

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 17/06/2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Gabriel Zazeri

Estudo da interação da piperina com potenciais alvos
moleculares de interesse farmacológico

São José do Rio Preto

2021

Gabriel Zazeri

Estudo da interação da piperina com potenciais alvos
moleculares de interesse farmacológico

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc.: 141953/2017-9

CAPES – Código de Financiamento 001

Orientador: Prof.Dr. Marinônio Lopes Cornélio

São José do Rio Preto

2021

Z39e

Zazeri, Gabriel

Estudo da interação da piperina com potenciais alvos moleculares de interesse farmacológico / Gabriel Zazeri. -- São José do Rio Preto, 2021

88 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Marinônio Lopes Cornélio

1. Biofísica Molecular. 2. Espectroscopia de Fluorescência. 3. Docagem Molecular. 4. Dinâmica Molecular. 5. Piperina. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Gabriel Zazeri

Estudo da interação da piperina com potenciais alvos
moleculares de interesse farmacológico

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc.: 141953/2017-9

CAPES – Código de Financiamento 001

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientador

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Nonato

USP – Câmpus de Ribeirão Preto

Prof. Dr. Julio Cesar Borges

USP – Câmpus de São Carlos

Prof. Dr. Jorge Chahine

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

17 de junho de 2021

Agradecimento

Começo esta seção agradecendo a orientação do Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio que me recebeu em seu laboratório, oferecendo todo apoio e suporte para a realização desta pesquisa. Agradeço também ao Prof. Dr. Marcelo de Freitas Lima, pois além de autorizar o uso do espectrofluorímetro para a obtenção dos dados aqui apresentados, também me ofereceu total apoio para a condução dos cálculos *ab initio*. Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Alan M. Jones que supervisionou meu doutorado sanduíche na universidade de Birmingham. O Dr. Alan me recebeu em seu laboratório dando todo o suporte necessário para a realização da pesquisa e publicação dos manuscritos. Também gostaria de agradecê-lo por ter confiado em meu trabalho e caminhado comigo não só no período em que estive na Inglaterra, mas também no meu retorno. Além do Dr. Alan, gostaria de agradecer ao Dr. Daniel Gill e Dr^a Cecile Le Duff pela amizade e parceria que resultaram em publicações.

Gostaria de agradecer a minha família, que foi fundamental para que eu cumprisse esta etapa da minha carreira. Agradeço a minha companheira Ana Paula Ribeiro Povinelli que compartilhou diariamente todos os momentos comigo, oferecendo todo o seu carinho incondicional e companheirismo para enfrentarmos todos os desafios. Além disto, a Ana teve participação ativa na coleta dos dados, na escrita dos manuscritos e nas discussões científicas que foram fundamentais para a conclusão desta pesquisa. Em seguida agradeço aos meus pais Márcia Rodrigues e Luiz Augusto Zazeri pela educação, suporte e incentivo oferecidos desde meu nascimento até a conclusão desta etapa, que foi de suma importância.

Agradeço ao Bruno Rogério Fernandes que além da amizade, deu todo suporte na parte técnica computacional, que foi fundamental para a realização deste trabalho. Agradeço também aos técnicos Antônio Aparecido Barbosa e Fábio Rogério de Moraes que também deram todo o suporte para a realização deste trabalho.

Ainda nesta seção, agradeço a todo o corpo docente e servidores da Unesp que além dos ensinamentos transmitidos a mim, permitiram que esta pesquisa fosse realizada. De forma mais específica agradeço aos professores Dr. João Ruggiero Neto e Dr. Valdecir Farias Ximenes que autorizaram o uso dos equipamentos dos seus respectivos laboratórios e enriqueceram este trabalho com suas discussões.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Proc.: 141953/2017-9.

Resumo

O estudo de produtos naturais com propriedades farmacológicas é uma área de interesse para a comunidade científica. Estudos recentes mostraram que a piperina, uma molécula extraída de diversas espécies de pimenta, é um agente anti-inflamatório que atua inibindo a cascata de ativação da proteína NF- κ B em várias etapas desta via, ocasionando o bloqueio da transcrição de genes de citocinas e outras proteínas pró-inflamatórias. Devido a este fato, o objetivo deste trabalho foi a caracterização biofísica a nível molecular da piperina e seus derivados com proteínas envolvidas neste processo, nunca antes reportados na literatura. A caracterização dos complexos piperina-proteína, foi feita por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência de modo a determinar o número de sítios de ligação, a descrição dos parâmetros termodinâmicos de interação, bem como, as constantes e os modos de ligação dos complexos. Além disto, o dicroísmo circular foi empregado de modo a entender as mudanças conformacionais que as proteínas sofreram devido às interações com as moléculas. As técnicas computacionais de docagem e dinâmica molecular foram utilizadas para encontrar os prováveis sítios de interação e para descrever o microambiente de interação dos ligantes. A primeira etapa deste trabalho foi dedicada ao estudo da interação da piperina com as proteínas interleucina-1 β (IL-1 β), domínio NBD da proteína de choque térmico 70 (Hsp70) e albumina sérica de camundongo (RSA). Os resultados experimentais mostraram que a piperina se liga as proteínas espontaneamente e que o processo é entropicamente dirigido para as proteínas IL-1 β e NBD e entalpicamente dirigido para a RSA. Além disto, os dados experimentais revelaram a constante de afinidade das interações, o número de sítios e o modo de interação (cooperativo ou não). Com as ferramentas de docagem molecular e dinâmica verificaram-se os sítios de interação, as interações envolvidas e a energia livre de ligação teórica. A segunda etapa deste trabalho foi dedicada à síntese e à caracterização de moléculas inspiradas na estrutura da piperina e ao estudo computacional dos efeitos das modificações estruturais na interação com as proteínas envolvidas nos processos inflamatórios IL-1 β e NF- κ B. O conjunto de resultados adquirido permitiu uma avaliação espectroscópica auxiliada por modelagem computacional que elucidou em detalhes as interações entre a piperina e derivados com as proteínas IL-1 β , NBD e RSA que servirá como base para futuros estudos na linha de descoberta de fármacos.

Palavras-Chave: RSA. IL1 β . HSP70/NBD. NF- κ B. Piperina. Espectroscopia de Fluorescência. Dicroísmo Circular. Docagem Molecular. Dinâmica Molecular.

Abstract

The search of natural products with pharmacological properties is of utmost interest to the scientific community. Recent studies have shown that piperine, a natural metabolite extracted from several pepper species, presents anti-inflammatory properties, playing inhibitory effect on the activation of the NF- κ B protein at several stages of the pathway, which causes the blocking of the transcription of cytokine genes and other pro-inflammatory proteins. From this perspective, the objective of this work was the biophysical characterization at the molecular level of piperine and its analogues with proteins involved in inflammatory process. The characterization of the protein-piperine complex was carried out applying fluorescence spectroscopy technique in order to determine the number of binding sites, the description of the thermodynamic parameters of interaction, as well as the binding constants of the complexes. In addition, circular dichroism was employed in order to understand the conformational changes that proteins experienced due to interactions with the small molecules. The computational techniques of molecular docking and dynamics were used to find the sites of interaction and to describe the microenvironment of interaction of the ligands. The first stage of this work was dedicated to the study of the interaction of piperine with the proteins interleukin-1 β (IL-1 β), NBD domain of heat shock protein 70 (Hsp70) and rat serum albumin (RSA). The experimental results revealed that piperine binds to proteins spontaneously and that the process was entropically driven in its interaction with IL-1 β and NBD proteins and enthalpically driven in its interaction with RSA. In addition, the experimental data revealed the constant affinity of the interactions, the number of sites and the mode of interaction (either cooperative or non-cooperative). With molecular docking and dynamics analyses, the microenvironment of the interaction was disclosed and the theoretical free energy of binding was calculated. The second stage of this work was dedicated to the synthesis and characterization of piperine-inspired molecules and to the computational study of the effects of structural changes in the interaction with the proteins involved in the inflammatory processes: IL-1 β and NF- κ B. The set of results presented in this work elucidated in detail the interactions between piperine and piperine-inspired with the IL-1 β , NBD and RSA proteins and it can shed light on future studies in drug discovery.

Keywords: RSA. IL1 β . HSP70/NBD. NF- κ B. Piperine. Fluorescence Spectroscopy. Circular Dichroism. Molecular Docking. Molecular Dynamics.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Estrutura molecular da piperina.....	13
Figura 2: Caminho pelo qual a proteína HSP70 ativa a proteína NF- κ B.....	14
Figura 3: Hsp70 de organismo procariótico (DnaK – PDB: 2KHO). Esta estrutura está representado o domínio NBD com seus sub domínios, o domínio SBD e a estrutura que liga os dois domínios (linker).	15
Figura 4: Estrutura do domínio NBD da HSP70 com resíduo de triptofano destacado em laranja (PDB 1S3X).	15
Figura 5: Estrutura tridimensional da proteína IL1 β (PDB 1ITB) com o resíduo de triptofano em laranja.....	16
Figura 6: Cascata de ativação do heterodímero p50/p65 em células estimuladas com LPS.	17
Figura 7: Estrutura tridimensional da proteína NF- κ B (PDB 2O61) com o resíduo de triptofano em laranja.....	18
Figura 8: Alinhamento de seqüências da albumina de soro humano (HSA) e albumina de soro de rato (RSA) com 73% de similaridade. O asterisco indica as posições que possuem o resíduo conservado. Dois pontos indica conservação entre grupos de propriedades semelhantes. O período indica a conservação entre grupos de propriedades pouco semelhantes.....	19
Figura 9: Alinhamento estrutural da RSA (em azul) e HSA 1AO6 (em vermelho). No estilo "ball and stick" está representado o TRP214 da RSA (em azul) e da HSA (em vermelho) sobrepostos.	20
Figura 10: Estrutura da HSA destacando os domínios, subdomínios e algumas moléculas que abrigam em sua estrutura.....	20
Figura 11: Representação de uma cubeta com um sistema hipotético em solução.	23
Figura 12: Exemplos de diferentes mecanismos de supressão. (A) Supressão colisional e (B) supressão estática.....	25
Figura 13: Exemplo de gráfico usado na teoria BDF. Neste caso, a porcentagem de supressão foi medida em duas concentrações diferentes de proteína, P_{T1} e P_{T2} em preto e vermelho, respectivamente. A linha horizontal preta em aproximadamente $\Delta F = 0.5$ representa o ponto no qual ambas as amostras possuem o mesmo o número médio de ligantes ligados por proteína (Σv_i) e, portanto o mesma razão de supressão do sinal de fluorescência.....	28
Figura 14: Ilustração de dois gráficos Scatchard. (A) cooperatividade negativa e (B) cooperatividade positiva.	29
Figura 15: Modelo de cálculo para a energia livre de ligação ΔG	32
Figura 16: Forma geral dos campos de força utilizados na dinâmica molecular.	34
Figura 17: Espectros de emissão de fluorescência do TRP da proteína RSA em resposta a adição de alíquotas de 1 μ M de piperina no intervalo de 0 a 15 μ M (a \rightarrow p). A execução do experimento foi feita a pH 7.4, temperatura de 288 K e a mostra foi excitada em $\lambda_{exc} = 295$ nm. O inset da figura mostra a estrutura química da piperina formada pelo fragmento amida e o fragmento aromático ligados por uma cadeia alifática.....	41
Figura 18: Gráficos de Stern-Volmer (ordenada esquerda) e tempos de fluorescência (ordenada direita) obtidos por meio da emissão da RSA em 340 nm em resposta a adição de piperina.....	43
Figura 19: Gráficos de duplo-log referente aos experimentos de titulação de piperina em solução de RSA.	44
Figura 20: Gráficos de van't Hoff referente a interação RSA-piperina em 288, 298 e 308 K.....	45
Figura 21: Gráficos da porcentagem de supressão de fluorescência (ΔF) em função do logaritmo da concentração de piperina adicionada a amostra. A linha sólida horizontal que encontra os três gráficos	

de $\Delta F \times \log[\text{piperina}]$ no ponto em que os três experimentos, feitos com a RSA a 2, 4 e 8 μM , apresentam o mesmo valor de porcentagem de supressão. O inset da figura é um exemplo das retas obtidas para cada ΔF .	46
Figura 22: Gráfico de Scatchard para o sistema RSA-piperina obtido a partir dos dados retirados da análise de IDF.	46
Figura 23: Espectros de dicroísmo circular da RSA a 4 μM na presença de 24 μM de piperina nas temperaturas de 288, 298 e 308 K.	47
Figura 24: (a) Estrutura tridimensional da RSA obtida por modelagem e (b) gráfico de Ramachandram do modelo.	48
Figura 25: Sítio de ligação da piperina na RSA obtidos por docagem molecular em (a) uma visão geral, (b) com os aminoácidos que compõem o microambiente de ligação 1 e (c) com os aminoácidos que compõem o microambiente de ligação 2 e (d) com os aminoácidos que compõem o microambiente de ligação 3.	49
Figura 26: Distância entre o centro de geometria da RSA ao centro de geometria da piperina durante os 50 ns de dinâmica molecular.	50
Figura 27: Evolução das estruturas secundárias da RSA presentes nos sítios (a) 1, (b) 2 e (c) 3 que a piperina interage.	51
Figura 28: Espectros de emissão de fluorescência do TRP da proteína IL-1 β [4 μM] em resposta a adição de alíquotas de 4 μM de piperina no intervalo de 0 a 40 μM (a \rightarrow u). A execução do experimento foi feita a pH 7.4, temperatura de 298 K e a mostra foi excitada em $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$. O inset da figura mostra a estrutura química da piperina formada pelo fragmento amida e o fragmento aromático ligados por uma cadeia alifática	52
Figura 29: Gráficos de Stern-Volmer (ordenada direita) e tempos de fluorescência (ordenada esquerda) obtidos por meio da emissão da IL-1 β em 340 nm em resposta a adição de piperina	53
Figura 30: Gráficos de duplo-log referente aos experimentos de titulação de piperina em solução de IL-1 β .	54
Figura 31: Gráficos de van't Hoff referente à interação IL-1 β -piperina em 288, 298 e 308 K.	55
Figura 32: Gráficos da porcentagem de supressão de fluorescência (ΔF) em função do logaritmo da concentração de piperina adicionada à amostra. A linha sólida horizontal que encontra os dois gráficos de $\Delta F \times \log[\text{piperina}]$ no ponto em que os dois experimentos, feitos com a IL-1 β a 4 e 8 μM , apresentam o mesmo valor de porcentagem de supressão. O inset da figura é um exemplo das retas obtidas para cada ΔF .	56
Figura 33: Gráfico de Scatchard para o sistema IL-1 β /piperina obtido a partir dos dados retirados da análise de IDF.	56
Figura 34: Espectros de dicroísmo circular da IL-1 β na ausência e na presença de piperina na proporção de 1:12 μM na temperatura de 288 K.	57
Figura 35: Sítio de ligação da piperina na IL-1 β indicado pela docagem molecular em (a) uma visão geral, (b) com os aminoácidos que compõem o microambiente de ligação (c) as principais interações observadas no sítio de ligação.	58
Figura 36: Histogramas das configurações acessadas pela piperina ao longo da coordenada de reação com as distâncias das janelas de 0,1 nm.	59
Figura 37: Perfil do potencial de força média (PMF) para a dissociação da piperina a partir do sítio de interação da IL-1 β .	59
Figura 38: Espectros de emissão de fluorescência do TRP do NBD [4 μM] em resposta a adição de alíquotas de 0,5 μM de piperina no intervalo de 0 a 20 μM (a \rightarrow *). A execução do experimento foi feita a pH 7.4, temperatura de 288 K e a mostra foi excitada em $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$. O inset da figura	

mostra a estrutura química da piperina formada pelo fragmento amida e o fragmento aromático ligados por uma cadeia alifática.....	60
Figura 39: Gráficos de Stern-Volmer (ordenada direita)e tempos de fluorescência (ordenada esquerda) obtidos por meio da emissão da NBD em 330 nm em resposta a adição de piperina.	61
Figura 40: Gráficos de duplo-log referente aos experimentos de titulação de piperina em solução de NBD.	62
Figura 41: Gráficos de van't Hoff referente a interação IL1 β -piperina em 288, 298 e 308 K.....	63
Figura 42: Gráficos da porcentagem de supressão de fluorescência (ΔF) em função do logaritmo da concentração de piperina adicionada à amostra. A linha sólida horizontal que encontra os três gráficos de $\Delta F \times \log[\text{piperina}]$ no ponto em que os três experimentos, feitos com a NBD a 4, 6 e 8 μM , apresenta o mesmo valor de porcentagem de supressão. O inset da figura é um exemplo da retas obtidas para cada ΔF	64
Figura 43: (a) Gráfico de Scatchard. (b) Gráfico de Hill.	65
Figura 44: Espectros de dicroísmo circular da NBD com piperina nas proporções NBD:piperina de 1:0 a 1:12.5 (a \rightarrow f).	65
Figura 45: Sítios de ligação da piperina na NBD obtidos por docagem molecular em (a) uma visão geral, (b) com os aminoácidos que compõe o microambiente de ligação 1 e (c) com os aminoácidos que compõe o microambiente de ligação 2.	66
Figura 46: Histogramas das configurações acessadas pela piperina ao longo da coordenada de reação analisadas para (a) sítio 1 e (b) sitio 2. Em ambas as simulações a distância das janelas foi de 0.1nm.	67
Figura 47: Perfil do potencial de força média (PMF) para a dissociação da piperina: (a) do sítio 1 e (b) sítio 2.	67
Figura 48: Dois resultados de potenciais ciclizações da 3a e os mapas de correlações de NMR selecionadas para 4a nos espectros 2D ^1H - ^{13}C HMBC e 2D ^1H - ^{15}N HMBC	69
Figura 49: Mapa de potencial elétrico (MEP) de moléculas inspiradas na piperina, onde a escala vai de densidade de carga negativa (representada pela cor vermelha) e densidade de carga positiva (representada pela cor azul).	70
Figura 50: Ambientes de ligação da piperina e análogos (piperina-ciano, 3a-laranja, 4a-roxo, 3b-amarelo, 3c-vermelho, 4c-verde) (a) na proteína IL-1 β e (b) na proteína NF-kB.	71
Figura 51: Detalhes dos microambientes de ligação da IL-1 β para piperina e derivados visualizados com LigPlot.	72
Figura 52: Detalhes dos microambientes de ligação da NF-kB para piperina e derivados visualizados com LigPlot.	73

Lista de Tabelas

Tabela 1: Coeficientes de extinção molar das proteínas e piperina.....	36
Tabela 2: Constantes de Stern-Volmer nas temperaturas de 288, 298 e 308 K.	43
Tabela 3: Constante de associação nas temperaturas de 288, 298 e 308K.....	44
Tabela 4: Parâmetros termodinâmicos da interação RSA – piperina calculados nas temperaturas 288, 298 e 308 K.	45
Tabela 5: Porcentagens de estrutura secundária das proteínas nas temperaturas 288, 298 e 308 K.	47
Tabela 6: Constantes de Stern-Volmer e bimolecular nas temperaturas de 288, 298 e 308 K.....	53
Tabela 7: Constantes de ligação do complexo IL-1 β – piperina nas temperaturas de 288, 298 e 308 K.	54
Tabela 8: Parâmetros termodinâmicos da interação IL-1 β -piperina calculados nas temperaturas 288, 298 e 308 K.	55
Tabela 9: : Porcentagens de estrutura secundária da IL-1 β obtidas com a deconvolução do espectro de dicroísmo circular.....	57
Tabela 10: Constantes de Stern-Volmer nas temperaturas de 288, 298 e 308 K.	61
Tabela 11: Constante de ligação nas temperaturas de 288, 298 e 308 K.	62
Tabela 12: Parâmetros termodinâmicos da interação NBD– piperina calculados nas temperaturas 288, 298 e 308 K.	63
Tabela 13: Porcentagens de estruturas secundarias do NBD na ausência e na presença de piperina na proporção 1:12.5.	66
Tabela 14: Energias de interação obtidos por MM/PBSA para o complexo NBD e piperina simulados com o sítio 1 e 2 ocupados separadamente; e com os sítios 1 e 2 ocupados simultaneamente.	68
Tabela 15: Pontuação de energia das interações dos derivados de piperina com as proteínas IL-1 β e NF- κ B obtidas por docagem molecular.	74

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Piperina	12
1.2 Heat Shock Protein 70 (HSP70)	13
1.3 Interleucina 1 β (IL-1 β).....	16
1.4 Nuclear Factor – kappa B (NF- κ B).....	17
1.5 Albumina de soro de camundongo (RSA).....	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos gerais	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
2.2.1 Abordagens experimentais	21
2.2.2 Abordagens computacionais	21
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DAS TÉCNICAS UTILIZADAS NO PROJETO	22
3.1 UV-VIS	22
3.2 Espectroscopia de fluorescência do estado estacionário	23
3.2.1 Efeito de filtragem interna.....	30
3.3 Dicroísmo Circular.....	31
3.4 Docagem Molecular.....	31
3.5 Dinâmica Molecular.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 UV-VIS	35
4.2 Espectroscopia de Fluorescência.....	36
4.3 Fluorescência resolvida no tempo	36
4.4 Otimização das estruturas dos ligantes	37
4.5 Docagem molecular	37
4.6 Dinâmica molecular	38
4.7 Tratamento de dados e visualização dos modelos	40
5. PRINCIPAIS RESULTADOS.....	41
5.1 Caracterização do complexo RSA-Piperina.....	41
5.2 Caracterização do complexo IL1 β -Piperina	51
5.3 Caracterização do complexo NBD-Piperina	59
5.2 Análise <i>in silico</i> da interação das moléculas inspiradas na estrutura da piperina com as proteínas IL-1 β e NF- κ B.....	68
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
REFERÊNCIAS	76

Apêndice A – Manuscritos e capítulos de livros publicados	81
Anexo A - Certificado de análise do domínio NBD fornecido pela GenScript	88

1. INTRODUÇÃO

A natureza sempre foi uma fonte profundamente explorada para obtenção de fármacos. Nos últimos 20 anos, um terço dos fármacos aprovados pelo FDA (do inglês Food and Drug Administration) foram baseados em produtos naturais ou sem seus derivados (THOMFORD et al., 2018). Atualmente a busca por metabólitos com potencial farmacológico oriundos de plantas e de micro-organismos continua sendo uma área de pesquisa bastante explorada pela comunidade científica.

A interação destas moléculas com alvos farmacológicos é a base molecular para a atividade da maioria dos compostos farmacêuticos e por isso a descrição destas interações é de grande importância na descoberta de novos fármacos com maior eficácia e seletividade (COURNIA; ALLEN; SHERMAN, 2017).

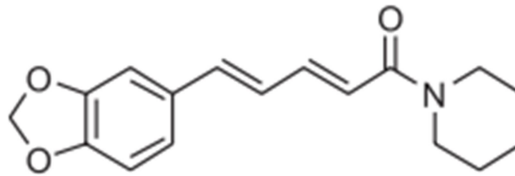
Um exemplo de produto natural que vem sendo estudado recentemente é a piperina. Esta molécula tem apresentado resultados promissores como ansiolítico, antitumoral, anti-inflamatório e antiangiogênico (SRINIVASAN, 2007).

Embora as áreas de farmacologia e de produtos naturais tenham em seu acervo múltiplas técnicas experimentais para estudo *in vivo* e *in vitro* da ação destas moléculas, as técnicas experimentais com base em biofísica como espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular, bem como as técnicas computacionais como docagem e dinâmica molecular são importantes ferramentas que foram incorporadas pela área de desenvolvimento de fármacos, uma vez que a aplicação destas técnicas proporciona o entendimento mais aprofundado de interações fármaco-proteína.

1.1 Piperina

Piperina (Figura 1) cujo peso molecular corresponde a 285 g/mol (1-piperoil-piperidina, 1) é o alcaloide principal da pimenta-do-reino ou pimenta preta (*Piper nigrum* Linn), que é comumente usada como condimento e também em vários preparos tradicionais da medicina popular (ANAND, 1990). Frutos secos de *Piper longum* (pimenta longa), *Piper nigrum* e rizomas secos de *Zingiber officinalis* (gengibre) são usados na medicina popular indiana Ayurveda, pelo nome de “Trikatu”. Entre as suas atividades biológicas, a piperina apresenta atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antiparasitária (doença de Chagas e leishmaniose).

Figura 1: Estrutura molecular da piperina.



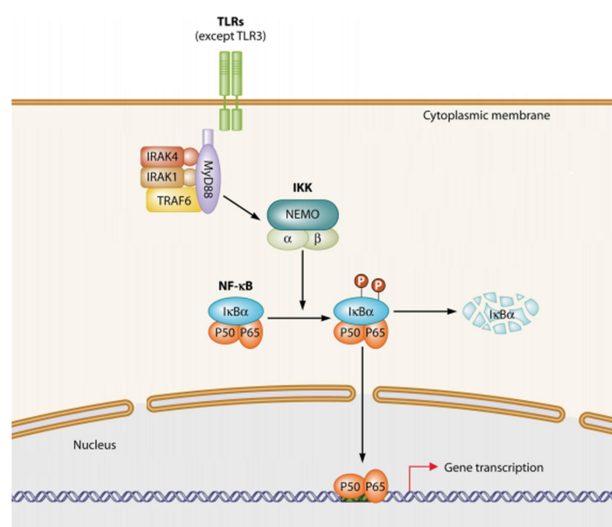
Fonte: Autorial Própria

1.2 Heat Shock Protein 70 (HSP70)

Os organismos vivos, independente do reino, são constantemente submetidos a diversas situações estressantes e respondem a esses estímulos por meio de alterações no metabolismo celular, ativando seus mecanismos de defesa (MEYER; DA SILVA, 1999). A resposta ao estresse inclui a atuação de proteínas denominadas proteínas de choque térmico, HSPs (do inglês Heat Shock Protein), sendo esta uma das respostas primárias de proteção celular (LINDQUIST; CRAIG, 1988). As HSPs fazem parte da grande família das proteínas conhecidas como chaperonas moleculares, assim chamadas por possuir a capacidade de interagir de forma reversível com outras proteínas, auxiliando na formação, dobramento e transporte trans-membrana (KARP, 2005). Inicialmente as Hsp_s foram identificadas como proteínas induzidas pelo estresse térmico (RITOSSA, 1962), contudo estudos recentes iniciaram uma mudança de paradigma na compreensão da função das HSPs.

Estudos recentes mostraram através de experimentos a nível celular que a proteína HSP70 é encontrada no meio extracelular e possui potente atividade de citocina, com habilidade de ligar-se com alta afinidade à membrana plasmática desencadeando um fluxo rápido de íons Ca^{2+} que provoca o início da via de ativação da proteína NF- κ B, que regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias em humanos (HULINA et al., 2018; SOMENSI et al., 2017). Foi reportado nestes artigos que a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela HSP70 é mediada através da transdução de sinal pelo caminho da MyD88/ Irak / NF- κ B onde a Hsp70 utiliza tanto a proteína receptora TLR2 (receptor para bactérias gram-positivas) quanto a TLR4 (receptor para bactérias gram-negativas) para enviar seu sinal pró-inflamatório (Figura 2).

Figura 2: Caminho pelo qual a proteína HSP70 ativa a proteína NF- κ B

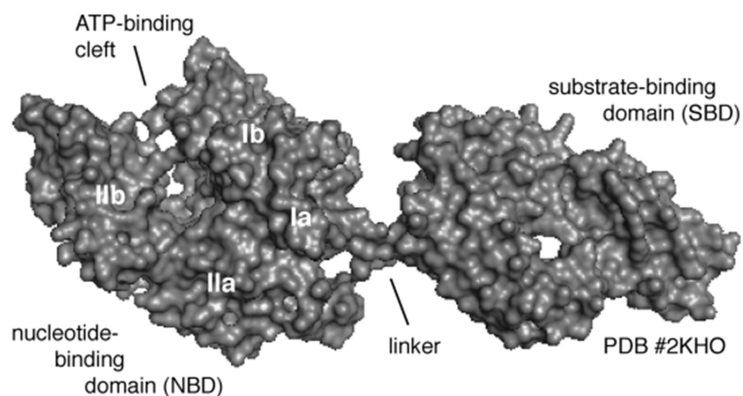


Fonte: Adaptado de C. Picard e colaboradores (PICARD; CASANOVA; PUEL, 2011).

Como estudos recentes demonstraram que a HSP70 tem caráter pró-inflamatório dando início a via de ativação da proteína regulatória de citocinas (NF- κ B), é de suma importância o estudo da interação entre moléculas com ação anti-inflamatória e esta proteína, a fim de ser obtidas informações sobre as interações e possivelmente encontrar uma molécula eficiente para interromper o processo inflamatório.

Estruturalmente, a HSP70 é uma proteína de 70 kDa que consiste em um domínio de ligação de nucleotídeo N-terminal conservado e independente (NBD \approx 40 kDa) com atividade ATPase, um domínio de ligação de substrato (SBD \approx 25 kDa) e um domínio C-terminal fracamente conservado (JONES et al., 2016). O NBD e o SBD estão ligados por uma estrutura curta conectora conhecida como “linker” (EVANS; CHANG; GESTWICKI, 2010). O NBD consiste em dois subdomínios, I e II, que são subdivididos nas regiões a e b. As regiões Ia e IIa interagem com ATP (EVANS; CHANG; GESTWICKI, 2010). A interação com o ATP leva a estrutura do NBD a mudanças conformacionais que afetam a afinidade da HSP70 por seus receptores (TLRs), revelando a flexibilidade desta proteína (DE OLIVEIRA et al., 2019). Cheeseman e colaboradores (CHEESEMAN et al., 2016) e Jones e colaboradores (JONES et al., 2016) identificaram alguns ligantes que causaram alterações conformacionais no NBD, reforçando a flexibilidade do domínio. Além disso, os autores destacaram a necessidade de encontrar pequenos ligantes com potencial para inibir a HSP70. Considerando a flexibilidade estrutural do NBD, a chave para inibir a função das citocinas da HSP70 pode ser a busca por pequenas moléculas capazes de induzir mudanças conformacionais que reduzam a afinidade pelos receptores.

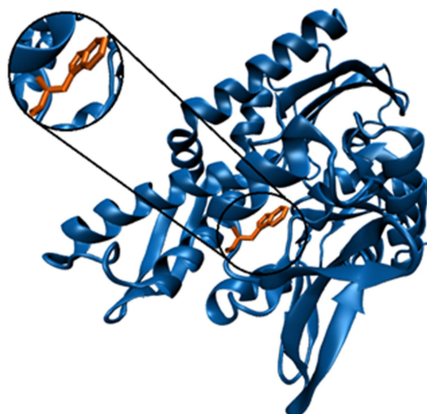
Figura 3: Hsp70 de organismo procariótico (DnaK – PDB: 2KHO). Esta estrutura está representado o domínio NBD com seus sub domínios, o domínio SBD e a estrutura que liga os dois domínios (linker).



Fonte: (EVANS; CHANG; GESTWICKI, 2010)

A Figura 4 mostra a estrutura do domínio NBD (do inglês Nucleotide-Binding Domain) da proteína HSP70 (1S3X) com seu único resíduo de triptofano destacado em laranja. Por possuir um único resíduo de triptofano, o estudo por fluorescência das interações entre esta proteína com as moléculas terá um sinal bem definido para a excitação da proteína (295nm), o que possibilita o uso da técnica de espectroscopia de fluorescência para monitorar as interações com ligantes exógenos.

Figura 4: Estrutura do domínio NBD da HSP70 com resíduo de triptofano destacado em laranja (PDB 1S3X).

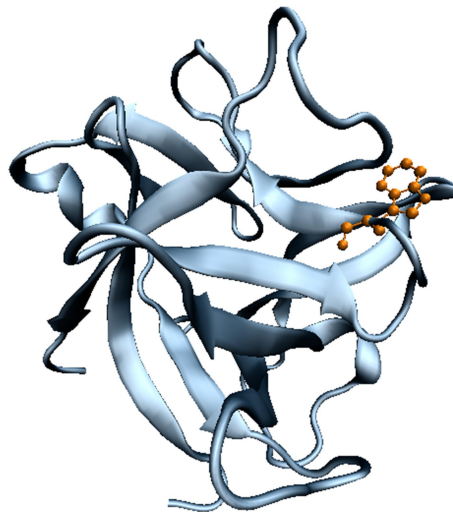


Fonte: Autoria própria.

1.3 Interleucina 1 β (IL-1 β)

A interleucina-1 β (IL-1 β) pertence à família de citocinas dos mediadores celulares. Essa proteína é produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados em resposta a infecção e lesão (RUBARTELLI et al., 1990). Com apenas 17 kDa de peso molecular e 153 aminoácidos em sua estrutura, essa proteína é o um principais mediadores solúvel da inflamação que inicia a via de ativação da proteína NF- κ B, responsável pela transcrição de genes de citocinas e outras proteínas pró-inflamatórias (YING et al., 2013). A estrutura tridimensional (Figura 5) da proteína (PDB 1ITB) mostra que sua cadeia é composta predominantemente por estruturas secundárias do tipo folhas-beta e coil. Além disto, esta proteína possui apenas um resíduo de triptofano (em laranja), o que possibilita o uso da técnica de espectroscopia de fluorescência para monitorar as interações com ligantes exógenos.

Figura 5: Estrutura tridimensional da proteína IL1 β (PDB 1ITB) com o resíduo de triptofano em laranja.



Fonte: Autoria própria.

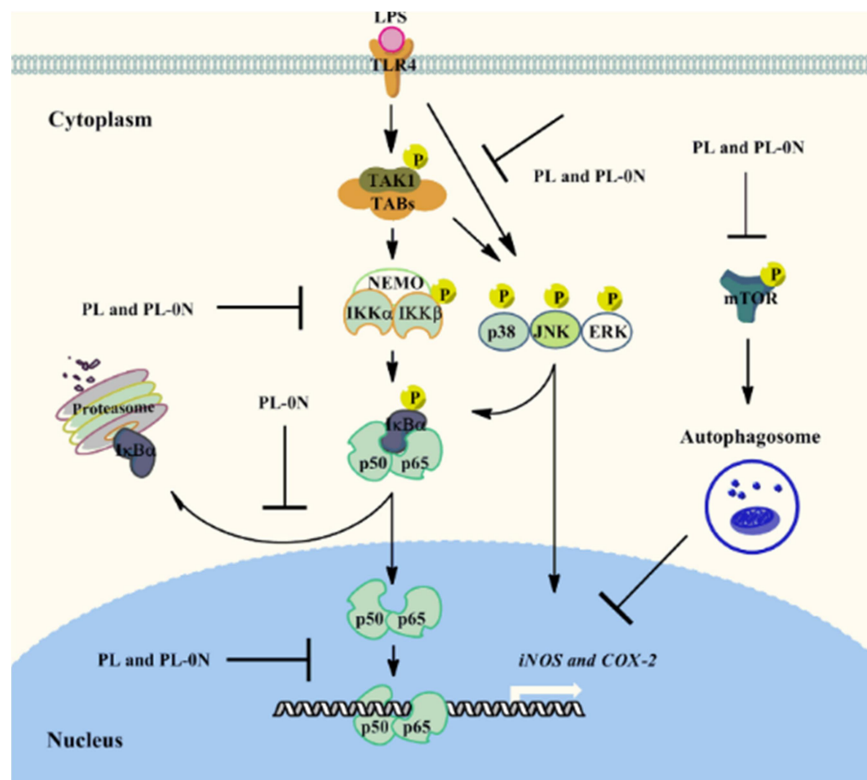
Estudos recentes a nível celular mostraram que a piperina tem a capacidade de inibir o processo de ativação da proteína NF- κ B induzido pela proteína IL-1 β (YING et al., 2013). Entretanto não existem estudos sobre a interação desta molécula ou de derivados com este alvo molecular.

1.4 Nuclear Factor – kappa B (NF- κ B)

O fator nuclear kappa B, é uma família constituída por cinco fatores de transcrição (p50, p52, c-Rel, p65 (RelA) and RelB) que participam da regulação de genes de proteínas relacionadas a vários processos celulares como: resposta inflamatória, crescimento celular e apoptose(KUMAR et al., 2004).

Estes fatores de transcrição são encontrados inativos no citoplasma de células não estimuladas na forma de homo/heterodimeros associados a proteínas inibidoras (I κ B α , I κ B β , I κ B γ)(EPINAT; GILMORE, 1999). Uma das formas de ativação destes fatores é pela estimulação dos receptores TRL4 com LPS (lipopolissacarídeos), o que desencadeia a cascata de ativação do heterodimero formado p65 e p50 por meio de consecutivas fosforilações (Figura 6).

Figura 6: Cascata de ativação do heterodímero p50/p65 em células estimuladas com LPS.



Fonte: (SUN et al., 2015)

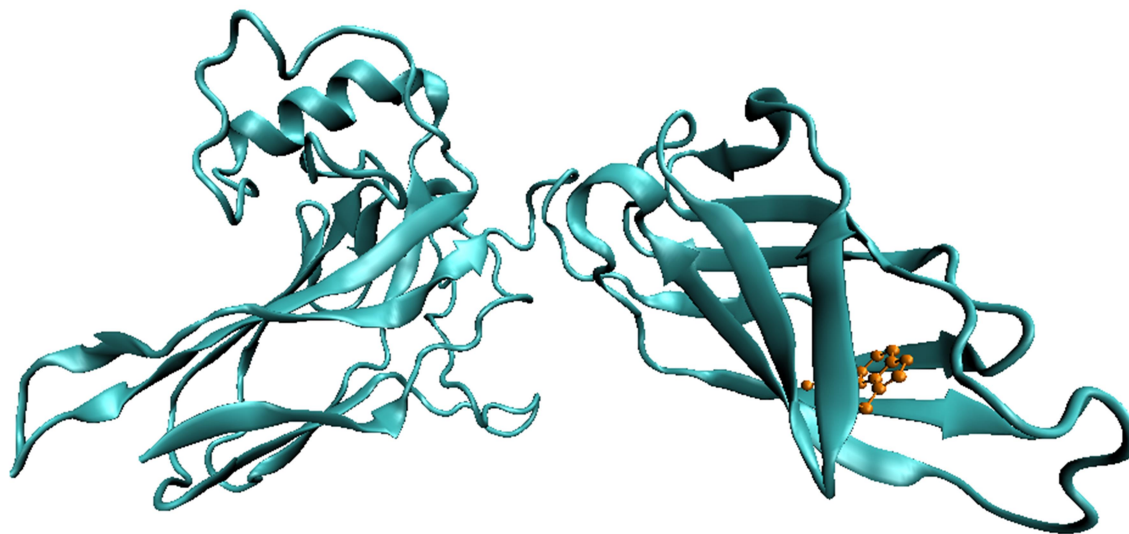
A ativação do complexo TAK-TAB, feita por meio de fosforilação, leva a fosforilação das IKKs, que são responsáveis pela fosforilação da proteína inibidora I κ B α . Uma vez fosforilada, a proteína I κ B α é degradada, permitindo que o heterodímero (p50/p65) se transloque para o

núcleo da célula e transcreva os genes de proteínas relacionadas aos processos celulares mencionados(EPINAT; GILMORE, 1999).

Entretanto, a ativação descontrolada desta proteína está envolvida na patogênese de várias inflamações crônicas como artrite reumatoide, asma e doença de Crohn(KUMAR et al., 2004). Por conta disso, atualmente existe uma procura por fármacos inibidores da ativação/atividade da NF- κ B.

A inibição da NF- κ B (Figura 7) pode ocorrer por meio de três mecanismos(EPINAT; GILMORE, 1999): o bloqueio do primeiro estágio, por meio da interação de fármacos com os receptores; o bloqueio de algum passo citoplasmático, como por exemplo, a interação de ligantes com as proteínas IKK, I κ B α ; e o bloqueio da atividade nuclear da NF- κ B, como por exemplo a inibição da interação NF- κ B – DNA.

Figura 7: Estrutura tridimensional da proteína NF- κ B (PDB 2O61) com o resíduo de triptofano em laranja.



Fonte: Autoria própria.

1.5 Albumina de soro de camundongo (RSA)

Além da importância de entender as interações entre os ligantes e as proteínas que participam de processos inflamatórios, entender as interações entre os ligantes e a albumina é de extrema importância, pois um dos mais importantes fatores que afetam a distribuição e a concentração ativa de muitos fármacos no organismo é a afinidade pela albumina.

Um grau moderado de afinidade por esta proteína é desejável, de maneira a solubilizar substâncias que de outro modo agregariam e seriam mal distribuídas. No caso oposto, os fármacos com alta afinidade pela proteína necessitariam de grandes doses para alcançar uma concentração efetiva *in vivo*, seriam lentamente distribuídos aos locais de ação e não poderiam ser eficientemente eliminados (GHUMAN et al., 2005; HE; CARTER, 1992).

Portanto, entender como esses fármacos se ligam à albumina (Figura 9) é de extremo interesse para a área farmacológica. Os modelos experimentais *in vivo* de anti-inflamatórios são realizados em camundongos e pouco se sabe sobre as interações medicamentosas com a albumina destes animais, tampouco sobre os sítios de ligação desta proteína.

A RSA possui 584 aminoácidos em sua estrutura com apenas um resíduo de triptofano (JAGODZINSKI et al., 1981). Como a RSA não possui estrutura tridimensional depositada no PDB, neste trabalho foi realizado uma modelagem comparativa para obtenção de um modelo tridimensional para esta proteína (ver seção 4.5). A RSA possui várias semelhanças com a HSA depositada no PDB (1AO6), como por exemplo, a alta similaridade (73%) da sequência primária (Figura 8).

Figura 8: Alinhamento de sequências da albumina de soro humano (HSA) e albumina de soro de rato (RSA) com 73% de similaridade. O asterisco indica as posições que possuem o resíduo conservado.

Dois pontos indica conservação entre grupos de propriedades semelhantes. O período indica a conservação entre grupos de propriedades pouco semelhantes.

```

HSA DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAPQYLQCCPFEDHVRLVNEVTEFAKTCVADESAAE 60
RSA EAHKSEIAHRFKDLGEOHFKGLVLIAPSOYLQRCPYEEHIRLVQEVDFAKTCVADENAE 60
:****:*****:.*:*****:****:***:****:*****:***
HSA NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNFNLRVLRPEV 120
RSA NCDKSIHTLFGDKLCAIPKLRDNYGELADCCAKQEPERNECFLOHKDDNFNLRPFQORPEA 120
****:*****:.*:.*:****:*****:*****:*****:****
HSA DVMCTAFHDNEETFLLKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAPTECCQAADKAAACLLP 180
RSA EAMCTSFQENPTSLGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEKYNEVLTCCTESDKAACLTP 180
:****:***:.*:****:*****:*****:****:****:*****
HSA KLDDELREDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDLTK 240
RSA KLDVAVKEKALVAAVRQRMKCSSMQRFGERAFKAWAVARMSQRFPNAEFAEITKLATDVTK 240
***:****:****:****:****:****:****:****:****:****:****:****:****
HSA VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECCCKPFLLEKSHCIAEVENDEMPA 300
RSA INKECCHGDLLECADDRADLAKYICENQATISSKLGACCDKPFVLQKSQLAEIEHDNIPA 300
:****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
HSA DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETLEKC 360
RSA DLPSIAADFVEDKEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKC 360
****:*****:.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
HSA CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVST 420
RSA CAEGDPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCELYEKLGEYGFQNAVLRVYTKKAPQVST 420
**:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*
HSA PTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTFVSDRVTKCCTES 480
RSA PTLVEAARNLGRVGTCKCCTLPEAQRPLPCVEDYLSAILNRLCVLHEKTFVSEKVTKCCSGS 480
*****:*****:****:****:****:****:****:****:****:****:****:****:
HSA LVNRRPCPSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKAT 540
RSA LVERRPCPSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPDKERQIKKQATALAELVKHKPKAT 540
*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
HSA KEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFABEKGKLVAAASQAALGL 585
RSA EDQLKTVMGDFAQFVDRCKCAADKDNCFATEGPNLVARSKAALA- 584
:****:****:****:****:****:****:****:****:****:****:****:****:

```

Fonte: Autoria própria

Além disto, as duas estruturas (RSA modelada e HSA) possuem alto grau de sobreposição (Figura 9), compartilhando o mesmo número de pontes dissulfeto (17 pontes), um grupo tiol Cys34, o Trp214 na mesma posição, além de possuir a alpha-hélice como estrutura secundária predominante da cadeia.

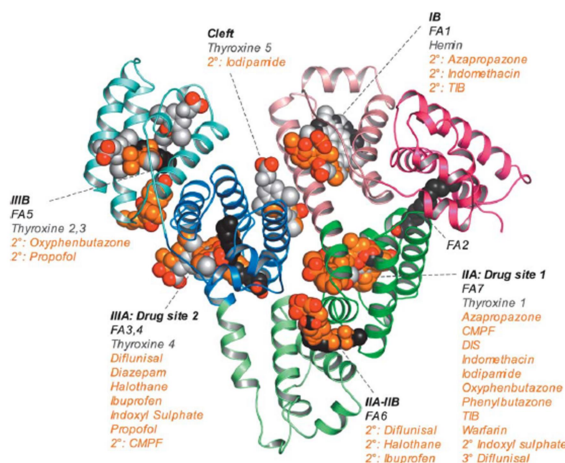
Figura 9: Alinhamento estrutural da RSA (em azul) e HSA 1AO6 (em vermelho). No estilo "ball and stick" está representado o TRP214 da RSA (em azul) e da HSA (em vermelho) sobrepostos.



Fonte: Autoria própria.

Devido a alta semelhança estrutural da RSA e HSA, pode-se fazer uma certa analogia de classificação estrutural dos domínios e sítios da HSA com a RSA. A HSA (1AO6) é dividida em três domínios (I, II e III), cada um contendo dois subdomínios (A e B)(SUGIO et al., 1999). Cada domínio possui características específicas que abrigam diferentes tipos de moléculas, como por exemplo no domínio IIA se ligam moléculas como varfarina e fenilbutazona, no domínio IIIA se ligam moléculas como diazepam e ibuprofeno, já no domínio IB se liga a hemina(GHUMAN et al., 2005).

Figura 10: Estrutura da HSA destacando os domínios, subdomínios e algumas moléculas que abrigam em sua estrutura.



Fonte:(GHUMAN et al., 2005)

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, a interação entre piperina e as proteínas NBD, IL-1 β e RSA foi investigada por meio de métodos experimentais e computacionais com base em Biofísica Molecular. Por meio das técnicas de fluorescência do estado estacionário e resolvida no tempo foi mostrado que houve formação dos complexos de forma espontânea entre as proteínas e a piperina, sendo a formação do complexo dirigido entropicamente para as proteínas NBD e IL-1 β e entálpicamente para a proteína RSA. Além disto, foi determinado que a piperina possui 2 sítios de interação no domínio NBD, 1 sítio na IL-1 β e 3 sítios na RSA, sendo as interações não específicas predominantes na interação da piperina com o NBD e a IL-1 β enquanto que as interações mais específicas predominam na interação da molécula com a RSA. Ainda em relação às técnicas de fluorescência, foi revelada cooperatividade positiva no modo de ligação da piperina no domínio NBD enquanto que para as outras proteínas não houve evidências de cooperatividade. Resultados de dicróismo circular evidenciaram mudanças estruturais da proteína NBD ao interagir com a piperina enquanto que não houve mudanças conformacionais significativas nas proteínas IL-1 β e RSA ao interagir com o produto natural. Modelagem computacional de docagem e dinâmica molecular revelaram os microambientes de interação com detalhamento das interações realizadas pelos aminoácidos dos sítios e das moléculas. Além disto, a modelagem mostrou que as moléculas inspiradas na estrutura da piperina possuem no geral maior afinidade pelos sítios de interação das proteínas inflamatórias (IL-1 β e NF- κ B), sendo estas moléculas promissoras no processo de inibição das proteínas. A metodologia, os dados e as análises apresentados neste trabalho foram publicados em forma de capítulo de livro e artigos científicos (POVINELLI; ZAZERI; CORNÉLIO, 2019; ZAZERI et al., 2019, 2020c, 2020b, 2020a) e poderão apoiar futuras pesquisas na área de descoberta de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

- ANAND N. Contribution of Ayurvedic medicine to medicinal chemistry. *In*: HANCH. C.; SAMMES, P. G.; TAYLOR, J. B. (ed.). **Comprehensive Medicinal Chemistry**. Pergamon Press: Oxford, 1990. p. 113-132.
- ANDREWS, Steven S.; TRETTON, James. Physical Principles of Circular Dichroism. **Journal of Chemical Education**, Washington, DC, v. 97, n. 12, p. 4370-4376, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c01061>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/toc/jceda8/97/12>. Acesso em: 14/07/2021.
- BODE, Brett M.; GORDON, Mark S. MacMolPlt: a graphical user interface for GAMESS. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, Philadelphia, v. 16, n. 3, p. 133–138, 1998.
- BORDBAR, A. K.; SABOURY, A. A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, Ali Akbar. The shapes of Scatchard plots for systems with two sets of binding sites. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, Hoboken, v. 24, n. 3, p. 172–175, July 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(95\)00122-0](https://doi.org/10.1016/0307-4412(95)00122-0). Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/0307-4412%2895%2900122-0>. Acesso em: 14/07/2021.
- BUJALOWSKI, Włodzimierz; JEZEWSKA, Maria J. Macromolecular competition titration method: accessing thermodynamics of the unmodified macromolecule–ligand interactions through spectroscopic titrations of fluorescent analogs. *In*: **Methods in Enzymology**. San Diego: Elsevier, v. 488. p. 17-57, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381268-1.00002-1>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123812681000021>. Acesso em: 14/07/2021.
- BUSSI, Giovanni; DONADIO, Davide; PARRINELLO, Michele. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, Melville, v. 126, n. 1, p. 14101, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.2408420>. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/pdf/10.1063/1.2408420>. Acesso em: 14/07/2021.
- CHEESEMAN, Matthew D.; WESTWOOD, Isaac M.; BARBEAU, Olivier; ROWLANDS, Martin; DOBSON, Sarah; JONES, Alan M.; JEGANATHAN, Fiona; BURKE, Rosemary; KADI, Nadia; WORKMAN, Paul; COLLINS, Ian; VAN MONTFORT, Rob L. M.; JONES, Keith. Exploiting protein conformational change to optimize adenosine-derived inhibitors of HSP70. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, DC, v. 59, n. 10, p. 4625-4636, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b02001>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jmedchem.5b02001>. Acesso em: 14/07/2021.
- CHEN, Yong-Qing; GHOSH, Sankar; GHOSH, Gourisankar. A novel DNA recognition mode by the NF- κ B p65 homodimer. **Nature Structural Biology**, New York, v. 5, n. 1, p. 67–73, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1038/nsb0198-67>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nsb0198-67>. Acesso em: 14/07/2021.
- CORRÊA, Daniel H. A.; RAMOS, Carlos H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, Sapele, v. 3, n. 5, p. 164-173, 2009. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJBR.9000245>. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJBR/article-abstract/15798EB10962>. Acesso em: 14/07/2021.
- COURNIA, Zoe; ALLEN, Bryce; SHERMAN, Woody. Relative binding free energy calculations in drug discovery: recent advances and practical considerations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, DC, v. 57, n. 12, p. 2911-2937, Dec. 2017. DOI: [10.1021/acs.jcim.7b00564](https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00564). Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jcim.7b00564>. Acesso em: 14/07/2021
- DE OLIVEIRA, Amanda Almeida; FAUSTINO, Josemar; DE LIMA, Maria Elena; MENEZES, Ronaldo; NUNES, Kenia Pedrosa. Unveiling the interplay between the TLR4/MD2 complex and HSP70 in the human cardiovascular system: a computational approach. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 13, p. 3121, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20133121>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/13/3121/pdf>. Acesso em: 14/07/2021.
- EPINAT, Jean-Charles; GILMORE, Thomas D. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF- κ B signal transduction pathway. **Oncogene**, London, v. 18, n. 49, p. 6896-6909, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203218>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1203218>. Acesso em: 14/07/2021.
- ESWAR, Narayanan, JOHN, Bino; MIRKOVIC, Nebojsa; FISER, Andras; ILYIN, Valentin; PIEPER, Ursula; STUART, Ashley; MARTI-RENOM, Marc; MADHUSUDHAN; YERKOVICH, Bozidar and SALI, Andrej. Tools for comparative protein structure modeling and analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 3375-3380, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkg543>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/31/13/3375/2904165?login=true>. Acesso em: 14/07/2021.

EVANS, Christopher G.; CHANG, Lyra; GESTWICKI, Jason E. Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, DC, v. 53, n. 12, p. 4585-4602, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm100054f>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jm100054f>. Acesso em:14/07/2021

GASTEIGER, Elisabeth; GATTIKER, Alexandre; HOOGLAND, Christine; IVANYI, Ivan; APPEL, Ron D.; BAIROCH, Amos. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 3784-3788, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/31/13/3784/2904185?login=true>. Acesso em:14/07/2021

GHUMAN, Jamie; ZUNSZAIN, Patricia A.; PETITPAS, Isabelle; BHATTACHARYA, Ananyo A.; OTAGIRI, Masaki; CURRY, Stephen. Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 353, n. 1, p. 38-52, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.075>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283605008855/pdf?md5=6ba937b0af46787bd196700eed3cb92f&pid=1-s2.0-S0022283605008855-main.pdf>. Acesso em:14/07/2021.

GORDON, Mark S.; SCHMIDT, Michael W. Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later. *In*: Dykstra, Clifford E. **Theory and Applications of Computational Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 1167-1189. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-044451719-7/50084-6>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444517197500846>. Acesso em:14/07/2021.

GRIFFITHS, David J. **Introduction to Quantum Mechanics**. 2nd. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2016.

HE, Xiao Min; CARTER, Daniel C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, London, v. 358, n. 6383, p. 209-215, 1992. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/358209a0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/358209a0>. Acesso em:14/07/2021.

HERTWIG, Roland H.; KOCH, Wolfram. On the parameterization of the local correlation functional. What is Becke-3-LYP? **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 268, n. 5-6, p. 345-351, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(97\)00207-8](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(97)00207-8). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261497002078>. Acesso em:14/07/2021.

HULINA, Andrea; RAJKOVIĆ, Marija Grdić; DESPOT, Daniela Jakšić; JELIĆ, Dubravko; DOJDER, Ana; ČEPELAK, Ivana; RUMORA, Lada. Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. **Cell Stress and Chaperones**, Dordrecht, v. 23, n. 3, p. 373-384, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0847-0>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12192-017-0847-0>. Acesso em:14/07/2021.

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, Philadelphia, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0263785596000185>. Acesso em:14/07/2021.

JAGODZINSKI, Linda L.; SARGENT, Thomas D.; YANG, Maria; GLACKIN, Carlotta; BONNER, James. Sequence homology between RNAs encoding rat alpha-fetoprotein and rat serum albumin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 78, n. 6, p. 3521-3525, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.78.6.3521>. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/78/6/3521.short>. Acesso em:14/07/2021.

JONES, Alan M.; WESTWOOD, Isaac M.; OSBORNE, James D.; MATTHEWS, Thomas P.; CHEESEMAN, Matthew D.; ROWLANDS, Martin G.; JEGANATHAN, Fiona; BURKE, Rosemary; LEE, Diane; KADI, Nadia; LIU, Manjuan; RICHARDS, Meirion; MCANDREW, Craig; YAHYA, Norhakim; DOBSON, Sarah E.; JONES, Keith; WORKMAN, Paul; COLLINS, Ian; VAN MONTFORT, Rob L. M. A fragment-based approach applied to a highly flexible target: Insights and challenges towards the inhibition of HSP70 isoforms. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 34701, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep34701>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep34701>. Acesso em:14/07/2021.

KARP, Gerald. **Biologia celular e molecular**: conceitos e experimentos., 3nd. ed. Barueri: Manole, 2005 .

KUMAR, Ashok; TAKADA, Yasunari; BORIEK, Aladin M.; AGGARWAL, Bharat B. Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. **Journal of Molecular Medicine**, Heidelberg, v. 82, n. 7, p. 434-448, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00109-004-0555-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-004-0555-y>. Acesso em:14/07/2021.

KUMAR, Shankar; ROSENBERG, John M.; BOUZIDA, Djamal; SWENDSEN, Robert H.; KOLLMAN, Peter A. Multidimensional free-energy calculations using the weighted histogram analysis method. **Journal of Computational Chemistry**, Hoboken, v. 16, n. 11, p. 1339-1350, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.540161104>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jcc.540161104>. Acesso em:14/07/2021.

KUMARI, Rashmi; KUMAR, Rajendra; CONSORTIUM, Open Source Drug Discovery; LYNN, Andrew. *g_mmpbsa-A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations*. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, DC, v. 54, n. 7, p. 1951-1962, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/ci500020m>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci500020m>. Acesso em:14/07/2021

LAKOWICZ, Joseph R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, n. 1, p. 631-677, 1988. DOI: 10.1146/annurev.ge.22.120188.003215. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215>. Acesso em:14/07/2021

MALDE, Alpeshkumar K.; ZUO, Le; BREEZE, Matthew; STROET, Martin; POGER, David; NAIR, Pramod C.; OOSTENBRINK, Chris; MARK, Alan E. An automated force field topology builder (ATB) and repository: version 1.0. **Journal of Chemical Theory and Computation**, Washington, DC, v. 7, n. 12, p. 4026-4037, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/ct200196m>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ct200196m>. Acesso em:14/07/2021 .

MATHEW, A.; SHEEJA, M. T. L.; KUMAR, A. T.; RADHA, K. Design, synthesis and biological evaluation of pyrazole analogues of natural piperine. **Hygeia: Journal for Drugs and Medicines**, Coimbatore, v. 3, n. 2, p. 48–56, Oct. 2011. DOI: Disponível em: <http://www.hygeiajournal.com/Downloads/8506201567.anny.pdf>. Acesso em:14/07/2021.

MEYER, T. N.; DA SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-42301999000200016> . Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/x4FXyTpwbnYmfwdwBHqkyz4d/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em:14/07/2021.

MORRIS, Garrett M.; HUEY, Ruth; LINDSTROM, William; SANNER, Michel F.; BELEW, Richard K.; GOODSSELL, David S.; OLSON, Arthur J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, Hoboken, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcc.21256>. Acesso em:14/07/2021.

OOSTENBRINK, Chris; VILLA, Alessandra; MARK, Alan E.; VAN GUNSTEREN, Wilfred F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, Hoboken, v. 25, n. 13, p. 1656–1676, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20090>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcc.20090>. Acesso em:14/07/2021.

PANNE, Daniel; MANIATIS, Tom; HARRISON, Stephen C. An atomic model of the interferon- β enhanceosome. **Cell**, Cambridge, v. 129, n. 6, p. 1111-1123, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.019>. Disponível em [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(07\)00656-3](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(07)00656-3). Acesso em:14/07/2021.

PARR, Robert G. Density functional theory of atoms and molecules. In: FUKUI, K.; PULLMAN, A. (ed.). **Horizons of Quantum Chemistry**. Dordrecht: Springer, 1980. p. 5-15. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-009-9027-2_2. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-9027-2_2. Acesso em:14/07/2021.

PARRINELLO, Michele; RAHMAN, Aneesur. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, Melville, v. 52, n. 12, p. 7182-7190, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.328693>. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/pdf/10.1063/1.328693>. Acesso em:14/07/2021.

PICARD, Capucine; CASANOVA, Jean-Laurent; PUEL, Anne. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I κ B α deficiency. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 24, n. 3, p. 490-497, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-11>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/CMR.00001-11>. Acesso em:14/07/2021.

POVINELLI, Ana Paula Ribeiro; ZAZERI, Gabriel; CORNÉLIO, Marinônio Lopes. Molecular Mechanism of Flavonoids Using Fluorescence Spectroscopy and Computational Tools. In: BADRIA, Farid A.; ANANGA, Anthony (ed.). **Flavonoids: A Coloring Model For Cheering Up Life**. London: IntechOpen, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.84480. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/flavonoids-a-coloring-model-for-cheering-up-life/molecular-mechanism-of-flavonoids-using-fluorescence-spectroscopy-and-computational-tools>. Acesso em:14/07/2021.

RITOSSA, Ferruccio. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 18, n. 12, p. 571-573, 1962 DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02172188>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02172188>. Acesso em:14/07/2021.

ROSS, Philip D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 20, n. 11, p. 3096-3102, 1981. DOI: 10.1021/bi00514a017. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00514a017>. Acesso em:14/07/2021.

RUBARTELLI, Anna; COZZOLINO, F.; TALIO, M.; SITIA, R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 9, n. 5, p. 1503-1510, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08268.x>. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/abs/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08268.x>. Acesso em:14/07/2021.

ŠALI, Andrej; BLUNDELL, Tom L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283683716268>. Acesso em:14/07/2021.

SCATCHARD, George. The attractions of proteins for small molecules and ions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Malden, v. 51, n. 4, p. 660-672, 1949. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1949.tb27297.x. Disponível em: <https://www.gwern.net/docs/biology/1949-scatthard.pdf>. Acesso em:14/07/2021.

SCHMID, Nathan; EICHENBERGER, Andreas P.; CHOUTKO, Alexandra; RINIKER, Sereina; WINGER, Moritz; MARK, Alan E.; VAN GUNSTEREN, Wilfred F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. **European Biophysics Journal**, Heidelberg, v. 40, n. 7, p. 843-856, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0700-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00249-011-0700-9>. Acesso em:14/07/2021.

SLATER, John C. A simplification of the Hartree-Fock method. **Physical Review**, College Park, v. 81, n. 3, p. 385, 1951. DOI: <https://doi.org/10.1103/PhysRev.81.385>. Disponível em: <https://journals.aps.org/pr/abstract/10.1103/PhysRev.81.385>. Acesso em:14/07/2021.

SOMENSI, Nauana; BRUM, Pedro Ozorio; DE MIRANDA RAMOS, Vitor; GASPAROTTO, Juciano; ZANOTTO-FILHO, Alfeu; ROSTIROLLA, Diana Carolina; DA SILVA MORRONE, Maurilio; MOREIRA, José Claudio Fonseca; GELAIN, Daniel Pens. Extracellular HSP70 activates ERK1/2, NF-kB and pro-inflammatory gene transcription through binding with RAGE in A549 human lung cancer cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, Duesseldorf, v. 42, n. 6, p. 2507-2522, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1159/000480213>. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/Abstract/480213>. Acesso em:14/07/2021.

SPACKMAN, Mark A. Potential derived charges using a geodesic point selection scheme. **Journal of Computational Chemistry**, Hoboken, v. 17, n. 1, p. 1-18, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19960115\)17:1<1::AID-JCC1>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19960115)17:1<1::AID-JCC1>3.0.CO;2-V). Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19960115\)17:1%3C1::AID-JCC1%3E3.0.CO;2-V](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1096-987X(19960115)17:1%3C1::AID-JCC1%3E3.0.CO;2-V). Acesso em:14/07/2021.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 47, n. 8, p. 735-748, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408390601062054>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10408390601062054?needAccess=true>. Acesso em:14/07/2021.

SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIZUKI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Engineering, Design and Selection**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 439-446, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1093/protein/12.6.439>. Disponível em: <https://academic.oup.com/peds/article/12/6/439/1487202>. Acesso em:14/07/2021

SUN, Lan-Di; WANG, Fu; DAI, Fang; WANG, Yi-Hua; LIN, Dong; ZHOU, Bo. Development and mechanism investigation of a new piperlongumine derivative as a potent anti-inflammatory agent. **Biochemical Pharmacology**, Philadelphia, v. 95, n. 3, p. 156-169, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.03.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295215001756>. Acesso em:14/07/2021

THOMFORD, Nicholas Ekow; SENTHEBANE, Dimakatso Alice; ROWE, Arielle; MUNRO, Daniella; SEELE, Palesa; MAROYI, Alfred; DZOBO, Kevin. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 6, p. 1578, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19061578>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/6/1578>. Acesso em:14/07/2021

TOMASI, Jacopo; MENNUCCI, Benedetta; CAMMI, Roberto. Quantum mechanical continuum solvation models. **Chemical reviews**, Washington, DC, v. 105, n. 8, p. 2999-3094, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr9904009>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cr9904009>. Acesso em:14/07/2021

VAN DER SPOEL, David; LINDAHL, Erik; HESS, Berk; GROENHOF, Gerrit; MARK, Alan E.; BERENDSEN, Herman J. C. GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, Hoboken, v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcc.20291>. Acesso em:14/07/2021

VAN HOLDE, Kensal Edward; JOHNSON, W. Curtis; HO, Pui Shing. **Principles of Physical Biochemistry**. 2nd. ed. New

Jersey: Pearson Prentice Hall, 2006.

WALLACE, Andrew C.; LASKOWSKI, Roman A.; THORNTON, Janet M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering, Design and Selection**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127>. Disponível em: <https://academic.oup.com/peds/article-abstract/8/2/127/1561050>. Acesso em: 14/07/2021.

WU, Yujie; TEPPER, Harald L.; VOTH, Gregory A. Flexible simple point-charge water model with improved liquid-state properties. **The Journal of Chemical Physics**, Melville, v. 124, n. 2, p. 24503, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.2136877>. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/pdf/10.1063/1.2136877>. Acesso em: 14/07/2021.

YING, Xiaozhou; CHEN, Xiaowei; CHENG, Shaowen; SHEN, Yue; PENG, Lei; ZI XU, Hua. Piperine inhibits IL- β induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte. **International immunopharmacology**, London, v. 17, n. 2, p. 293-299, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.025>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156757691300266X>. Acesso em: 14/07/2021.

ZAZERI, Gabriel; POVINELLI, Ana Paula Ribeiro; LIMA, Marcelo de Freitas; CORNÉLIO, Marinônio Lopes. Experimental approaches and computational modeling of rat serum albumin and its interaction with piperine. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 12, p. 2856, 2019. DOI: 10.3390/ijms20122856. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/12/2856>. Acesso em: 14/07/2021.

ZAZERI, Gabriel; POVINELLI, Ana Paula Ribeiro; DUFF, Cécile S. Le; TANG, Bridget; CORNELIO, Marinonio Lopes; JONES, Alan M. Synthesis and Spectroscopic Analysis of Piperine-and Piperlongumine-Inspired Natural Product Scaffolds and Their Molecular Docking with IL-1 β and NF- κ B Proteins. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 12, p. 2841, 2020a. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25122841>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/12/2841>. Acesso em: 14/07/2021

ZAZERI, Gabriel; POVINELLI, Ana Paula Ribeiro; LIMA, Marcelo de Freitas; CORNÉLIO, Marinônio Lopes. The Cytokine IL-1 β and Piperine Complex Surveyed by Experimental and Computational Molecular Biophysics. **Biomolecules**, Basel, v. 10, n. 9, p. 1337, 2020b. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10091337>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/9/1337>. Acesso em: 17/07/2021

ZAZERI, Gabriel; POVINELLI, Ana Paula Ribeiro; LIMA, Marcelo de Freitas; CORNÉLIO, Marinônio Lopes. Detailed Characterization of the Cooperative Binding of Piperine with Heat Shock Protein 70 by Molecular Biophysical Approaches. **Biomedicines**, Basel, v. 8, n. 12, p. 629, 2020c. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines8120629>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9059/8/12/629>. Acesso em: 17/07/2021