proteína em solução equação (4).

Composto	$f_b$	$K_1 (M^{-1})^a$	$\log (K_1/M^{-1})$	$T (^\circ C)$	pH	$\log (K_a/M^{-1})$	$T (^\circ C)$	pH
DC	0,99	$4,02 \times 10^5$	$5,6 \pm 0,08$			$5,75^b$	37,0	7,4
SL	0,96	$4,76 \times 10^4$	$4,68 \pm 0,13$			$4,68^b$	37,0	7,4
CP	0,96	$3,94 \times 10^4$	$4,60 \pm 0,08$	37	7,4	$4,25^c$	25,0	7,4
AC	0,76	$5,43 \times 10^3$	$3,73 \pm 0,05$			$3,41^d$	37,0	7,0
LB	0,83	$8,15 \times 10^3$	$3,91 \pm 0,14$			$2,72^e$	36,5	7,4
VP	0,84	$8,82 \times 10^3$	$3,95 \pm 0,03$			$3,04^f$	25,0	7,4

<sup>a</sup> Parâmetros obtidos neste trabalho.

<sup>b</sup> Obtido por diálise em equilíbrio [36]

<sup>c</sup> Obtido por diálise em equilíbrio [37].

<sup>d</sup> Obtido por microdiálise [38].

<sup>e</sup> Obtido por eletroforese capilar [39].

<sup>f</sup> Obtido por eletroforese capilar assistida por pressão [40].

Acetaminofeno e labetalol possuem um PPB baixo, 15 a 21% e 50% respectivamente, portanto suas constantes de associação serem também baixas, na ordem de  $10^3 M^{-1}$ , não é surpresa pois indica uma fraca interação com a albumina algo que é esperado para fármacos que não possuem um PPB alto. O Diclofenac é o caso contrário, com um PPB de 99,9% sua constante de associação com a proteína é média/alta na ordem de  $10^5 M^{-1}$ . Para a clorpromazina e ácido salicílico, seus PPB são 98,7% e 94,8% respectivamente, com constantes de associação médias na ordem de  $10^4 M^{-1}$ . E no caso do verapamil, seu PPB é de 90%, porém sua constante de associação é fraca também na ordem de  $10^3 M^{-1}$ . [41]

As constantes calculadas são globais, ou seja, não são as constantes de interação macroscópicas nem microscópicas. Uma aproximação válida, visto que o objetivo com esse método é estimar a constante de associação global entre fármacos e albumina sérica como um modelo *in vitro* para estimar a fração ligada no plasma. Algo plausível, pois, a concentração de fármaco no plasma é inferior a concentração de HSA e por isso dificilmente a proteína irá encontrar-se num regime de saturação, ou seja, a constante de associação global é o suficiente para modelar o sistema de uma maneira aproximada. Além disso, o sistema de hidrogéis permite a análise de diferentes compostos no mesmo ensaio, uma boa difusão de moléculas pequenas para dentro do hidrogel devido ao significativo volume aquoso dentro do mesmo e um rápido estabelecimento do equilíbrio químico, quando comparado com outras técnicas como diálise em equilíbrio que demora cerca de 3,5 horas por exemplo, há de se ressaltar também a ausência de membrana para separar as frações livre e ligada na qual pode ocorrer a adsorção das moléculas à membrana. É mais barato que técnicas como ultrafiltração e ultracentrifugação, e não é necessário nenhum equipamento caro para além do usual em um laboratório de bioquímica. [41]

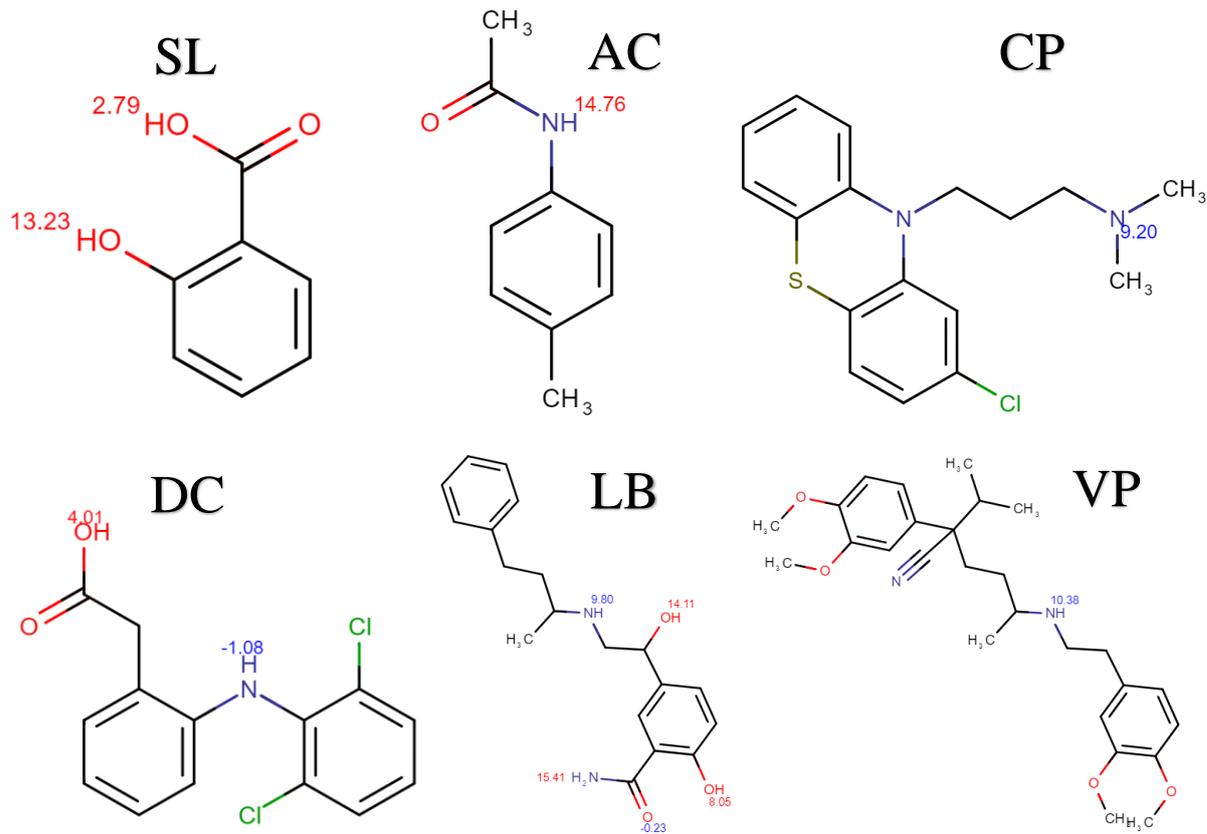
Fazer uma correlação direta entre as constantes de associação, obtidas por métodos *in vitro*, dos ligandos com a albumina bovina sérica e suas frações ligadas no plasma sanguíneo é um pouco arriscado. Isso pode funcionar bem para compostos que interajam de maneira média/forte com a proteína, entretanto moléculas que possuam uma interação fraca com a BSA podem ter uma fração ligada no plasma considerável como é o caso do verapamil, a indicar que no plasma ele provavelmente se liga a outras proteínas como AAG por exemplo.

**Tabela 4** – Influência dos descritores moleculares na interação proteína-ligando, dados obtidos no programa *Calculators & Predictors* da Chemaxon.

Composto	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	CpKa	Carga a pH 7,4	ClogD	ClogP
DC	$4,02 \times 10^5$	4,2	-1	1,1	4,0
SL	$4,76 \times 10^4$	3,0	-1	-1,5	1,9
CP	$3,94 \times 10^4$	9,2	+1	2,7	4,6
AC	$5,43 \times 10^3$	14,8	0	1,7	1,8
LB	$8,15 \times 10^3$	8,0 ; 9,8	+1	1,3	1,2
VP	$8,82 \times 10^3$	10,4	+1	2,3	4,6

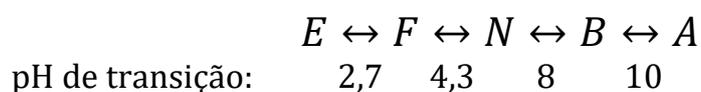
Quando olhamos para algumas propriedades moleculares de cada fármaco e sua afinidade de interação com a albumina, é possível traçar alguns paralelos. A BSA possui maior

afinidade de interação com moléculas carregadas negativamente, como é o caso do diclofenac e ácido salicílico cujos grupos ácidos se encontram ionizados a pH 7,4. Já a clorpromazina, labetalol e verapamil são carregados positivamente a pH 7,4, devido aos grupos aminas, enquanto que o acetaminofeno é uma molécula neutra nas condições experimentais. Ao analisar os ClogD's e ClogP's de cada ligando, é evidente que um ClogD e ClogP mais elevado, logo maior caráter hidrofóbico da forma neutra, conduz de um modo geral a uma maior afinidade entre a molécula e a proteína como é o caso tanto do diclofenac. Não se observa, no entanto, uma dependência simples entre  $K_1$  e o ClogD do ligando, onde por exemplo a CP é o ligando que apresenta um maior valor de ClogD mas é o terceiro ligando com maior afinidade para a BSA. Esta ausência de correlação deve-se a contribuição de outros fatores, por exemplo a carga global do ligando discutida acima. Quanto a clorpromazina, essa propriedade contribui para um efeito hidrofóbico mais efetivo na interação proteína-ligando aumentando assim a afinidade entre as espécies. Por fim é evidente uma dependência das cargas presentes em grupos ácidos e básicos nas moléculas nas condições experimentais bem como sua hidrofobicidade, a presença de cargas negativas e maior caráter hidrofóbico é o que ajudam a explicar a maior afinidade das moléculas na interação com a albumina, como foi referenciado no Capítulo 2.



**Figura 10** – Valores de pKa calculados, para cada uma das moléculas, utilizando o programa *Calculators & Predictors*, os grupos ácidos estão destacados em vermelho enquanto os básicos em azul com os respectivos valores de pKa.

Vale ressaltar que a molécula de albumina passa por diversas mudanças conformacionais conhecidas, geralmente sob condições não fisiológicas. Essas incluem isomerizações com mudanças moderadas de pH, mudanças mais extensivas em pH extremos ou com quebra de ligações dissulfeto. Quatro isômeros da forma normal **N** são reconhecidos, sendo eles: **F** (do inglês *Fast*) a pH 4, **E** (do inglês *Extended*) abaixo do pH 3, **B**, ou básica, a pH próximo de 8 e **A** (do inglês *Aged*) a pH próximo de 10. As mudanças estruturais foram previstas através de evidências físico-químicas e apenas provisoriamente identificadas em relação a configuração terciária da albumina. As isomerizações são de interesse mais pelo que podem dizer sobre a dinâmica da estrutura proteica do que pelo significado fisiológico, todas são reversíveis e esquematizadas abaixo. [15]



Na formação do hidrogel a BSA é ajustada em pH 8,5 em PBS, faixa em que ocorre a transição **N**→**B** a qual ocorre entre pH 8 e 9. A isomerização, chamada de transição básica, tem sua base no  $pK$  incomum de grupos ionizáveis imidazóis. Desde 1963 as propriedades do isômero **B** têm interessado muitos químicos que estudam albumina, a impressão é de uma flutuação estrutural, um relaxamento da molécula com perda de rigidez, a afetar particularmente a região amino-terminal. Em relação a interação da proteína com ligandos, os efeitos da transição básica ocorrem no domínio II, com contribuição do domínio I, e poucas mudanças no domínio III. Levando a uma maior afinidade de fármacos que interagem no Sítio I, enquanto no Sítio II não se nota diferença. O fato da reação de polimerização da BSA com PEGa acontecer em pH onde a transição básica ocorre pode influenciar na alteração da ligação dos compostos a proteína, uma vez que a proteína seria imobilizada na conformação **B**, porém a isomerização é reversível e quando equilibrada em PBS pH 7,4 deve ser capaz de voltar a forma **N**. [15]

As constantes medidas com os hidrogéis mostraram uma boa concordância com a literatura, o que indica que o isômero **N** é a conformação mais provável nas condições experimentais em que o ensaio foi realizado. Isso somado a elevada absorção de água dos hidrogéis leva a crer que a liberdade conformacional da proteína no hidrogel é bem considerável e abre portas para diferentes experimentos em condições não fisiológicas dos hidrogéis, bem como ajuda a entender as propriedades estruturais da proteína no hidrogel.

## Titulação Isotérmica Calorimétrica

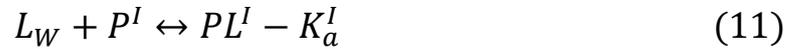
Nas titulações feitas no ITC somente foram realizadas com êxito para dois compostos, ácido salicílico e diclofenac. Das constantes obtidas nos hidrogéis e presentes na literatura, era de esperar que DC, SL e CP dessem bons termogramas e curvas nos ensaios de ITC, uma vez que a constante de associação do DC é na ordem do  $\mu\text{M}^{-1}$ , enquanto que a do SL e CP  $10^4\text{M}^{-1}$ . Assim é possível trabalhar com boas proporções proteína-ligando e concentrações levando em conta o limite de solubilidade dos compostos, já que o calor medido das interações é proporcional às quantidades de proteína na célula reacional e ligando adicionado a cada ponto da titulação. Diclofenac e ácido salicílico tiveram suas titulações realizadas com êxito, extraindo valiosas informações termodinâmicas sobre as interações dos ligandos com a proteína.

Com a clorpromazina as curvas de titulação acabaram por gerar calores endotérmicos e calores de diluição que indicavam algo anormal ocorrendo com o composto conforme as injeções iam ocorrendo. Verapamil e labetalol possuem constantes de associação baixas como vimos nos hidrogéis, logo para se obter uma boa curva no ITC é necessário subir consideravelmente a concentração da proteína e dos ligandos em solução, a fim de obter calores de interação acima do limite de sensibilidade do equipamento. Mas o limite de solubilidade dos ligandos não permite aumentar as concentrações de ligando na seringa acima de  $350 \mu\text{M}$ , condicionando a utilização desta metodologia para obter as informações termodinâmicas da interação com a BSA. Já para o acetaminofeno mesmo subindo sua concentração a  $1 \text{ mM}$ , ainda assim não foi capaz de gerar bons calores a cada injeção, acabou por não gerar uma curva boa o suficiente para tirar dali informações válidas.

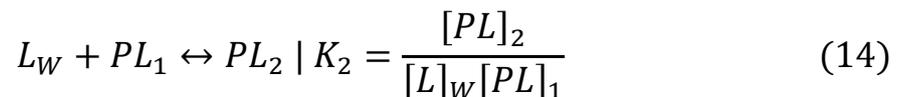
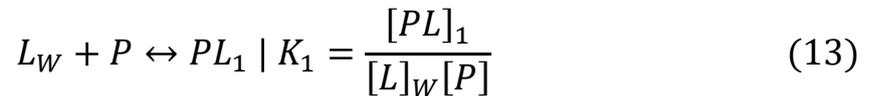
A ligação de compostos é frequentemente seguida por variações nas propriedades da proteína que são proporcionais ao avanço do processo de ligação, ou propriedades que refletem a própria ligação em si como o calor envolvido na interação ou mudanças na ionização do ligando ou da proteína. Para utilizar a equação de segundo grau (9), para análise quantitativa de dados experimentais, é necessário primeiro identificar qual das duas possíveis soluções matemáticas têm significado físico. No caso da associação entre duas substâncias, pode ser deduzida facilmente que a solução com significado físico é sempre a subtração no resultado da raiz, pois a soma é maior que  $[P]_T$  e/ou  $[L]_T$ . Quando a saturação da proteína é acompanhada experimentalmente, a concentração do ligando é a variável independente, e a afinidade da ligação ( $K_a$  ou  $K_d$ ) pode ser calculada pelo melhor ajuste da solução correta da equação

quadrática para os resultados experimentais. A solução da equação é válida em todas as condições, baixa ou alta afinidade de ligação, concentrações similares ou diferentes de proteína e ligando. [34]

Se a saturação da proteína for alcançada e acompanhada quantitativamente, a constante de ligação macroscópica pode ser obtida e da sua dependência na saturação da proteína podem ser retiradas algumas conclusões sobre o número de locais de ligação, suas similaridades e independência. Como no caso do diclofenac por exemplo, o qual se liga em dois sítios de ligação na albumina [42]. No caso de dois locais de ligação, iguais ou diferentes, há dois possíveis sítios de ligação distintos no sistema, então a ligação pode ser descrita:



Onde  $P^I$  e  $PL^I$  correspondem respectivamente aos sítios de ligação  $i$  livres e ocupados, e  $K_a^i$  é a respetiva constante de associação microscópica, com  $i$  representando os locais de ligação I e II. A ligação do composto com cada local de ligação não pode ser caracterizada de maneira independente, em vez disso uma equação geral considerando a ligação com todos os locais de ligação tem de ser definida e resolvida. Se os sítios de ligação forem equivalentes e independentes, a solução simples é considerar a concentração total de sítios de ligação na equação 2,  $[PL] = [PL^I] + [PL^{II}]$ , e usar a resolução da equação quadrática indicada anteriormente. Como a concentração de proteína é conhecida e possui dois locais de ligação distintos, a saturação da proteína com o diclofenac é melhor descrita pelas constantes macroscópicas  $K_1$  e  $K_2$ : [34]



É importante notar que  $PL_i$  representa um subconjunto do complexo proteína-ligando com  $i$  ligandos por proteína, não contém informação em relação aos sítios de ligação em que os

ligandos estão. Por exemplo,  $PL_1$  representa a quantidade de moléculas de proteína com apenas uma molécula de composto ligada, que pode estar no sítio 1 ou 2. A fração ligada relativa a cada local de ligação depende das constantes de associação microscópicas  $K_a^i$ , o mesmo vale para  $PL_2$ . [34]

Nas experiências de ligação aos hidrogéis de BSA-PEG, a concentração de proteína foi sempre superior à de ligando associado a proteína, já que a BSA se ligou apenas a uma molécula de ligando. Ou seja, apenas a constante de associação  $K_1$  foi caracterizada. No entanto, nas experiências de ITC a concentração de ligando atingiu valores superiores à concentração de BSA, permitindo também a caracterização da associação de uma segunda molécula de ligando ( $K_2$ ). Para além de se atingir uma maior saturação de proteína com o ligando, o ITC permite também distinguir entre a ligação do ligando aos diferentes locais de ligação, conduzindo assim às constantes de associação macroscópicas. Esta distinção é possível quando os parâmetros termodinâmicos para a interação do ligando nos dois locais de ligação são diferentes.

Os cálculos feitos para obtenção das constantes de associação e parâmetros termodinâmicos, foram feitos com base nas relações descritas anteriormente. Para ambos os compostos foi avaliada a qualidade do ajuste considerando vários modelos, apenas um local de ligação ou considerando dois locais independentes. O melhor modelo foi selecionado com base na qualidade do ajuste obtido. Ajuste feito no Excel com uso da função Solver. Como o sistema do ITC é termicamente isolado e mantido em temperatura constante, o  $\Delta G$  e  $T\Delta S$  foram calculados com as seguintes relações:

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

A energia livre de Gibbs é o principal potencial termodinâmico em um processo ocorrendo a temperatura e pressão constante, e surge naturalmente quando a segunda lei da termodinâmica é aplicada a um sistema fechado em equilíbrio térmico e mecânico com seu ambiente, ou seja, temperatura e pressão constantes, exatamente o caso nos ensaios feitos no ITC. Para que um processo ocorra espontaneamente a diferença na energia livre de Gibbs entre os estados inicial e final têm de ser negativa. Em particular, para processos de ligação a mudança na energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) é a diferença do potencial químico entre o complexo e as espécies livres onde  $\mu$  é o potencial químico de uma dada substância [43]:

$$\Delta G = \mu(PL) - \mu(P_W) - \mu(L_W)$$

Como todo processo de ligação é espontâneo o  $\Delta G$  é sempre negativo, a exemplo das titulações da BSA com SL e DC, quanto mais negativo maior a afinidade. O  $\Delta G$  pode ser calculado a partir da  $K_{eq}$  e por isso obtido usando qualquer metodologia experimental, a grande vantagem do ITC é obter o  $\Delta H$  e com isso determinar o  $\Delta S$ . Há maior interesse no foco e discussão da termodinâmica de ligação em termos de contribuições entrópica e entálpica, que podem mostrar diferenças positivas ou negativas e exibem maior suscetibilidade a mudanças em fatores intrínsecos e extrínsecos do que a energia livre de Gibbs, provendo outra camada de informação do processo de ligação.

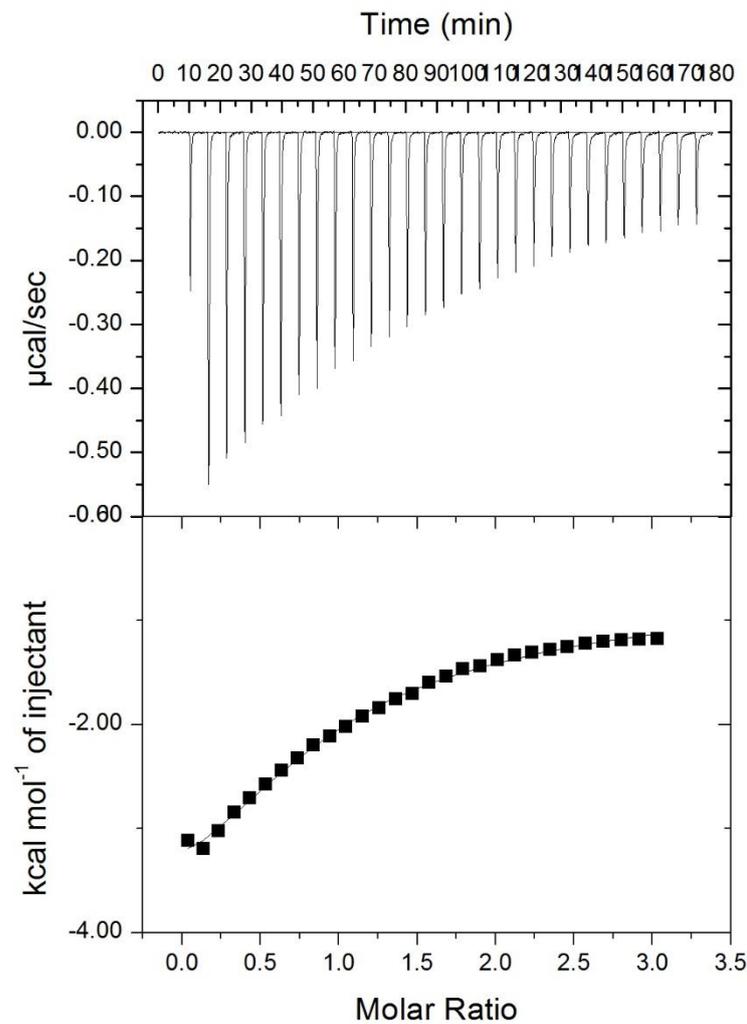
Em uma interação proteína-ligando o  $\Delta H$  reflete a formação ou rompimento de várias interações não covalentes, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e interações iônicas, entre a albumina e o ligando, e entre estes e o solvente, com as últimas a terem um papel chave permitindo avaliar sobre a especificidade das interações estabelecidas. A entalpia medida é a contribuição de todos os processos que acontecem simultaneamente nas interações, incluindo as interações proteína-ligando, a quebra das interações com o solvente durante a dessolvatação e alterações conformacionais. É comum agrupar a entalpia intrínseca e a de dessolvatação, até mesmo a de alterações conformacionais, em uma entalpia efetiva de ligação, aproximação essa realizada nos nossos modelos de análise para todas as titulações feitas no ITC. É importante ter a ideia de que todos os processos possíveis contribuem para os dados experimentais obtidos, porém separar todas essas contribuições é demasiado complicado experimentalmente, e pouco vantajoso uma vez que esses processos também ocorrem em sistemas *in vivo*. [43]

A entropia é uma medida da distribuição de energia em diferentes graus de liberdade em um dado sistema, é também considerada como uma medida de desordem de um sistema, a mudança de entropia em uma interação proteína-ligando ( $T\Delta S$ ) ocorre em maior parte pela liberação de moléculas de água que ocorre quando o composto interage com a albumina. Assim como no caso do  $\Delta H$ , o  $T\Delta S$  pode ser dividido em diversas contribuições de processos adjacentes à ligação, incluindo dessolvatação, mudanças conformacionais e entropia rototranslacional. É também comum agrupar todas essas vertentes em uma entropia efetiva de ligação, aproximação usada em nossos modelos. [43]

A entalpia e a entropia de ligação refletem interações intermoleculares e fenômenos de naturezas diferentes. A entalpia é associada a especificidade enquanto que a entropia reflete o estabelecimento de interações não específicas. Portanto, o perfil termodinâmico de uma interação proteína-ligando revela a maneira de interação do ligando e a natureza do fenômeno principal comandando a interação: i) uma ligação entalpicamente favorecida (pouco ou desfavorecida entropicamente) indica que o composto estabelece interações mais fortes com a proteína em comparação com as interações estabelecidas com o solvente, e que a entropia de dessolvatação dificilmente compensa a entropia de perda conformacional, ii) já uma ligação entropicamente favorecida (pouco ou desfavorecida entalpicamente) indica interações fracas do composto com a proteína que não são compensadas pelo rompimento de interações com o solvente, e a entropia de dessolvatação compensa grandemente a entropia de perda conformacional. [43]

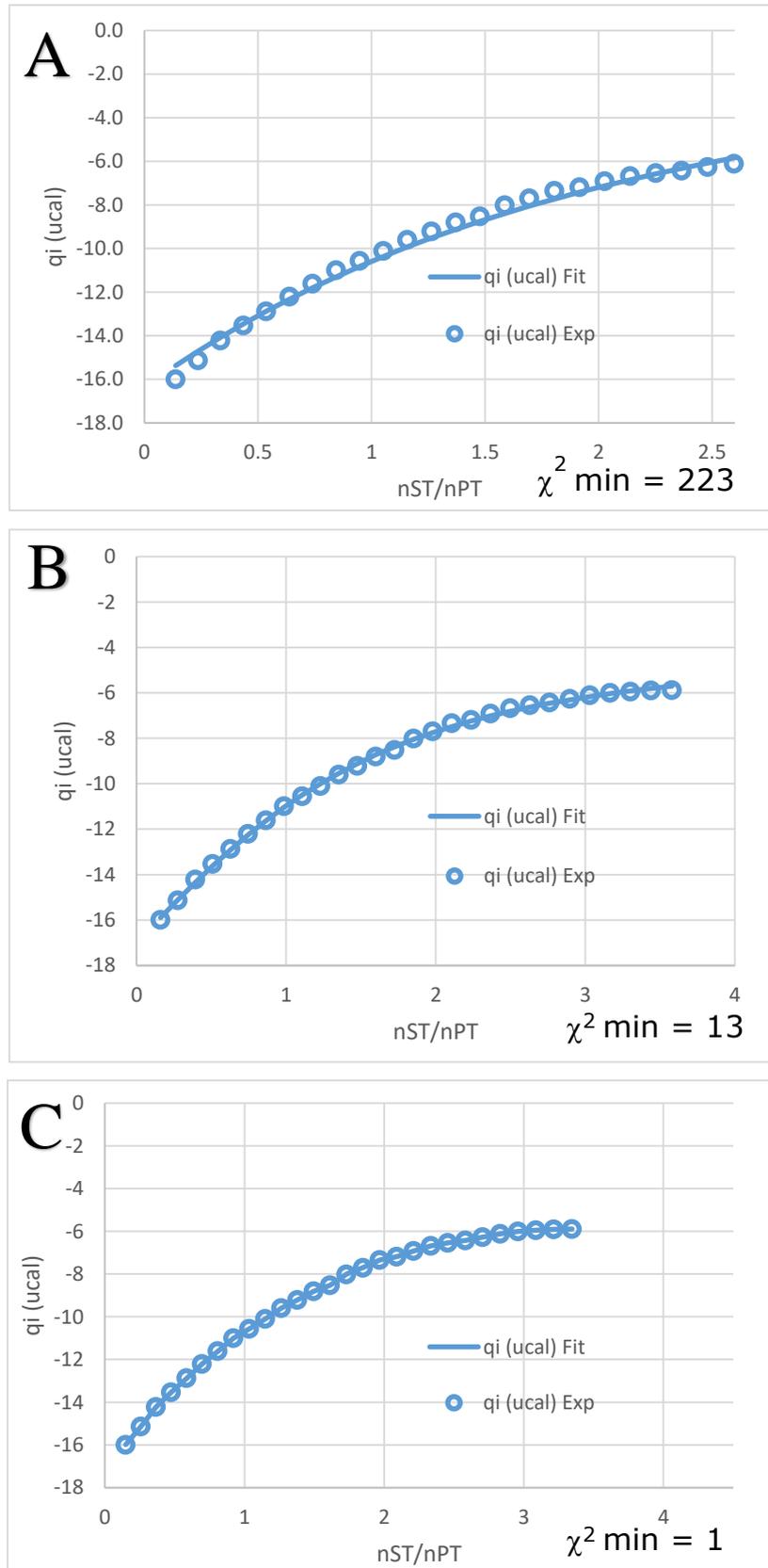
Neste trabalho foi possível obter a constante de associação ( $K_a$ ), entalpia ( $\Delta H$ ), entropia ( $T\Delta S$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) associadas ao processo de interação do diclofenac e do ácido salicílico com a BSA. Assumindo o modelo descrito, equações (5) a (14), a análise dos dados foi efectuada no programa Excel utilizando a função Solver. , diferentes ajustes foram feitos para análise da interação dos compostos com a albumina, de maneira que o melhor ajuste foi para dois locais de ligação independentes, o que fica evidenciado quando olhamos o  $\chi^2$  min referente a cada ajuste, para cada composto, nas figuras 12 e 15.

A partir do termograma, figura 11, é possível perceber a curva de titulação da BSA com SL ao longo das 29 injeções, a proporção usada de 1:12,5 proteína-ligando permite uma saturação da proteína ao final da curva. O calor associado a interação é o suficiente para estimar bem os valores das variáveis termodinâmicas do processo. O perfil da curva também mostra que a interação não é forte pois não há uma transição abrupta entre o início e o final da titulação.



**Figura 11** – Termograma da curva de titulação da albumina sérica bovina com ácido salicílico, com concentrações respectivas de 40  $\mu\text{M}$  de proteína na célula e 495  $\mu\text{M}$  de ligando na seringa. Ensaio feito a 37  $^{\circ}\text{C}$  em PBS pH 7,4 2% DMSO.

É evidente que o ajuste para um local de ligação não é um bom ajuste para o SL, figura 12. Enquanto que o ajuste para um local de ligação com a concentração de proteína [P] variando há uma bom *fit* do ajuste com o experimental, porém a incerteza associada a [P] é grande o que não é plausível uma vez que a proteína sempre foi quantificada ao longo das etapas de preparo das soluções de albumina. Por fim, o ajuste mais adequado foi para dois locais de ligação independentes, onde teve-se o menor valor de  $\chi^2$  min com as condições experimentais utilizadas durante os ensaios.

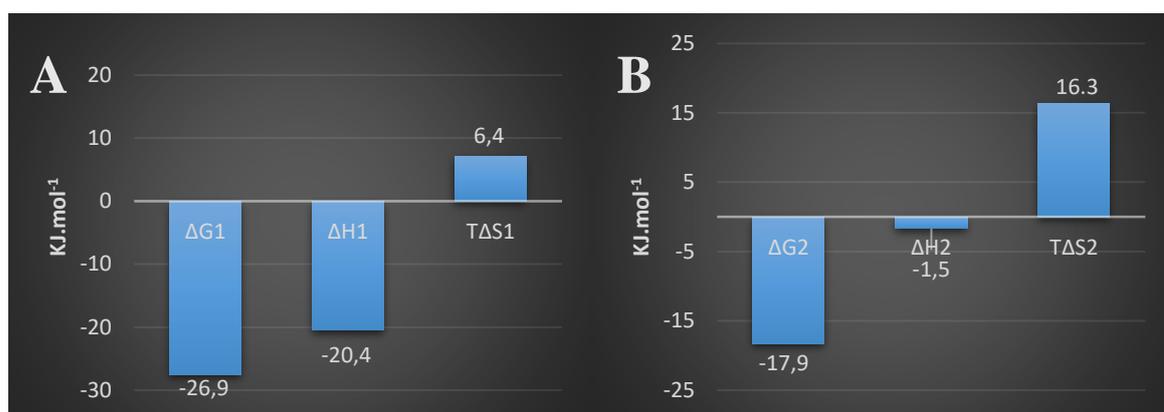


**Figura 12** – Ajustes feitos para a titulação da BSA com ácido salicílico com os respectivos valores de  $\chi^2$ , um menor valor de  $\chi^2$  corresponde a uma menor incerteza nos parâmetros obtidos. **A** para um local de ligação. **B** um local de ligação com concentração de BSA variável. **C** dois locais de ligação independentes.

Os dados obtidos para os parâmetros da interação BSA-SL utilizando o ajuste para dois locais de ligação independentes, figura 12A estão apresentados na tabela 5:

**Tabela 5** – Parâmetros termodinâmicos obtidos da titulação da BSA com SL (3 experiências independentes), com ajuste feito no Excel utilizando a função solver, para dois locais de ligação independentes. Log  $K_a$  da segunda coluna são provenientes da literatura por diálise em equilíbrio.

	Log $K_a$ ( $M^{-1}$ )	Log $K_a$ ( $M^{-1}$ ) [36]	$\Delta G$ ( $kJ.mol^{-1}$ )	$\Delta H$ ( $kJ.mol^{-1}$ )	$T\Delta S$ ( $kJ.mol^{-1}$ )
Sítio I	$4,6 \pm 0,2$	4,7	$-26,9 \pm 1,3$	$-20,4 \pm 5,4$	$6,4 \pm 6,5$
Sítio II	$3,1 \pm 1,7$	4,1	$-17,9 \pm 9,7$	$-1,5 \pm 2,3$	$16,3 \pm 8,7$



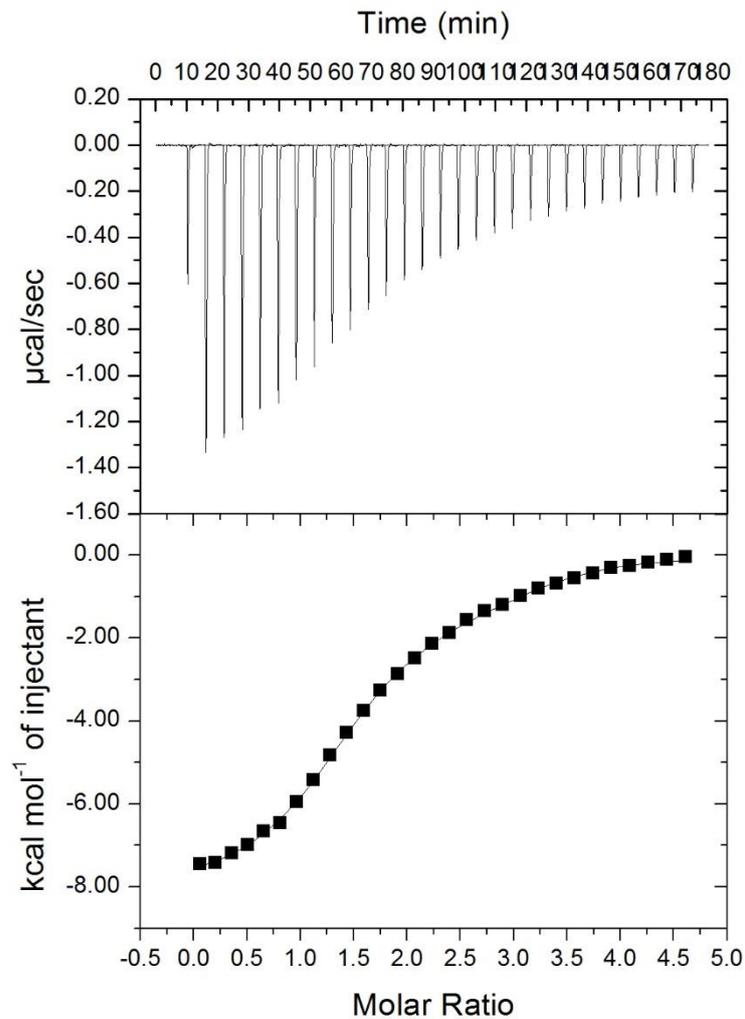
**Figura 13** – Balanço das contribuições entálpica e entrópica na energia livre de Gibbs para interação entre BSA e SL. A É o balanço das contribuições para o sítio I, enquanto B para o sítio II.

O ITC conseguiu aferir a constante de associação do SL com a BSA, em valor semelhante ao da literatura. O valor negativo da energia livre de Gibbs, processos exergônicos, confirma a espontaneidade do processo nas condições experimentais. No caso da ligação ao sítio I, observa-se que a contribuição da entalpia é majoritária em relação a entropia o que indica que a interação proteína-ligando é direcionada pelo estabelecimento de ligações de hidrogênio e/ou interações iônicas e que provavelmente é uma interação com um local de ligação específico da BSA. Neste caso é possível observar como as propriedades moleculares, citadas na Tabela 2, refletem-se nos valores de entalpia e entropia de interação, devido a carga negativa do ácido salicílico bem como grupos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio (favorecendo entalpia) e seu caráter hidrofóbico (favorecendo entropia).

Os valores obtidos para o primeiro sítio de ligação são confiáveis, com um desvio padrão relativo de 4,7%, logo os parâmetros termodinâmicos obtidos descrevem bem a interação para a primeira constante de associação. Para o segundo sítio, porém, o erro associado ao ajuste é considerável, com um desvio padrão relativo de 54,5% para a constante de afinidade, o que reflete também no valor de médio de  $\Delta H$  que é quase zero. Assim para além da interação do SL com sítio II ser fraca (baixo valor de  $K_a$ ), ela é também pouco específica ( $\Delta H$  próximo de zero,

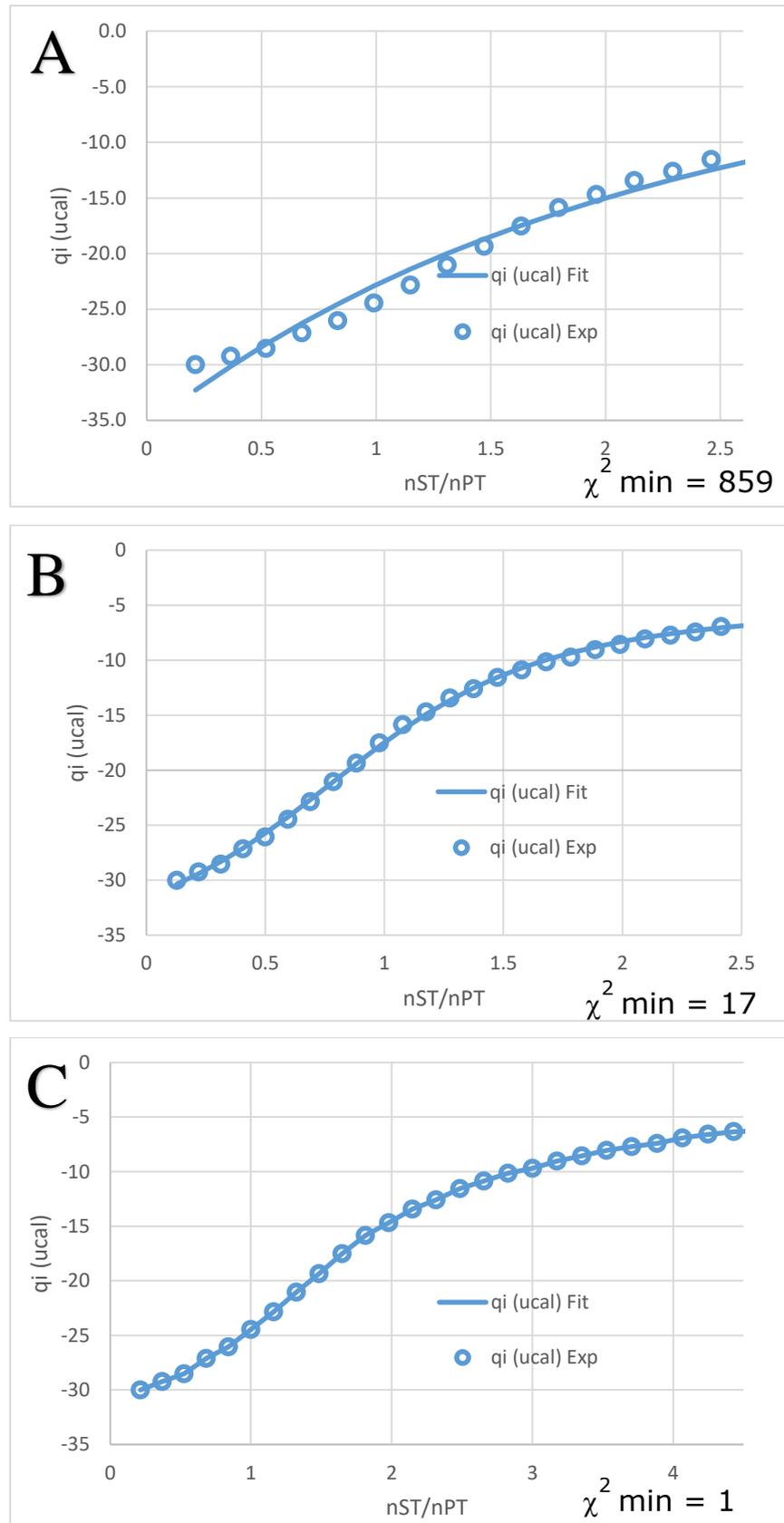
dominada pela variação da entropia). A associação do SL a este sítio deve-se assim maioritariamente ao efeito hidrofóbico.

A titulação envolvendo diclofenac e albumina, também foi possível obter  $K_a$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  e  $T\Delta S$  dessa vez para as duas constantes de associação. Diferente do ácido salicílico, o diclofenac apresenta de uma curva de titulação mais bem definida e com constantes de associação maiores inerentes a interação proteína-ligando, figura 14, facilitando a sua caracterização por ITC.



**Figura 14** – Termograma da curva de titulação da albumina sérica bovina com diclofenac, com concentrações respetivas de 18  $\mu\text{M}$  de proteína na célula e 399  $\mu\text{M}$  de ligando na seringa. Ensaio feito a 37 °C em PBS pH 7,4 2% DMSO.

O termograma da titulação, mostra uma boa curva para a interação entre o DC e a BSA. Como já era estimado pela literatura as constantes de associação e o número de locais de ligação, a proporção proteína-ligando utilizada foi de 1:20 com o objetivo de obter os melhores parâmetros experimentais nas condições do ensaio e valeu a tentativa.



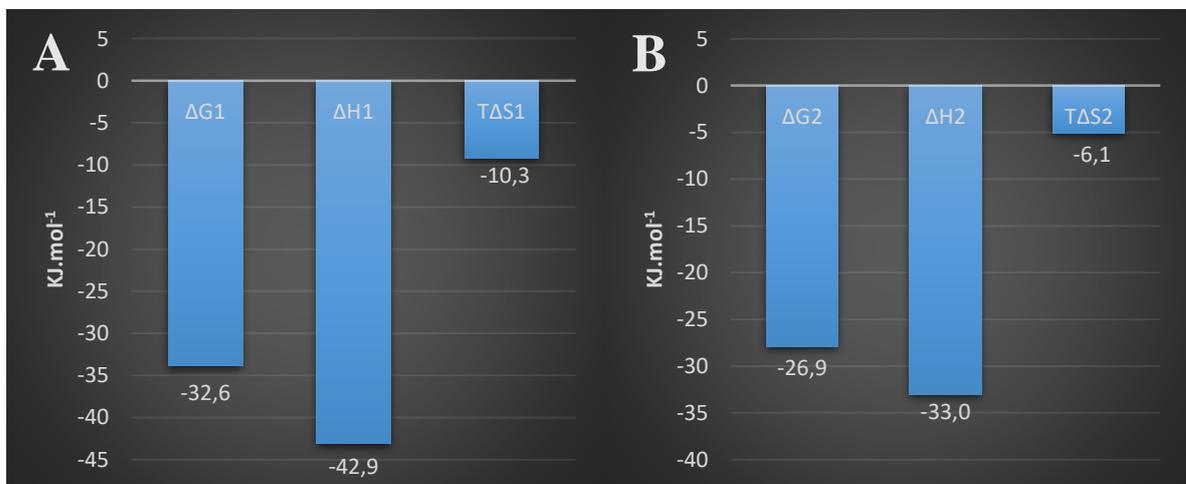
**Figura 15** – Ajustes feitos para a titulação da BSA com diclofenac. **A** para um local de ligação. **B** um local de ligação com concentração de BSA variável. **C** dois locais de ligação independentes.

Como no caso do ácido salicílico, os ajustes feitos para o diclofenac também seguiram a mesma lógica. Onde não se vê concordância entre o ajuste e o experimental para um local de ligação com as concentrações de ligando e proteína fixas, e para um local de ligação com a concentração de proteína ajustável a incerteza associada dessa vez é ainda maior do que foi para o ácido salicílico. Novamente o melhor ajuste nas condições experimentais foi para dois locais de ligação independentes.

**Tabela 6** – Parâmetros termodinâmicos obtidos da titulação da BSA com DC (3 experiências independentes), com ajuste feito no Excel utilizando a função solver, para dois locais de ligação independentes. Log  $K_a$  da segunda coluna são provenientes da literatura por diálise em equilíbrio.

	Log $K_a$ ( $M^{-1}$ )	Log $K_a$ ( $M^{-1}$ ) [42]	$\Delta G$ ( $kJ.mol^{-1}$ )	$\Delta H$ ( $kJ.mol^{-1}$ )	$T\Delta S$ ( $kJ.mol^{-1}$ )
Sítio I	$5,6 \pm 0,4$	5,7	$-32,6 \pm 2,4$	$-42,9 \pm 19,2$	$-10,3 \pm 18,0$
Sítio II	$4,6 \pm 0,3$	4,8	$-26,9 \pm 1,8$	$-33,0 \pm 10,3$	$-6,1 \pm 10,2$

As constantes de associação foram obtidas considerando os dois locais de ligação equivalentes e independentes, com uma boa concordância com a literatura.



**Figura 16** – Balanço das contribuições entálpica e entrópica na energia livre de Gibbs para interação entre BSA e DC. **A** É o balanço das contribuições para o sítio I, enquanto **B** para o sítio II.

Para o primeiro sítio de ligação, o qual possui a maior constante de associação, há uma maior afinidade na interação com o diclofenac e é majoritariamente entálpica, pois a contribuição de  $\Delta H$  é significativamente superior a  $T\Delta S$ . Isso faz crer que a primeira interação é governada por interações específicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas, e desfavorecida entropicamente. Já para o segundo sítio de ligação, com a menor constante de associação logo uma menor afinidade, a maior contribuição também é entálpica e desfavorecida

entropicamente, porém menos intensamente. Essa variável entrópica mais presente no sítio II indica que a ligação da segunda molécula de DC a BSA é acompanhada de alterações estruturais no sistema, como mudanças conformacionais da proteína, camadas de solvatação e interações hidrofóbicas, efeitos esses menos predominantes quando apenas uma molécula de diclofenac liga-se a albumina.

No caso do diclofenac fica bem mais evidente o peso das contribuições das propriedades moleculares do composto na interação com a proteína. O sítio I possui uma elevada contribuição entálpica, a qual governa a interação, e uma contribuição negativa entrópica significativa. O que leva a crer que a carga negativa possui grande peso na entalpia e especificidade de interação, enquanto que o caráter hidrofóbico não teve um maior efeito na entropia. Tudo isso contribui para maiores constantes de associação e com isso os parâmetros termodinâmicos para o segundo local de ligação é possível de se obter através do ITC, e para esse sítio, o qual também é governado majoritariamente entálpicamente, há um menor desfavorecimento entrópico, o que indica que para o segundo sítio o efeito hidrofóbico já é mais pronunciado se comparado com o primeiro sítio de ligação. Os dois locais de ligação refletem a interações específicas do diclofenac com a albumina, uma vez que as entalpias de interação têm maior peso na energia livre de Gibbs e consequentemente na afinidade de ligação, e apesar de possuírem  $\Delta G$ 's não tão diferentes os  $\Delta H$ 's e  $T\Delta S$ 's diferem significativamente, o que leva a acreditar que são dois sítios de ligação distintos em que o diclofenac estabelecerá interações específicas.

**Tabela 7** – Comparação das constantes de associação obtidas pelas duas técnicas implementadas.

Composto	$K_1$ ( $M^{-1}$ ) BSA-PEG	$K_a$ ( $M^{-1}$ ) ITC	CpKa	Carga a pH 7,4	ClogD	ClogP
DC	$4,02 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$	4,2	-1	1,1	4,0
SL	$4,76 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	3,0	-1	-1,5	1,9
CP	$3,94 \times 10^4$	-	9,2	+1	2,7	4,6
AC	$5,43 \times 10^3$	-	14,8	0	1,7	1,8
LB	$8,15 \times 10^3$	-	8,0 ; 9,8	+1	1,3	1,2
VP	$8,82 \times 10^3$	-	10,4	+1	2,3	4,6

As constantes obtidas para o diclofenac e ácido salicílico pelas duas técnicas são concordantes, tabela 7, a constante de associação  $K_a$  é resultado da soma das constantes obtidas para cada sítio de ligação obtidas do ITC, provenientes do ajuste para dois locais de ligação. O que é positivo e suporta a possível utilização das duas técnicas em simultâneo, se o ITC não

conseguir aferir corretamente a constante de associação por exemplo. Como já foi discutido anteriormente, a influência das propriedades moleculares nas constantes obtidas é evidente.

Os dados obtidos e a concordância com a literatura, faz com que os resultados obtidos utilizando os hidrogéis e o modelo de análise por nós implementado sejam confiáveis, uma vez que o ITC já é uma técnica conhecida e utilizada para interações proteína-ligando e os hidrogéis feitos ainda não é uma técnica modelo bem estabelecida para estudar essas interações. Os hidrogéis permitem a aferição da constante de associação e o ITC além disso provém o calor de interação entre os fármacos e a albumina, porém possui limitações na obtenção desses parâmetros se o calor aferido for pequeno, uma limitação que os hidrogéis não possuem. Para além disso os hidrogéis ainda conseguem aferir constantes de associação em simultâneo para diferentes ligandos, se for possível a separação e quantificação dos mesmos posteriormente o equilíbrio estabelecido.

## Capítulo 6– CONCLUSÕES

Utilizando os hidrogéis de BSA-PEG foi possível determinar as constantes de associação de todos os fármacos com a proteína em concordância com a literatura, especialmente para os resultados obtidos com diálise em equilíbrio que é um método estabelecido para obter esses dados. Os hidrogéis comportaram-se muito bem, estabelecendo o equilíbrio de maneira rápida e efetiva nas condições experimentais, sendo possível diferenciar e analisar a fração livre da ligada sem uma barreira física entre elas. Com isso, foi realizado o ajuste para os diferentes ligandos e suas constantes de associação obtidas. Além disso, relacionar as constantes obtidas para cada ligando com suas propriedades moleculares também foi de suma importância, para entender como pKa e logD influenciam na afinidade da interação. Saber a carga e hidrofobicidade nas condições experimentais ajudaram a interpretar os dados obtidos, com isso foi possível perceber que uma carga negativa em grupos ácidos aumenta a afinidade da molécula com a albumina, um maior caráter hidrofóbico também apresenta o mesmo efeito.

Vale ressaltar que, o grau de ativação do PEGa é de suma importância para reprodutibilidade dos ensaios, PEG's com um grau de ativação maior levam a um maior enrijecimento do hidrogel diminuindo a liberdade conformacional da proteína e a porosidade do mesmo. Logo, é necessário um controle no grau de ativação e avaliar como o mesmo pode interferir na ligação dos fármacos a BSA presente no hidrogel. Os hidrogéis são promissores, porém é necessário ainda otimizar o método para obter maior reprodutibilidade.

Com o ITC foi possível obter os parâmetros termodinâmicos para o ácido salicílico e diclofenac, realizando o ajuste para dois locais de ligação independentes. A importância da entalpia e entropia na interação foi caracterizada através dos ensaios. A capacidade do ITC em determinar simultaneamente a entalpia e constante de associação, permite calcular a energia livre de Gibbs e a contribuição entrópica na interação proteína-ligando, e interpretar a especificidade através da entalpia e o efeito hidrofóbico através da entropia. Informações muito importantes quando comparamos esses dados com as propriedades moleculares, como pKa e logD, de cada ligando. Relacionar entalpia e entropia com essas características moleculares ajuda a entender as forças que governam as interações e aumentam ou diminuem a afinidade do fármaco com a BSA.

As interações para os dois ligandos são governadas entalpicamente, ou seja, a contribuição da entalpia é maior na energia livre de Gibbs do que a entrópica. Isso indica que ambos possuem especificidade com a albumina. Para o diclofenac foi possível caracterizar bem os parâmetros para os dois sítios de ligação, devido ao seu termograma ser mais bem definido, então tanto a constante de associação quanto a entalpia foram bem aferidas. Já para o ácido salicílico não, o segundo sítio de ligação possui um erro associado na entalpia significativo, devido a sua curva de titulação não ser bem definida quanto a do diclofenac, e isso compromete a interpretação dos resultados para o segundo sítio de ligação. É uma das limitações do ITC, bem como os limites de solubilidade para compostos com baixa afinidade para proteína e que é necessário subir significativamente sua concentração para obter uma boa curva, caso do labetalol. Já para compostos como o acetaminofeno e verapamil, por exemplo, que possuem uma baixa constante de associação não foi possível obter uma curva de titulação mesmo aumentando a concentração de proteína e ligando. O ITC é muito útil e fornece parâmetros valiosos, porém para moléculas com baixa afinidade e que não geram uma boa curva de titulação é necessário otimizar mais ainda o método. Utilizar estratégias para aumentar a afinidade, como alteração da temperatura ou pH, podem ser utilizadas no futuro.

As técnicas são complementares entre si, os sistemas que o ITC não pôde caracterizar a constante de associação os hidrogéis conseguiram fazê-lo. Com isso é possível traçar estratégias no ITC para obtenção da entalpia de ligação, uma vez que a constante de associação já é obtida através dos hidrogéis. Por fim o uso das duas técnicas para o estudo mostrou-se efetivo, com as constantes de associação é possível estimar a fração ligada em plasma sanguíneo tendo em função a concentração média da albumina no sangue, bem como estudar a especificidade das ligações (entalpia) e o efeito hidrofóbico (entropia) nas interações por ITC.

## Capítulo 7– BIBLIOGRAFIA

- [1] – NELSON, David L.; COX, Michael M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6 Porto Alegre: Artmed, **2013**.
- [2] – Zheng-Yu Wang, Kazutaka Gokan, Masayuki Kobayashi, Tsunenori Nozawa. Solution Structures of the Core Light-harvesting  $\alpha$  and  $\beta$  Polypeptides from *Rhodospirillum rubrum*: Implications for the Pigment–Protein and Protein–Protein Interactions, *Journal of Molecular Biology*, Volume 347, **2005**, p. 465-477.
- [3] – Lim, D., Park, H., De Castro, L. *et al.* Crystal structure and kinetic analysis of  $\beta$  lactamase inhibitor protein-II in complex with TEM-1  $\beta$ -lactamase, *Nat Struct Mol Biol*, volume 8, **2001**, p. 848–852.
- [4] – Brucker, Eric Allen., Olson, John S. Phillips., George, N., Jr. Dou., Yi. Ikeda-Saito, Masao. High Resolution Crystal Structures of the Deoxy, Oxy, and Aquomet Forms of Cobalt Myoglobin\*, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 271, **1996**, p. 25419-25422.
- [5] – Eldirany, Sherif A; Ho, Minh; Hinbest, Alexander J; Lomakin, Ivan B; Bunick, Christopher G. Human keratin 1/10-1B tetramer structures reveal a knob-pocket mechanism in intermediate filament assembly, *The EMBO Journal*, Volume 38, **2019**, p. 1-19.
- [6] – Bohnert T, Gan LS. Plasma protein binding: from discovery to development, *J Pharm Sci*, **2013**, volume 102, p. 2953-2994.
- [7] – Howard ML, Hill JJ, Galluppi GR, McLean MA. Plasma protein binding in drug discovery and development, *Comb Chem High Throughput Screen*, **2010**, volume 13, p. 170-187.
- [8] – Lindup WE, Orme MC. Clinical pharmacology: plasma protein binding of drugs, *Br Med J*, **1981**, volume 282, p. 212-214.
- [9] – McNeil JJ, Louis WJ. Clinical pharmacokinetics of labetalol, *Clin Pharmacokinet*, **1984**, volume 9, p.157-67.
- [10] – T.N.; Rowland, M. *Introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics: the quantitative basis of drug therapy*. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, MD, **2006**.
- [11] – Bertucci C, Domenici E. Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance, *Curr Med Chem*, **2002**, volume 9, p. 1463-1481.
- [12] – Harder S, Thürmann P. Clinically important drug interactions with anticoagulants. An update, *Clin Pharmacokinet*, **1996**, volume 30, p. 416-44.
- [13] – Squire PG, Moser P, O'Konski CT. The hydrodynamic properties of bovine serum albumin monomer and dimer, *Biochemistry*, **1968**, volume 7, p. 4261-4272.

- [14] – He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin, *Nature*, **1992**, volume 358, p. 209-215.
- [15] – Hassan M and others. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Theodore Peters, Jr. San Diego, CA: Academic Press, **1996**.
- [16] – Shen H, Gu Z, Jian K, Qi J. In vitro study on the binding of gemcitabine to bovine serum albumin, *J Pharm Biomed Anal*, **2013**, volume 75, p. 86-93.
- [17] – S. Ketrat, D. Japrun, P. Pongprayoon. Exploring how structural and dynamic properties of bovine and canine serum albumins differ from human serum albumin, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **2020**, volume 98, p. 1-20.
- [18] – Cheng Z. Interaction of ergosterol with bovine serum albumin and human serum albumin by spectroscopic analysis, *Mol Biol Rep*, **2012**, volume 39, p. 9493-9508.
- [19] – Bujacz A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **2012**, volume 68, p. 1278-89.
- [20] – Coelho, C.D.F.; Jesus, J.A.; Vaz, D.C.; Lagoa, R.; Moreno, M.J. BSA-PEG Hydrogel: A Novel Protein-Ligand Binding 3D Matrix, *Med. Sci. Forum*, **2022**, volume 11, p. 1-4.
- [21] – Durso, E. M.; Jeanfrancois, J.; Doillon, C. J.; Fortier, G. Poly(ethylene glycol)-Serum Albumin Hydrogel as Matrix for Enzyme Immobilization - Biomedical Applications, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol*, **1995**, volume 23, p. 587-595.
- [22] – Ferebee, R.; Hakem, I. F.; Koch, A.; Chen, M.; Wu, Y.; Loh, D.; Wilson, D. C.; Poole, J. L.; Walker, J. P.; Fytas, G.; Bockstaller, M. R. Light Scattering Analysis of Mono- and Multi-PEGylated Bovine Serum Albumin in Solution: Role of Composition on Structure and Interactions, *J. Phys. Chem. B*, **2016**, volume 120, p. 4591-4599.
- [23] – Durso, E.M.; Fortier, G. New Hydrogel Based on Polyethylene-Glycol Cross-Linked with Bovine Serum Albumin, *Biotechnol. Tech.* **1994**, volume 8, p. 71–76.
- [24] – Velazquez-Campoy, Adrian & Ohtaka, Hiroyasu & Nezami, Azin & Muzammil, Salman & Freire, Ernesto. Isothermal Titration Calorimetry, *Current protocols in cell biology*, **2004**, Chapter 17, Unit 17.8.
- [25] – Tong J. Gan. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile, *Current Medical Research and Opinion*, **2010**, volume 26, p. 1715-1731.
- [26] – J.R. Paterson, J.R. Lawrence. Salicylic acid: a link between aspirin, diet and the prevention of colorectal cancer, *QJM: An International Journal of Medicine*, **2001**, Volume 94, p. 445–448.
- [27] – Thomas A Ban. Fifty years chlorpromazine: a historical perspective, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, **2007**, volume 3, p. 495-500.

- [28] – McTavish D, Sorkin EM. Verapamil. An updated review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension, *Drugs*, **1989**, volume 38, p. 19-76.
- [29] – MacCarthy EP, Bloomfield SS. Labetalol: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, clinical uses and adverse effects, *Pharmacotherapy*, **1983**, volume 3, p. 193-219.
- [30] – Anderson BJ. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action, *Paediatr Anaesth*, **2008**, volume 18, p. 915-21.
- [31] – Process for the preparation of activated polyethylene glycols, by F. P. Marie, I. Micheal, **2006**, 10 (oct) 24. US 7,125,55 B2. Available: <https://patentimages.storage.googleapis.com/00/f1/23/5be3a090a17623/US7125558.pdf>.
- [32] – T. Peters, *The Plasma Proteins*. Putman FW (ed.), Academic Press, **1975**.
- [33] – M. E. Carlotti, S. Sapino, D. Vione, C. Minero, E. Peira & M. Trotta. Study on the Photodegradation of Salicylic Acid in Different Vehicles in the Absence and in the Presence of TiO<sub>2</sub>, *Journal of Dispersion Science and Technology*, **2007**, volume 28, p. 805-818.
- [34] – Moreno, M.J.; Loura, L.M.S.; Martins, J.; Salvador, A.; Velazquez-Campoy, A. Analysis of the Equilibrium Distribution of Ligands in Heterogeneous Media—Approaches and Pitfalls, *Int. J. Mol. Sci*, **2022**, volume 23, p. 1-35.
- [35] – Paketurytė V, Petrauskas V, Zubrienė A, Abian O, Bastos M, Chen WY, Moreno MJ, Krainer G, Linkuvienė V, Sedivy A, Velazquez-Campoy A, Williams MA, Matulis D. Uncertainty in protein-ligand binding constants: asymmetric confidence intervals versus standard errors, *Eur Biophys J*, **2021**, volume 50, p. 661-670.
- [36] – Honoré B, Brodersen R. Albumin binding of anti-inflammatory drugs. Utility of a site-oriented versus a stoichiometric analysis, *Mol Pharmacol*, **1983**, volume 25, p. 137-50.
- [37] – Romer J, Bickel MH. A method to estimate binding constants at variable protein concentrations, *J Pharm Pharmacol*, **1979**, volume 31, p. 7-11.
- [38] – Shi, G., Xu, F., Xue, J. and Jin, L. High Performance Liquid Chromatography-Electrochemical Detection (HPLC-ECD) for the Pharmacokinetic Studies of Acetaminophen with Microdialysis, *Electroanalysis*, **1999**, volume 11, p. 432-437.
- [39] – Martínez-Gómez MA, Sagrado S, Villanueva-Camañas RM, Medina-Hernández MJ. Characterization of basic drug-human serum protein interactions by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **2006**, volume 27, p. 3410-3419.
- [40] – Jia Z, Ramstad T, Zhong M. Determination of protein-drug binding constants by pressure-assisted capillary electrophoresis (PACE)/frontal analysis (FA), *J Pharm Biomed Anal*, **2002**, volume 30, p. 405-413.

[41] – M. Gallo, S. Matteucci, N. Alaimo, E. Pitti, M. V. Orsale, V. Summa, D. O. Cicero, E. Monteagudo. A novel method using nuclear magnetic resonance for plasma protein binding assessment in drug discovery programs, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2019**, volume 167, p. 21-29.

[42] – Chamouard JM, Barre J, Urien S, Houin G, Tillement JP. Diclofenac binding to albumin and lipoproteins in human serum, *Biochem Pharmacol.* **1985**, volume 34, p. 1695-700.

[43] – Rafael Claveria-Gimeno, Sonia Vega, Olga Abian & Adrian Velazquez-Campoy. A Look at Ligand Binding Thermodynamics in Drug Discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery.* **2017**, p. 1-41.