



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Ícaro Putinhon Caruso

**Estudo da Interação entre Flavonóides e a
Albumina do Soro Humano**

São José do Rio Preto - SP

2012

Ícaro Putinhon Caruso

**Estudo da Interação entre Flavonóides e a
Albumina do Soro Humano**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre 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”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio

São José do Rio Preto - SP
2012

Caruso, Ícaro Putinhon.

Estudo da interação entre flavonóides e a albumina do soro humano /

Ícaro Putinhon Caruso. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

67 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Marinônio Lopes Cornélio

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Biofísica molecular. 2. Flavonóides. 3. Albumina. 4. Albumina sérica. 5. Sangue – Proteínas. I. Cornélio, Marinônio Lopes. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.32

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Ícaro Putinhon Caruso

Estudo da Interação entre Flavonóides e a Albumina do Soro Humano

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre 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”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio
Professor Adjunto
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Hamilton Cabral
Professor Doutor
USP – Ribeirão Preto

Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto - SP, Maio de 2012

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe e aos meus avós, os quais sempre não mediram esforços para me auxiliar nos estudos.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marinônio Cornélio Lopes pela orientação na realização deste trabalho e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas por fornecer os flavonóides utilizados nesse projeto.

A todo o corpo docente do Departamento Física, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos amigos de laboratório pelas ajudas.

A minha família pelo apoio fundamental que sempre recebi.

A agência CNPq que, por meio de minha bolsa, apoiou o presente projeto.

*“If I have seen farther than others,
it is because I stood on the shoulders of giants.”*

— Sir Isaac Newton

Resumo

Os flavonóides são uma grande classe de polifenóis ocorrendo de forma natural amplamente distribuídos nas plantas, essas moléculas exibem algumas atividades farmacológicas importantes como anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena e antibacteriana. A interação entre os flavonóides Rutina (Ru) e Guaijaverina (Gua) e a Albumina do Soro Humano (HSA) em pH 7,0 fisiológico foi investigado usando a técnica de espectroscopia de fluorescência de estado estacionário, cálculo *ab initio* e de modelagem molecular. A partir da supressão de fluorescência da HSA pelos flavonóides, a constante de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}) e sua forma modificada (K_a) foram calculadas em 298, 303 e 308 K, como também os parâmetros termodinâmicos correspondentes ΔH , ΔG e ΔS , para cada flavonóide. A análise do equilíbrio de ligação foi utilizada para determinar os valores do número de sítios de ligação (n) e a constante de ligação (K_b) para a Rutina e a Guaijaverina em 298, 303 e 308 K. A distância média entre o doador (HSA-*Trp214*) e o aceitador (Ru e Gua) foi estimada de acordo com a teoria de transferência de energia ressonante fluorescente. A otimização geométrica dos flavonóides Rutina e Guaijaverina foi realizada nos seus estados fundamentais usando o funcional DFT/B3LYP *ab initio* com um conjunto de bases 6-31G(d,p) utilizado nos cálculos. O cálculo de modelagem molecular indica que os flavonóides se localizam no sítio I da HSA, dentro do bolso hidrofóbico do subdomínio IIA. Os resultados teóricos obtidos pela modelagem molecular corroboram com os dados de espectroscopia de fluorescência.

Abstract

Flavonoids are a large class of naturally occurring polyphenols widely distributed in plants, these molecules exhibit some important pharmacological activities like anti-inflammatory, antioxidant, anticancer, and antibacterial. The interaction between Rutin and Guaijaverin flavonoids and Human Serum Albumin (HSA) at physiological pH 7.0 was investigated by using the technique of fluorescence spectroscopy, *ab initio* and molecular modeling calculation. From the fluorescence quenching of the HSA by flavonoids, the Stern-Volmer quenching constant (K_{SV}) and its modified form (K_a) were calculated at 298, 303 and 308 K, as well as the corresponding thermodynamic parameters ΔH , ΔG and ΔS , for each flavonoid. Analysis of binding equilibria was utilized to determine the number of binding sites (n) and binding constants (K_b) values for Rutin and Guaijaverin at 298, 303 and 308 K. The average distance between donor (HSA-*Trp214*) and acceptor (Ru and Gua) was estimated according to the theory of fluorescence resonance energy transfer. The geometry optimization of Rutin and Guaijaverin flavonoids was performed in its ground state by using *ab initio* DFT/B3LYP functional with a 6-31G(d,p) basis set applied in calculations. Molecular modeling calculation indicated that the flavonoids are located in site I of HSA, within the hydrophobic pocket of the subdomain IIA. The theoretical results obtained by molecular modeling are corroborated by the fluorescence spectroscopy data.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura molecular básica dos flavonóides (1), isoflavonóides (2) e neoflavonóides (3) (GROTEWOLD, 2006)	8
Figura 2: As classes dos flavonóides diferem a partir do nível de oxidação e saturação do anel heterocíclico C (GROTEWOLD, 2006)	9
Figura 3: Desenho esquemático da estrutura secundária dos elementos e pontes dissulfeto da albumina humana. Os retângulos representam hélices, e as linhas finas representam voltas. As linhas grossas indicam as pontes dissulfeto (MINGHETTI et al., 1986)	11
Figura 4: Estrutura cristalina da HSA (código de entrada no PDB 1AO6) (SUGIO et al., 1999). O domínio I está em tons de azul (IA e IB), o domínio II em tons de vermelho (IIA a IIB) e o domínio III em tons de verde (IIIA e IIIB). O resíduo de triptofano <i>Trp214</i> está localizado no bolso hidrofóbico do subdomínio IIA da HSA	12
Figura 5: Estrutura química do flavonóide Rutina, o qual consiste da união flavonol Quercetina e o dissacarídeo Rutinose	14
Figura 6: Estrutura química do flavonóide Guaijaverina, o qual consiste da união do flavonol Quercetina e o sacarídeo Arabinose	15
Figura 7: Diagrama de Jablonsky. Esse esquema representa os níveis de energia eletrônicos singletes (S_0 , S_1 e S_2) e o triplete (T_1), e vibracionais (0, 1 e 2) de uma molécula. As setas dirigidas para cima indicam absorção de radiação ($h\nu_A$); as setas dirigidas para baixo, emissão de radiação ($h\nu_F$ e $h\nu_P$); setas pontilhadas, conversão interna	17
Figura 8: O campo de força avalia a ligação em dois passos. A ligante e a proteína iniciam em uma conformação não ligada. No primeiro passo, as energias intramoleculares são estimadas para a transição desses estados não ligados para a conformação do ligante e proteína no estado ligado. No segundo passo, avalia a energias intermoleculares de combinar o ligante e a proteína em sua conformação ligada	36
Figura 9: Espectro de emissão da HSA na presença de varias concentrações de Rutina (a) e Guaijaverina (b) ($T = 298\text{ K}$, $\lambda_{ex} = 295\text{ nm}$). $[HSA] = 4.0 \times 10^{-6}\text{ molL}^{-1}$; $[Ru]/(10^{-6}\text{ molL}^{-1})$, A-J: de 0 a 4,0; $[Gua]/(10^{-6}\text{ molL}^{-1})$, A-T: de 0 to 8,0, ambos com incremento de 0,4. As curvas pontilhadas mostram o espectro de emissão do tampão	45
Figura 10: Gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da HSA pela Rutina (a) e Guaijaverina (b) em 298, 303 e 308 K	46
Figura 11: Gráficos de Stern-Volmer modificados para a supressão de fluorescência da HSA pela Rutina (a) e Guaijaverina (b) em 298, 303 e 308 K ...	47
Figura 12: Gráficos de van't Hoff para o complexo HSA-flavonóides para as temperaturas de 298, 303 e 308 K	49

Figura 13: Gráficos duplo-log do efeito da supressão da Rutina (a) e da Guaijaverina (b) na fluorescência da HSA em 298, 303 e 308 K	52
Figura 14: Sobreposição espectral da emissão de Fluorescência da HSA (—A) com espectro de absorbância da Rutina (a, ----B) e o espectro de absorbância da Guaijaverina (b, ----B) ($[HSA] = [Ru] = [Gua] = 4.0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$)	53
Figura 15: Potencial eletrostático molecular da Rutina (a) e da Guaijaverina (b), regiões eletropositivas (azul) e eletronegativas (amarelo)	55
Figura 16: (a) Localização da molécula de Rutina próxima ao único resíduo de triptofano da HSA (<i>Trp214</i>) no subdomínio IIA (sítio I). (b) Detalhes estruturais da interação entre a HSA e a Rutina obtidos pelo método de modelagem molecular. A Rutina é representada utilizando o modelo de cilindros (C, cinza; O, vermelho; N, azul; H, branco), os resíduos de aminoácidos são denotados como modelo de <i>wireframe</i> e as pontes de hidrogênio representadas linhas pontilhadas verdes	58
Figura 17: (a) Localização da molécula de Guaijaverina próxima ao único resíduo de triptofano da HSA (<i>Trp214</i>) no subdomínio IIA (sítio I). (b) Detalhes estruturais da interação entre a HSA e a Guaijaverina obtidos pelo método de modelagem molecular. A Guaijaverina é representada utilizando o modelo de cilindros (C, cinza; O, vermelho; N, azul; H, branco), os resíduos de aminoácidos são denotados como modelo de <i>wireframe</i> e as pontes de hidrogênio representadas linhas pontilhadas verdes	60

Lista de Tabela

Tabela 1: Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}) e constate de supressão bimolecular (K_q) do complexo HSA-flavonóides em 298, 303 e 308 K	46
Tabela 2: Constantes de supressão efetiva para fluoróforo acessível (K_a) do complexo HSA-flavonóides em 298, 303 e 308 K	48
Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos do complexo HSA-flavonóides em 298, 303 e 308 K	50
Tabela 4: Constantes de ligação (K_b) e sítios de ligação (n) do complexo HSA-flavonóides em 298, 303 e 308 K	52
Tabela 5: Dados referentes aos cálculos de FRET em 298 K: integral de sobreposição (J), a energia de transferência (E), a distância crítica (R_0) e a distância média (r)	54
Tabela 6: Resíduos de aminoácidos da HSA e átomos dos flavonóides envolvidos nas pontes de hidrogênio obtidas dos cálculos de modelagem molecular	61

Lista de Abreviaturas

<i>Ala</i>	– Alanina
<i>Arg</i>	– Arginina
B3LYP	– Três parâmetros Becke com Lee-Yang-Parr
BSA	– <i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina do Soro Bovino)
CD	– <i>Circular Dichroism</i> (Dicroísmo Circular)
DFT	– <i>Density Functional Theory</i> (Teoria do Funcional de Densidade)
FRET	– <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> (Transferência de energia ressonante fluorescente)
FTIR	– <i>Fourier Transformed Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier)
GA	– <i>Genetic Algorithm</i> (Algoritmo Genético)
GGA	– <i>Generalized Gradient Approximation</i> (Aproximação de Gradiente Generalizado)
<i>Glu</i>	– Ácido Glutâmico
<i>Gln</i>	– Glutamina
<i>Gua</i>	– Guaijaverina
HOMO	– <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> (Orbital Molecular Mais Alto Ocupado)
HSA	– <i>Human Serum Albumin</i> (Albumina do Soro Humano)
LDA	– <i>Local Density Approximation</i> (Aproximação da Densidade Local)
<i>Leu</i>	– Leucina
LGA	– <i>Lamarckian Genetic Algorithm</i> (Algoritmo Genético Lamarckiano)
LS	– <i>Local Search</i> (Busca Local)
LUMO	– <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> (Orbital Molecular Mais Baixo Ocupado)
<i>Lys</i>	– Lisina
MEP	– <i>Molecular Electrostatic Potential</i> (Potencial Eletrostático Molecular)
NaCl	– Cloreto de Sódio
PDB	– <i>Protein Data Bank</i> (Banco de Dados de Proteína)
<i>Ru</i>	– Rutina
AS	– <i>Simulated Annealing</i>
SCF	– <i>Self-Consistent Field</i> (Campo autoconsistente)
<i>Ser</i>	– Serina
<i>Trp</i>	– Triptofano
<i>Tyr</i>	– Tirosina
UV-Vis	– <i>Ultraviolet-Visible</i> (Ultravioleta-Visível)
<i>Val</i>	– Valina
LCAO	– <i>Linear Combination of Atomic Orbitals</i> (Método de Combinação Linear de Orbitais Atômicos)

Sumário

1	Introdução	7
1.1	Flavonóides e Albumina do Soro Humano	7
1.2	Rutina	13
1.3	Guaijaverina	14
2	Objetivos	16
3	Fundamentos Teóricos	16
3.1	Absorção Óptica e Emissão de Fluorescência	16
3.2	Supressão de Fluorescência no Estado Estacionário	19
3.3	Termodinâmica da Interação de Proteína com Ligante	21
3.4	Equilíbrio de Ligação	22
3.5	Transferência de Energia Ressonante Fluorescente	23
3.6	Teoria do Orbital Molecular <i>Ab Initio</i>	24
3.6.1	Equação de Schrödinger Independente do Tempo	24
3.6.2	Aproximação de Born-Oppenheimer	25
3.6.3	Teoria de Hartree-Fock	27
3.6.4	Conjunto de Bases	29
3.6.5	Princípio Variacional	30
3.6.6	Teoria do Funcional de Densidade	31
3.7	Teoria da Modelagem Molecular	34
4	Materiais e Métodos	40
4.1	Materiais	40
4.2	Preparação das Soluções Estoques de Flavonóides e da HSA	40
4.3	Espectroscopia de Absorção UV-Vis	41
4.4	Supressão de Fluorescência no Estado Estacionário	41
4.5	Cálculos <i>Ab Initio</i>	42
4.6	Cálculos de Modelagem Molecular	43
5	Resultados e Discussões	44
5.1	Supressão de Fluorescência da HSA	44
5.2	Análise Termodinâmica da Interação entre os Flavonóides e a HSA	49
5.3	Análise de Equilíbrio de Ligação	51
5.4	Medidas das Distâncias entre a HSA- <i>Trp214</i> e os Flavonóides	53
5.5	Cálculos <i>Ab Initio</i>	54
5.6	Cálculos de Modelagem Molecular	56
6	Conclusão	62
7	Referências Bibliográficas	63

1 Introdução

1.1 Flavonóides e Albumina do Soro Humano

A primeira sugestão de uma substância natural que seria reconhecida eventualmente como flavonóide foi atribuída a Nehemiah Grew no século XVII. Em artigos de leitura para a *Royal Society* em Londres, Grew discutia as diferenças nas propriedades de solubilidade de pigmentos de plantas, nos quais alguns eram solúveis em óleo e outros em água. (BOHM, 1998).

Os flavonóides são compostos que ocorrem naturalmente em todas as plantas. Visualmente, eles são reconhecidos como os responsáveis pela explosão de tonalidades outonal e muitos tons de amarelo, laranja e vermelho nas flores. Os flavonóides são encontrados nas frutas, vegetais, nozes, sementes, ervas, caules, flores, chá e vinho tinto. Eles têm efeitos importantes na bioquímica e fisiologia das plantas, agindo como antioxidantes, inibidores de enzimas, precursores de substâncias tóxicas e pigmentos. Em adição, os flavonóides estão envolvidos na fotossensibilização e transferência de energia, ações de hormônios de crescimento de planta e reguladores de crescimento, controle de respiração, fotossíntese, morfogênese, determinação de sexo e defesa contra infecções (MIDDLETON et al., 2000).

O termo “flavonóide” é usado geralmente para descrever uma ampla coleção de produtos naturais que incluem um esqueleto de carbono C₆ – C₃ – C₆, ou mais especificamente uma funcionalidade fenil-benzopirano. Dependendo da posição da ligação do anel aromático à porção benzopirano, este grupo de produtos naturais pode ser dividido em três classes: os flavonóides (2-fenil-benzopiranos) (1), os isoflavonóides (3-benzopiranos) (2) e os neoflavonóides (4-benzopiranos) (3), como mostrado na

Figura 1. Esses grupos formam geralmente um precursor calcona comum e, portanto, são relacionados biogeneticamente e estruturalmente (GROTEWOLD, 2006).

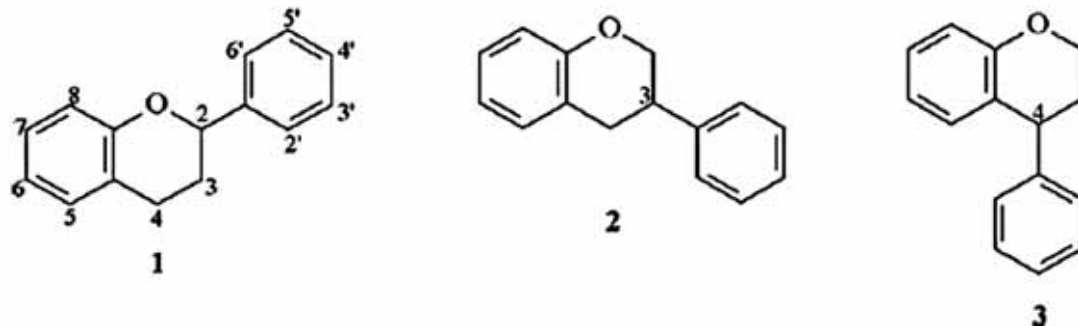


Figura 1: Estrutura molecular básica dos flavonóides (1), isoflavonóides (2) e neoflavonóides (3) (GROTEWOLD, 2006).

As várias classes de flavonóides diferem quanto ao nível de oxidação e saturação presente no anel heterocíclico C, enquanto que compostos individuais dentro de uma classe diferem no padrão de substituição dos anéis A e B, tais como: substituintes hidroxilas (OH) e óxidos de metal (OMe), glicosilações e acilações (GROTEWOLD, 2006; ANDERSEN et al., 2006). Dentre as várias classes de flavonóides, podem-se citar as flavonas, flavanonas, flavonóis e flavanóis (flavan-3-ol, flavan-4-ol e flavan-3,4-diol), cujas estruturas moleculares estão representadas na Figura 2 (GROTEWOLD, 2006).

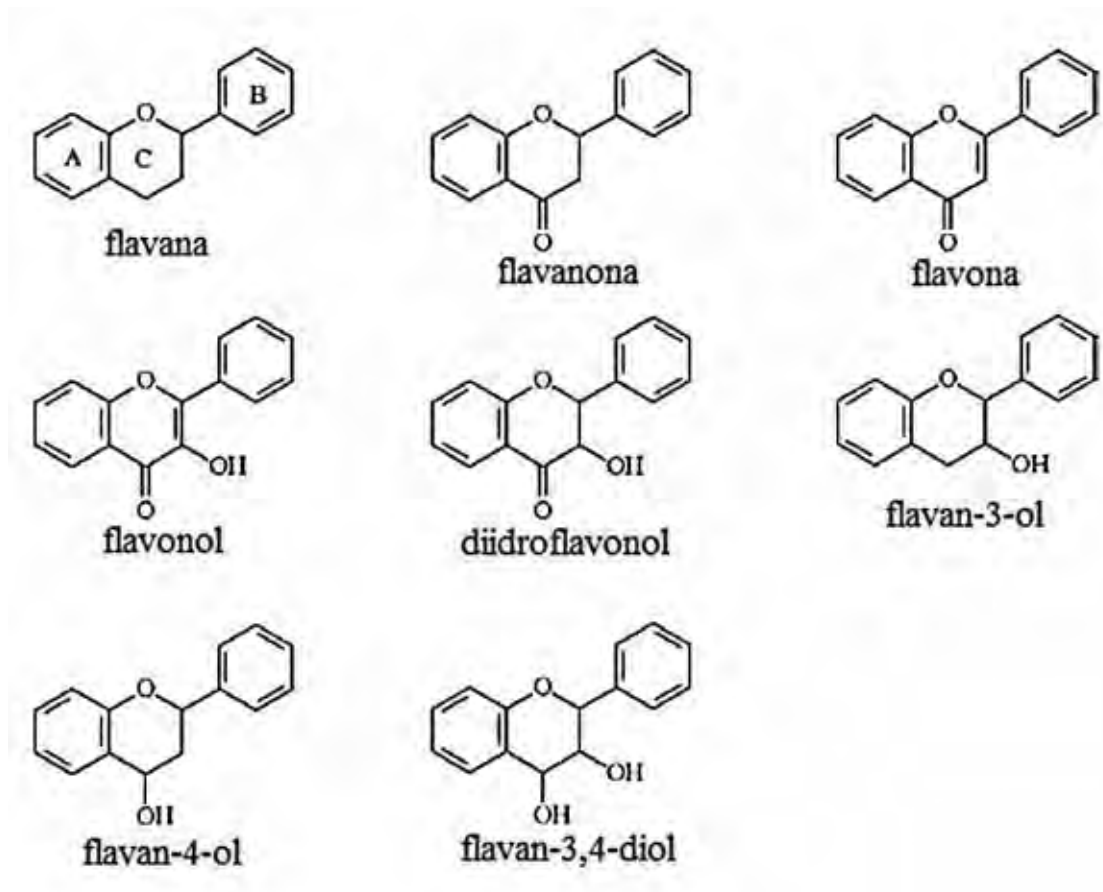


Figura 2: As classes dos flavonóides diferem a partir do nível de oxidação e saturação do anel heterocíclico C (GROTEWOLD, 2006).

Em adição ao seu importante papel biológico nas plantas e interações entre plantas e insetos, os flavonóides têm sido cuidadosamente investigados durante as últimas décadas devido a seus possíveis efeitos na saúde humana via uma dieta rica em produtos de plantas (ANDERSEN et al., 2006). Suas propriedades farmacológicas e bioquímicas incluem: atividade anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena, antibacteriana, antiplaquetária, antiviral e de proteção contra doenças cardiovasculares (COOK et al., 1996; MIDDLETON et al., 2000; HAVSTEEN, 2002; FERGUSON, 2001). Os flavonóides também são responsáveis pela inibição de varias enzimas, tais como: hidrolases, oxidoredutases, DNA sintetases, RNA polimerases, fosfatases, proteína

fosfoquinases e oxidases de aminoácido (HARBORNE et al., 2000; HAVSTEEN, 2002; ROSS et al., 2002, CUSHNIE, et al., 2005).

Devido à tendência intrínseca dos núcleos fenólicos em desenvolverem interações moleculares, não é surpresa que um dos grandes alvos de estudos da comunidade científica seja o estudo da interação dos flavonóides com proteínas. Dentre as proteínas estudadas, as albuminas merecem destaque em vista a suas importâncias no transporte de uma grande quantidade de substância via plasma sanguíneo. Estudos de interação da Albumina do Soro Humano (*Human Serum Albumin* – HSA) e Bovina (*Bovine Serum Albumin* – BSA) com flavonóides (DUFOUR et al., 2005; KANAKIS et AL., 2006; LIU et al., 2010) sugerem que esse compostos também seriam transportados por essas proteínas, para que desse modo, os flavonóides possam desempenhar suas atividades.

As albuminas são provavelmente as mais conhecidas e mais estudadas de todas as proteínas. Suas diversidades de funções têm atraído o interesse de cientistas por gerações (PETERS, 1996). A Albumina do Soro Humano (HSA) é a proteína mais abundante (40 mg/ml) no plasma sanguíneo. Esta proteína é composta por uma única cadeia polipeptídica não glicosilada contendo em sua seqüência 585 resíduos de aminoácidos (66 kDa), a qual se divide em três domínios (I, II e III), cada um contendo dois subdomínios (A e B), como visto na Figura 3.

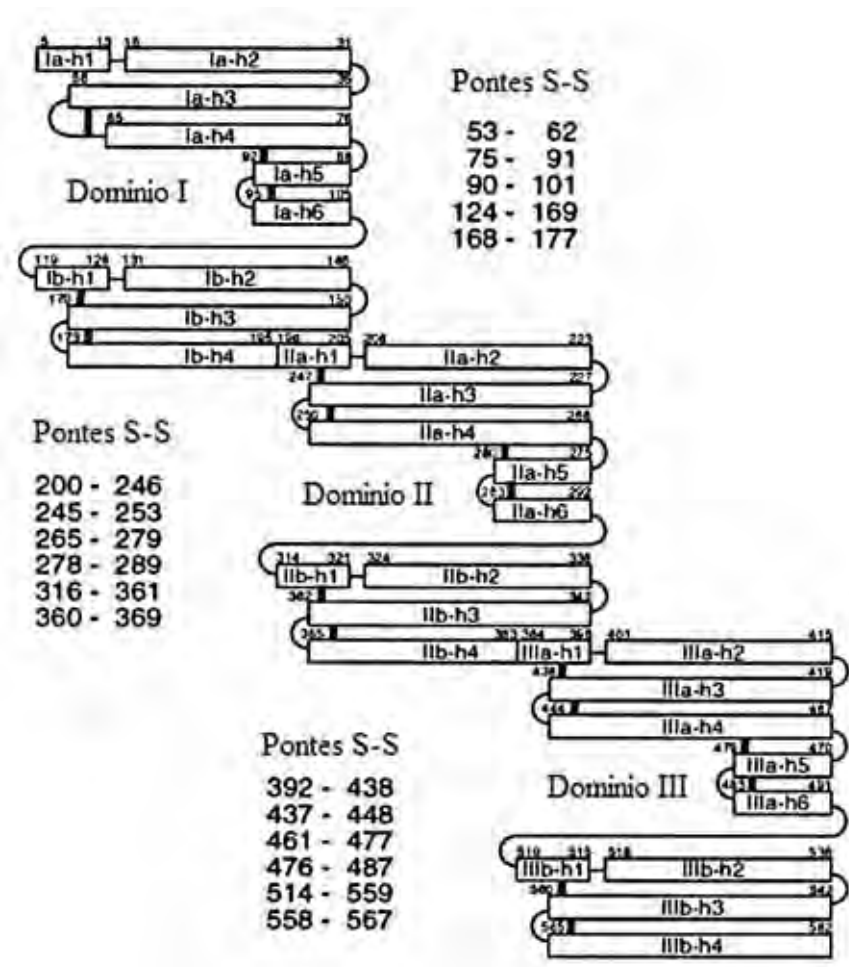


Figura 3: Desenho esquemático da estrutura secundária dos elementos e pontes dissulfeto da albumina humana. Os retângulos representam hélices, e as linhas finas representam voltas. As linhas grossas indicam as pontes dissulfeto (MINGHETTI et al., 1986).

Cada domínio contém dez hélices α e são divididos por seis hélices geometricamente antiparalelas, formando os subdomínios com quatro hélices cada. A estrutura terciária da HSA representada na Figura 4 é estabilizada por 17 pontes de dissulfeto, estando assinaladas na Figura 3 (GHUMAN et al., 2005).

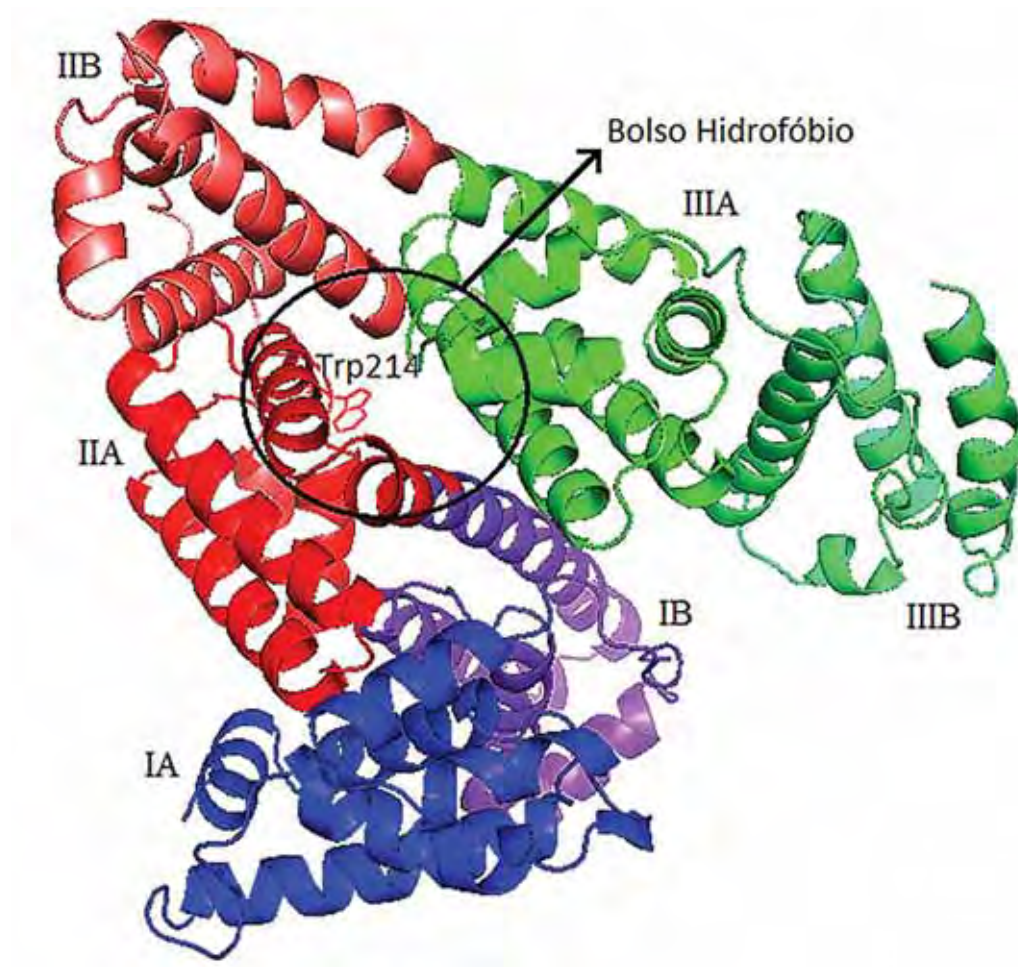


Figura 4: Estrutura cristalina da HSA (código de entrada no PDB 1AO6) (SUGIO et al., 1999). O domínio I está em tons de azul (IA e IB), o domínio II em tons de vermelho (IIA a IIB) e o domínio III em tons de verde (IIIA e IIIB). O resíduo de triptofano *Trp214* está localizado no bolso hidrofóbico do subdomínio IIA da HSA.

A HSA desempenha um importante papel no transporte e disposição de ligantes endógenos (ácidos graxos não esterificados, bilirrubina e composto lipofílicos) e exógenos presentes (flavonóides, varfarina e diazepam) no sangue. Devido a essa sua surpreendente capacidade de ligação a uma grande variedade de moléculas, a HSA apresenta um papel preponderante na farmacocinética e farmacodinâmica de drogas (SUDLOW et al., 1975; SUDLOW et al., 1976; GHUMAN et al., 2005). O que também faz da HSA, uma proteína modelo para o estudo de interações proteína-ligante.

Estudos mostram que a interação entre a HSA e ligantes aromáticos e heterocíclicos acontece dentro de dois bolsos hidrofóbicos dos subdomínios IIA e IIIA, nomeados de sítio I e II, respectivamente (SUDLOW et al., 1975; SUDLOW et al., 1976). Experimentos de espectroscopia de fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo, espectroscopia de absorção UV-Vis (*Ultraviolet-Visible*), dicroísmo circular (*Circular Dichroism* – CD), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – FTIR) e cálculos de modelagem molecular demonstram que flavonóides, tais como: quercetina, kaempferol, luteolina, catequina, naringina, naringenina e genisteína (ZSILA et al., 2003; DUFOUR et al., 2005; MISHRA et al., 2005; ZHANG et al., 2008; JURASEKOVA et al., 2009; BOLLI et al., 2010), ligam-se próximo ao Trp214 (ver Figura 4) que se localiza dentro do bolso hidrofóbico no subdomínio IIA da HSA (sítio I) e causam mudanças conformacionais na estrutura dessa albumina, formando complexos com constantes de ligação da ordem de 10^4 a $10^5 M^{-1}$.

Devido às numerosas atividades benéficas a saúde humana que os flavonóides desempenham como mencionadas previamente é de suma importância a descrição das interações desses compostos polifenólicos com a HSA em nível molecular, visto que essa é a principal proteína transportadora humana e, provavelmente, a responsável por disponibilizar os flavonóides para suas atividades fins.

1.2 Rutina

A Rutina (Quercetina-3-*O*- α -L-Rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucopiranosídeo) é um flavonol glicosilado consistindo do flavonol Quercetina e o dissacarídeo Rutinose (α -L-Rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucopiranosídeo), como mostrado na Figura 5. A

Rutina (Ru) é encontrada, por exemplo, chá preto, casca da maçã, trigo e aspargo (FABJAN et al., 2003; WANG et al., 2003; PASTUKHOV et al., 2007).

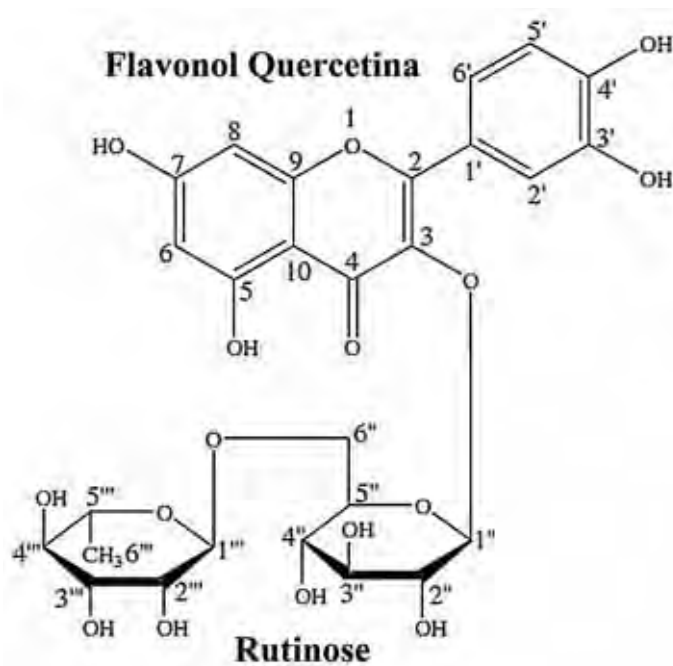


Figura 5: Estrutura química do flavonóide Rutina, o qual consiste da união flavonol Quercetina e o dissacarídeo Rutinose.

Como outros flavonóides, a Rutina também apresenta muitas das atividades benéficas à saúde humana mencionadas previamente e sendo um flavonóide abundante na dieta e com isso pode afetar vários processos no corpo humano, tais como: atividade antiplaquetária (SHEU et al., 2004; YANG et al., 2008) e antioxidante.

1.3 Guaijaverina

A Guaijaverina (Quercetina-3-O- α -L-Arabinopiranosídeo) é um flavonol glicosilado consistindo do flavonol Quercetina e do sacarídeo Arabinose (α -L-Arabinopiranosídeo), como mostra a Figura 6. A Guaijaverina (Gua) é encontrada como, por exemplo, na goiaba (*Psidium guajava* L.), Velame-do-Mato (*Croton campestris* St. Hill.) e Lady's

Mantle (*Alchemilla xanthochlora* Rothm.) (EL KHADEM et al., 1958; FRAISSE et al., 2000; SANTOS et al., 2005).

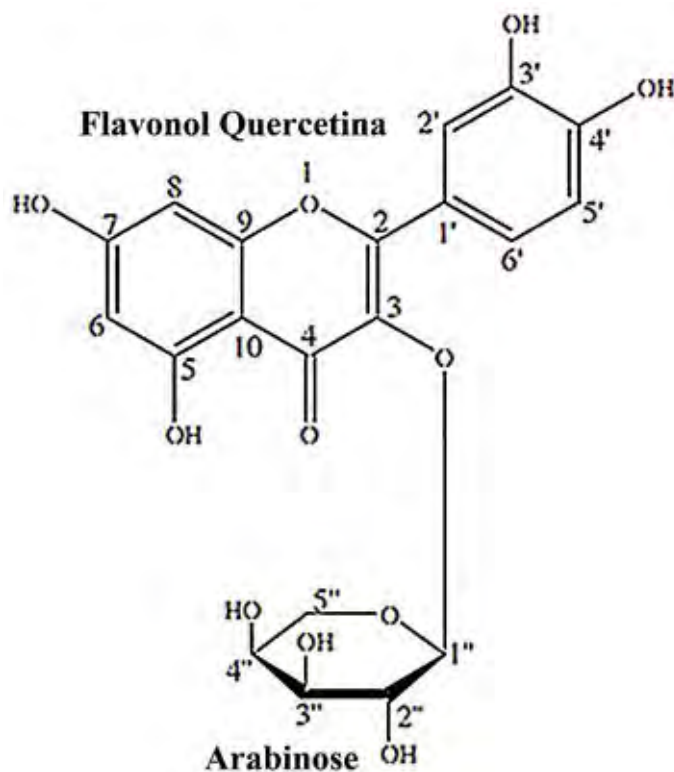


Figura 6: Estrutura química do flavonóide Guajaverina, o qual consiste da união do flavonol Quercetina e o sacarídeo Arabinose.

A Guajaverina assim como outros flavonóides pode apresentar algumas das atividades mencionadas previamente que trazem benefícios à saúde humana e, dessa forma, podem afetar alguns processos no corpo humano, tais como: atividade antibacteriana (JIMÉNEZ-ESCRIG et AL., 2001; PRABU et AL., 2006) e antioxidante.

2 Objetivos

O objetivo principal desse trabalho é caracterizar a interação entre os flavonóides Rutina e Guaijaverina com a Albumina do Soro Humano em nível molecular. Os estudos consistem de uma abordagem experimental e outra teórica, a primeira utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência no estado estacionário e a segunda, cálculos *ab initio* e de modelagem molecular.

3 Fundamentos Teóricos

3.1 Absorção Óptica e Emissão de Fluorescência

No processo de absorção óptica da radiação eletromagnética por átomos ou moléculas, segundo a mecânica quântica, a energia absorvida (E) é relacionada com a frequência da radiação (ν), essa relação é dada por:

$$E = h\nu \quad (1)$$

sendo h a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} J s$), dessa forma, impõem-se a radiação eletromagnética um aspecto corpuscular. Outra exigência da mecânica quântica diz respeito ao aspecto ondulatório da matéria, no qual os níveis de energia dos átomos ou moléculas devem assumir valores discretos. Para átomos no estado elementar, a energia de um dado estado provém do movimento dos elétrons em torno do núcleo positivamente carregado. Como consequência os vários estados energéticos são chamados de estados eletrônicos. Além de apresentarem estados eletrônicos, as moléculas também apresentam estados vibracionais quantizados, os quais estão associados à energia das vibrações interatômicas, e estados rotacionais quantizados, que provêm da rotação das moléculas em torno de seus centros de gravidade. As transições entre níveis eletrônicos ocorrem na região do ultravioleta e visível do espectro

eletromagnético; as transições entre os níveis vibracionais dentro do mesmo nível eletrônico, no infravermelho próximo e médio; e as transições entre níveis rotacionais próximos, nas regiões do infravermelho distante e de micro-ondas (EWING, 1972; SKOOG et al., 2002).

A absorção de radiação eletromagnética em forma de fótons por átomos ou moléculas ocorre em tempos da ordem de 10^{-15} segundos, a energia ganha durante o processo de absorção de um fóton, promove-os para seus estados eletrônicos mais energéticos (S_1 e S_2). Entretanto os átomos ou moléculas não permanecem em seus estados eletrônicos excitados, visto que a energia absorvida é perdida ou degradada através de vários tipos de mecanismos (ver Figura 7), fazendo com que eles retornem aos seus estados fundamentais (S_0) (LAKOWICZ, 1999; SKOOG et al., 2002).

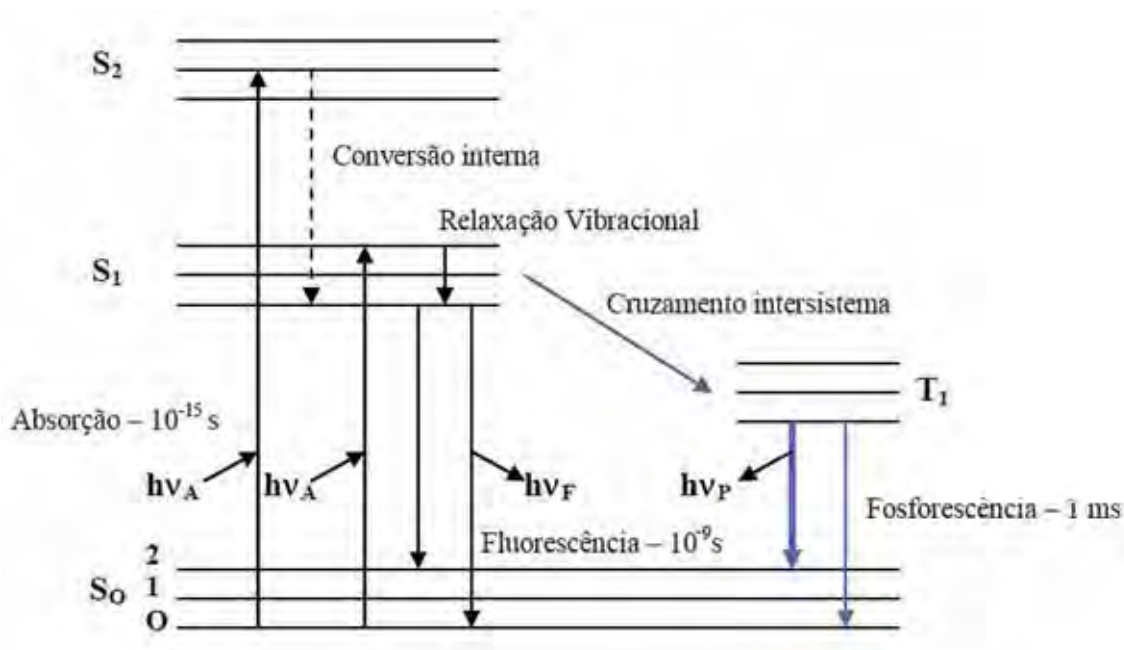


Figura 7: Diagrama de Jablonsky. Esse esquema representa os níveis de energia eletrônicos singletes (S_0 , S_1 e S_2) e o tripleto (T_1), e vibracionais (0, 1 e 2) de uma molécula. As setas dirigidas para cima indicam absorção de radiação ($h\nu_A$); as setas dirigidas para baixo, emissão de radiação ($h\nu_F$ e $h\nu_P$); setas pontilhadas, conversão interna.

Quando uma molécula é excitada ao seu nível eletrônico singlete de maior energia S_1 ou S_2 , isso a permite acessar níveis vibracionais e rotacionais de maiores energias. Com a relaxação para níveis vibracionais e rotacionais de menor energia, dentro do mesmo nível eletrônico singlete S_1 ou S_2 para o qual a molécula foi excitada, parte da energia absorvida na excitação dá origem ao processo denominado de **Relaxação Vibracional** (ver Figura 7), com um tempo de duração característico da ordem de 10^{-12} segundos. Como o tempo de vida de um estado eletrônico excitado é da ordem de 10^{-8} segundos, o restante da energia absorvida no processo de excitação é então irradiado para que a molécula volte ao seu estado fundamental, esse é o fenômeno chamado **Fluorescência** (ver Figura 7). O processo de relaxação vibracional se completa antes da emissão de fluorescência. A radiação emitida apresenta menor energia por fóton que a radiação excitante e, portanto, possui um maior comprimento de onda (LAKOWICZ, 1999; SKOOG et al., 2002).

O processo de relaxação entre nível eletrônicos excitados é denominado de **Conversão Interna** (LAKOWICZ, 1999; SKOOG et al., 2002).

O **Cruzamento Intersistema** é uma transição não radiativa entre dois níveis vibracionais isoenergéticos pertencentes a estados eletrônicos com diferentes multiplicidades. Moléculas no estado S_1 podem experimentar uma conversão de spin para o primeiro estado tripleto, T_1 . As transições para o estado fundamental (singlete), a partir de um estado tripleto (T_1) dão origem ao fenômeno da **Fosforescência**, envolvendo tempos de até milissegundos (ver Figura 7) (EWING, 1972; LAKOWICZ, 1999; SKOOG et al., 2002).

3.2 Supressão de Fluorescência no Estado Estacionário

A fluorescência de supressão se refere a qualquer processo no qual diminui a intensidade de fluorescência de uma amostra. Há uma variedade de interações moleculares que pode resultar em supressão, incluindo reações de estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo de estado fundamental e supressão colisional. Os diferentes mecanismos de supressão são geralmente classificados como supressão estática ou dinâmica (ou colisional). Supressão estática e dinâmica pode ser distinguida pelas suas diferentes dependências com a temperatura e viscosidade ou preferencialmente pela medida do tempo de vida de fluorescência (LAKOWICZ, 1999).

A supressão de fluorescência pode ser analisada de acordo com a equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (1)$$

sendo que, F_0 e F denota a intensidade de fluorescência de estado estacionário na ausência e na presença do supressor (Q), respectivamente; K_q é a constante de supressão bimolecular; τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor; $[Q]$ é a concentração do supressor e K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer. Os dados relativos à supressão são usualmente representados como um gráfico de F_0/F versus $[Q]$. A razão disso é porque se espera que F_0/F tenha uma dependência linear com a concentração do supressor. Dessa forma, a partir de um ajuste linear dos dados de supressão a inclinação da reta ajustada fornece o valor da constante de Stern-Volmer e o ordenada deve assumir um valor próximo de um (LAKOWICZ, 1999).

A supressão dinâmica ou colisional ocorre quando o fluoróforo do estado excitado é desativado após o contato com alguma molécula supressora. Nesse caso, o fluoróforo retorna ao estado fundamental durante um eventual encontro com o supressor. As moléculas não são alteradas quimicamente no processo de supressão colisional. Já a supressão estática ocorre quando o fluoróforo forma um complexo não fluorescente com o supressor. Quando esse complexo absorve luz, ele retorna a seu estado fundamental sem emissão de um fóton.

Uma maneira eficiente de diferenciar se o mecanismo de supressão é do tipo estático ou colisional, consiste em variar a temperatura. Se com o aumento da temperatura os valores de K_{SV} aumentar, se trata de supressão dinâmica, mas se esses valores diminuírem, se trata de supressão estática. A supressão estática remove uma fração dos fluoróforos da observação. Os fluoróforos que formam complexos não são fluorescentes; nesse caso, a única fluorescência observada é a dos fluoróforos não complexados.

♦ Equação de Stern-Volmer Modificada

Os dados de supressão de fluorescência também podem ser analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer modificada:

$$\Delta F = F_0 f_a \left(\frac{K_a [Q]}{1 + K_a [Q]} \right) \quad (2)$$

Rearranjando a equação 2, tem-se a seguinte equação:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (3)$$

sendo ΔF a diferença na intensidade de fluorescência de estado estacionário na ausência e na presença de supressor em concentração $[Q]$, f_a é a fração de

fluorescência acessível e K_a é a constante de supressão efetiva para fluoróforos acessíveis. A dependência de $F_0/\Delta F$ como o valor recíproco da concentração do supressor $[Q]^{-1}$ é linear com a inclinação igual ao valor de $(f_a K_a)^{-1}$. O valor de f_a^{-1} é fixado na ordenada. A constante K_a é a divisão da ordenada pela inclinação da reta (LAKOWICZ, 1999).

3.3 Termodinâmica da Interação de Proteína com Ligante

A força de interação entre ligantes e proteínas pode incluir interações eletrostáticas, múltiplas pontes de hidrogênio, interações de van der Waals, contatos estéricos e hidrofóbicos dentro de sítio de ligação de anticorpos e etc (LECKBAND et al., 2000). Com vistas a elucidar a interação entre proteínas e fármacos, os parâmetros termodinâmicos podem ser calculados a partir do gráfico de van't Hoff.

Se a variação de entalpia (ΔH) não variar significativamente no intervalo de temperatura estudado, ambas as variações entálpicas (ΔH) e entrópicas (ΔS) poderão ser avaliadas pela equação de van't Hoff:

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4)$$

onde R é a constante universal do gases ideais ($8,31 J mol^{-1} K^{-1}$) e K_a é análogo a constante de supressão efetiva para fluoróforo acessível na temperatura (T) correspondente. Os valores de ΔH e ΔS serão obtidos da inclinação e da ordenada, respectivamente, da relação de van't Hoff, enquanto que, a correspondente variação na energia livre de Gibbs (ΔG) será calculada a partir da seguinte relação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

3.4 Equilíbrio de Ligação

Para os casos nos quais o mecanismo de supressão de fluorescência é estático, se há sítios de ligação independentes para um conjunto de sítios equivalentes em uma proteína. A reação é (BI et al., 2004):



sendo P a proteína, D a molécula de ligante e $D_n P$ a molécula do novo complexo cuja constante de ligação é K_b , a qual é dada por:

$$K_b = \frac{[D_n P]}{[D_f]^n [P_f]} \quad (7)$$

sendo $[D_n P]$ a concentração do novo complexo, $[D_f]$ a concentração de ligante livre, n o número de sítios de ligação, $[P_f]$ a concentração de proteína livre, $[P_b]$ a concentração de proteína ligada. Se a concentração total de proteína é $[P_t]$, então $[P_t] = [P_f] + [P_b]$. Por isso

$$K_b = \frac{([P_f] + [P_b])}{[D_f]^n [P_f]} \quad (8)$$

No processo de supressão estática, a intensidade de fluorescência para o sistema fluorescente é diretamente proporcional à concentração de proteína livre $[P_f]$ (o complexo formado é não fluorescente). Dessa forma:

$$\frac{[P_f]}{[P_t]} = \frac{F}{F_0} \quad (9)$$

Por isso, a equação para a supressão estática é:

$$\log \left[\frac{(F_0 - F)}{F} \right] = \log K_b + n \log [Q] \quad (10)$$

sendo K_b a constante de ligação para um sítio. A dependência do $\log[(F_0 - F)/F]$ no valor do $\log[Q]$ é linear, com a inclinação igual ao valor de n e o valor de $\log[K_b]$ fixado na ordenada (BI et al., 2004; LIU et al., 2010).

3.5 Transferência de Energia Ressonante Fluorescente

A transferência de energia ressonante de fluorescência (*Fluorescence Resonance Energy Transfer* – FRET) é um método de espectroscopia que pode monitorar as proximidades e orientação angular relativa do fluoróforos. O fluoróforo doador e aceitador podem ser completamente separados ou ligados a uma mesma molécula. De acordo com a teoria de transferência de energia não radiativa de Förster, a transferência de energia acontecerá sob as seguintes condições: o doador pode produzir luz fluorescente; o espectro de emissão de fluorescência do doador e o espectro de absorvância do aceitador têm sobreposição parcial; a distância entre o doador e o aceitador é menor do que aproximadamente 8,0 nm (FÖRSTER, 1948; LAKOWICZ, 1999). De acordo com essa teoria, a distância r entre o doador e o aceitador pode ser calculada pela seguinte equação:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + r^6)} \quad (11)$$

sendo que E denota a eficiência de transferência entre o doador e o aceitador, r a distância média entre doador e aceitador e R_0 a distância crítica quando a eficiência de transferência é de 50%:

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \phi J \quad (12)$$

Na equação 12, K^2 é o fator de orientação relacionado à geometria do dipolo do doador e do aceitador, n é o índice de refração do meio, ϕ é o rendimento quântico de

fluorescência do doador e J é a integral de sobreposição entre o espectro de emissão do doador e o espectro de absorvância do aceitador, o qual pode ser calculado pela seguinte equação:

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F(\lambda)d\lambda} \quad (13)$$

sendo $F(\lambda)$ a intensidade de fluorescência corrigida do doador na extensão de comprimento de onda de λ para $\lambda + \Delta\lambda$ e $\varepsilon(\lambda)$ o coeficiente de extinção do aceitador em λ .

3.6 Teoria do Orbital Molecular *Ab Initio*

A teoria do orbital molecular *ab initio* busca prever as propriedades eletrônicas de átomos e moléculas. É baseada nas leis fundamentais da mecânica quântica e usa uma variedade de transformações matemáticas e técnicas de aproximação para resolver as equações fundamentais.

3.6.1 Equação de Schrödinger Independente do Tempo

Um sistema molecular pode ser descrito pela resolução da equação de Schrödinger independente do tempo, de acordo com a seguinte expressão:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (14)$$

sendo Ψ a função de onda, a qual representa a função das coordenadas de todas as partículas do sistema. A energia E e muitas outras propriedades podem, então, ser obtidas pela solução da equação 14 para a função de onda, sujeita a condições de

contorno apropriadas. O operador Hamiltoniano (\hat{H}) é formado pela soma dos termos de energia cinética e potencial, ele tem significado físico e representa a energia total do sistema. O operador \hat{H} para um sistema de N elétrons e M núcleos em unidades atômicas é dado por:

$$\hat{H} = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2\mu_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{|\vec{r}_i - \vec{R}_A|} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{1}{|\vec{R}_A - \vec{R}_B|} \quad (15)$$

sendo que os dois primeiros termos da equação 15 representam os operadores das energias cinéticas dos elétrons e núcleos, onde ∇_i^2 e ∇_A^2 correspondentes as derivadas segundas em relação as coordenadas do i -ésimo elétron e do A -ésimo núcleo atômico respectivamente e μ_A é a massa do núcleo. Os restantes dos termos da equação 15 representam o operador de energia potencial eletrostática entre os componentes do sistema. O terceiro termo representa o operador de atração coulombiana elétrons-núcleos, o quarto designa, de repulsão núcleos-núcleos e o quinto, de repulsão elétrons-elétrons. Em todos esses operadores, \vec{r}_i é o vetor posição do elétron i , \vec{R}_A é o vetor posição do núcleo A e Z_A , seu número atômico (LEVINE, 1991; FORESMAN et al., 1995).

3.6.2 Aproximação de Born-Oppenheimer

Como o operador hamiltoniano depende das coordenadas eletrônicas \vec{r} e nucleares \vec{R} , as funções de ondas dependem de ambos os tipos de variáveis e tem a forma:

$$\Psi = \Psi(\vec{r}, \vec{R}) \quad (16)$$

Inicialmente, a resolução da equação de Schrödinger do sistema é feita separando o movimento do núcleo do movimento eletrônico. Essa primeira aproximação é conhecida como aproximação de Born-Oppenheimer e ela é razoável visto que a massa de um

núcleo típico é milhares de vezes maior do que a de um elétron. Desse ponto de vista seria como se o núcleo permanece fixo para os elétrons e os movimentos dos elétrons poderiam ser descritos como ocorrendo em um campo de núcleo fixo. Para isso, assume-se que a equação de onda total do sistema pode ser separada em uma parte nuclear (Ψ_n) que depende somente das disposições do núcleo e uma parte eletrônica (Ψ_e) que depende do potencial gerado pelos núcleos e da posição dos elétrons (BORN & OPPENHEIMER, 1927).

$$\Psi(\vec{r}, \vec{R}) = \Psi_e(\vec{r}, \vec{R})\Psi_n(\vec{R}) \quad (17)$$

A aproximação de Born-Oppenheimer permite omitir o termo da energia cinética dos núcleos e tomar como uma constante o termo do potencial de repulsão núcleos-núcleos do operador hamiltoniano. Dessa forma, obtemos o operador Hamiltoniano eletrônico (\hat{H}_e):

$$\hat{H}_e = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{|\vec{r}_i - \vec{R}_A|} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} \quad (18)$$

Usando as equações 17 e 18, a equação de Schrödinger para descrever o movimento dos elétrons no potencial eletrostático de núcleo fixo será:

$$\hat{H}_e \Psi_e(\vec{r}, \vec{R}) = E_{efetivo}(\vec{R}) \Psi_e(\vec{r}, \vec{R}) \quad (19)$$

Resolvendo a equação 19 para a função de onda eletrônica produzirá a função potencial nuclear efetivo ($E_{efetivo}$), esse depende das coordenadas do núcleo e descreve a superfície de energia potencial para o sistema (FORESMAN et al., 1995). Portanto, $E_{efetivo}$ é também usado como o potencial efetivo para a Hamiltoniana nuclear (\hat{H}_n):

$$\hat{H}_n = \hat{T}_n(\vec{R}) + E_{efetivo}(\vec{R}) \quad (20)$$

onde $\hat{T}_n(\vec{R})$ é o operador energia cinética do núcleo.

A geometria de equilíbrio de uma molécula pode ser obtida resolvendo a equação 19 e descobrindo qual valor dos parâmetros \vec{R}_A a energia é mínima.

3.6.3 Teoria de Hartree-Fock

Para a resolução da equação 19, uma segunda aproximação que será considerada vem da interpretação que $|\Psi|^2$ como a densidade de probabilidade para os elétrons dentro de um sistema, visto que segundo a mecânica quântica a localização dos elétrons não é determinística (Princípio da Incerteza de Heisenberg). A teoria do orbital molecular decompõe Ψ para uma combinação de orbitais moleculares ($\Phi_1, \Phi_2, \Phi_3, \dots$) (FORESMAN et al., 1995). A forma mais simples seria por meio do produto Hartree:

$$\Psi(\vec{r}) = \Phi_1(\vec{r}_1) \Phi_2(\vec{r}_2) \Phi_3(\vec{r}_3) \cdots \Phi_n(\vec{r}_n) \quad (21)$$

Como existem restrições sobre a função de onda geral, de forma que Ψ deve ser normalizada, ortogonal e antissimétrica, o produto Hartree representa uma função de onda inadequada para o tratamento do sistema porque não satisfaz a condição de antissimetria imposta a uma função de onda para férmions (LEVINE, 1991; FORESMAN et al., 1995).

A função antissimétrica mais simples que é uma combinação de orbitais moleculares é um determinante. Para isso, deve-se levar em conta um fator negligenciado anteriormente que é o spin eletrônico. Os elétrons podem ter spin *up* (+ 1/2) ou *down* (- 1/2). A equação 21 assume que cada orbital molecular Φ_i contém somente um elétron. Entretanto, a maioria dos cálculos são realizados para orbitais duplamente ocupados, contendo dois elétrons de spin opostos. Definem-se duas funções de spin, como segue:

$$\begin{aligned} \alpha(\uparrow) &= 1 & \alpha(\downarrow) &= 0 \\ \beta(\uparrow) &= 0 & \beta(\downarrow) &= 1 \end{aligned} \quad (22)$$

A função α é 1 para spin de elétron *up*, e a β é 1 quando o elétron é spin *down*. A notação $\alpha(i)$ e $\beta(i)$ designará o valor de α e β para elétron i ; dessa forma, $\alpha(1)$ é o valor de α para o elétron 1 (FORESMAN et al., 1995).

Multiplicando uma função orbital molecular Φ_i por α e β se inclui o spin eletrônico como parte da função de onda eletrônica geral Ψ . O produto do orbital molecular e uma função de spin é definido como um **Orbital de Spin**, uma função de ambas a localização de elétron e seu spin. Essas funções de orbitais de spin são ortogonais em pares de spin opostos. Dessa forma será construída uma função de onda com definição de $n/2$ orbitais moleculares (Φ_i) para o sistema com n elétrons e então atribuindo elétrons para esses orbitais em pares de spin opostos (FORESMAN et al., 1995):

$$\Psi(\vec{r}) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \Phi_1(\vec{r}_1)\alpha(1) & \Phi_1(\vec{r}_1)\beta(1) & \cdots & \Phi_{n/2}(\vec{r}_1)\alpha(1) & \Phi_{n/2}(\vec{r}_1)\beta(1) \\ \Phi_1(\vec{r}_2)\alpha(2) & \Phi_1(\vec{r}_2)\beta(2) & \cdots & \Phi_{n/2}(\vec{r}_2)\alpha(2) & \Phi_{n/2}(\vec{r}_2)\beta(2) \\ & \vdots & \ddots & & \vdots \\ \Phi_1(\vec{r}_n)\alpha(n) & \Phi_1(\vec{r}_n)\beta(n) & \cdots & \Phi_{n/2}(\vec{r}_n)\alpha(n) & \Phi_{n/2}(\vec{r}_n)\beta(n) \end{vmatrix} \quad (23)$$

Assim, o método Hartree-Fock assume que a função de onda exata para um sistema de muitos corpos pode ser aproximada pelo determinante de Slater, conforme equação 23. Cada linha é formada representando todos os assinalamentos possíveis de elétrons i para todas as combinações de orbital de spin. Trocando dois elétrons corresponde ao intercambio de duas linhas do determinante, o qual terá o efeito de mudar o sinal do determinante, garantindo a assimétrica da função de onda. Esse determinante mistura todos os orbitais possíveis de todos os elétrons no sistema molecular para formar a função de onda geral Ψ (LEVINE, 1991; FORESMAN et al., 1995).

3.6.4 Conjunto de Bases

A próxima aproximação envolve expressar as funções dos orbitais moleculares Φ_i como uma combinação linear de um conjunto predefinido de funções de um único elétron conhecidas como **Bases de Funções**. Essas bases de funções são centradas no núcleo atômico e assim suporta alguma semelhança com os orbitais atômicos, por isso é conhecido como **Método de Combinação Linear de Orbitais Atômicos** (*Linear Combination of Atomic Orbitals* – LCAO). O tratamento matemático adotado para os orbitais moleculares segue a forma apresentada pela seguinte equação (ROOTHAAN, 1951; FORESMAN et al., 1995):

$$\Phi_i = \sum_{\mu=1}^N c_{\mu i} \chi_{\mu} \quad (24)$$

sendo $c_{\mu i}$ os coeficientes de expansão do orbital molecular e χ_{μ} as funções de base, que utilizam funções atômicas do tipo gaussiana. Geralmente, essas funções gaussianas têm a forma:

$$g(\alpha, \vec{r}) = c x^n y^m z^l \exp(-\alpha r^2) \quad (25)$$

sendo \vec{r} o vetor posição (x, y, z) ; n , m e l números inteiros não negativos; α uma constante que determina a extensão radial da função e c uma constante de normalização, tal que:

$$\int_{\text{Todo espaço}} g^2 = 1 \quad (26)$$

As funções de base serão obtidas pela seguinte combinação linear:

$$\chi_{\mu} = \sum_p d_{\mu p} g_p \quad (27)$$

sendo que g_p representa as gaussianas primitivas como as que são usadas para formar as funções de base reais e $d_{\mu p}$ são constantes fixas dentro de um dado conjunto de funções de base.

No presente trabalho, foi utilizada a base 6-31G(d, p). O “6” indica que cada função de base é construída usando seis gaussianas primitivas para os núcleos. O “3” indica que três funções gaussianas são usadas para se construir as funções de base das camadas internas. O “1” indica que as funções de base da camada de valência foram construídas usando uma única função gaussiana. O “G” especifica o tipo de função primitiva usada – gaussiana. Ademais, um conjunto de funções-d de polarização foi adicionado aos átomos pesados e um conjunto de funções-p aos hidrogênios. Também, é comum encontrar esta base denotada como 6-31G**.

3.6.5 Princípio Variacional

O problema agora é como resolver o conjunto de coeficientes de expansão dos orbitais moleculares ($c_{\mu i}$) para determinar a função de onda geral Ψ . Para a resolução desse problema, a teoria de Hartree-Fock faz uso do **Princípio Variacional**, o qual diz que para o estado fundamental de qualquer função normalizada antissimétrica das coordenadas eletrônicas, a qual pode ser denotada por Ξ , então o valor esperado para a energia correspondente a Ξ sempre será maior do que a energia para a função de onda exata (LEVINE, 1991; FORESMAN et al., 1995):

$$E(\Xi) > E(\Psi); \quad \Xi \neq \Psi \quad (28)$$

Dessa forma, a energia da função de onda exata serve como um limite inferior para as energias calculadas para qualquer função antissimétrica normalizada. Com isso, o

problema é em encontrar o conjunto de coeficiente que minimizem a energia da função de onda resultante.

O princípio variacional conduz as seguintes equações descrevendo os coeficientes de expansão dos orbitais moleculares ($c_{\nu i}$), derivadas por Roothaan e por Hall (ROOTHAAN, 1951; HALL, 1951; FORESMAN et al., 1995):

$$\sum_{\nu=1}^N (F_{\mu\nu} - \varepsilon_i S_{\mu\nu}) c_{\nu i} = 0 \quad \nu = 1, 2, \dots, N \quad (29)$$

A equação 29 pode ser reescrita na forma de matriz:

$$F C = S C \varepsilon \quad (30)$$

sendo que cada elemento é uma matriz, ε a matriz diagonal das energias dos orbitais, cada um de seus elementos ε_i é a energia de orbital de um elétron de orbital molecular χ_i . F é a matriz de Fock e ela representa o efeito médio do campo de todos os elétrons em cada orbital. A matriz S é a matriz de sobreposição, que indica a sobreposição entre os orbitais. A equação 30 não é linear e será resolvida iterativamente pelo **Método de Campo Autoconsistente** (*Self-Consistent Field* – SCF). Na convergência, a energia está em um mínimo e os orbitais geram um campo o qual produz os mesmos orbitais (FORESMAN et al., 1995).

3.6.6 Teoria do Funcional de Densidade

A ideia central da Teoria do Funcional de Densidade (*Density Functional Theory* – DFT) consiste em trocar a função de onda $\Psi(\vec{r})$, pela densidade eletrônica $\rho(\vec{r})$. A abordagem DFT, portanto, está baseada na estratégia de modelar a correlação eletrônica por meio de funcionais de $\rho(\vec{r})$.

$$\rho(\vec{r}) = \int |\Psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \vec{r}_3, \dots, \vec{r}_N)|^2 d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 d\vec{r}_3 \dots d\vec{r}_N \quad (31)$$

O método de DFT tem sua origem moderna nos dois teoremas de Hohenberg-Kohn. O primeiro teorema formula que a energia do estado fundamental, a função de onda eletrônica e todas as outras propriedades eletrônicas são unicamente determinadas pela densidade de probabilidade eletrônica $\rho(\vec{r})$, uma função de somente três variáveis. O segundo teorema estabelece que a energia de uma distribuição eletrônica pode ser descrita como um funcional da densidade, de tal forma que $E = E[\rho]$, e este funcional é um mínimo para o estado fundamental (HOHENBERG & KOHN, 1964; LEVINE, 1991).

Para uma densidade de probabilidade eletrônica conhecida, os teoremas de Hohenberg-Kohn afirma que é possível em princípio calcular todas as propriedades moleculares do estado fundamental a partir de $\rho(\vec{r})$. Entretanto, os teoremas de Hohenberg-Kohn não dizem como calcular a energia a partir de densidade sem primeiro encontrar a função de onda. Um passo chave em direção a esse objetivo foi realizado por Kohn e Sham, quando eles mostraram que a energia eletrônica exata puramente do estado fundamental de uma molécula de n elétrons com densidade de probabilidade eletrônica do estado fundamental era dada por (KOHN & SHAM, 1965; LEVINE, 1991):

$$E_0 = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \langle \psi_i(1) | \nabla_1^2 | \psi_i(1) \rangle - \sum_{\alpha} \int \frac{Z_{\alpha} \rho(1)}{r_{1\alpha}} dv_1 + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(1)\rho(2)}{r_{12}} dv_1 dv_2 + E_{XC}[\rho] \quad (32)$$

sendo os $\psi_i(1)$ os orbitais de Kohn-Sham e $E_{XC}[\rho]$ o funcional de $\rho(\vec{r})$ que denota a energia de correlação e troca. As notações $\psi_i(1)$ e $\rho(1)$ indicam que ψ_i e ρ são tomadas como função das coordenadas espaciais do elétron 1. Kohn e Sham também mostraram que a densidade exata do estado fundamental pode ser encontrada a partir das ψ_i , de acordo com a seguinte equação:

$$\rho = \sum_{i=1}^n |\psi_i|^2 \quad (33)$$

Os orbitais de Kohn-Sham são encontrados resolvendo as equações de um elétron

$$\hat{F}_{KS}(1)\psi_i(1) = \varepsilon_{i,KS} \psi_i(1) \quad (34)$$

sendo \hat{F}_{KS} o operador de Kohn-Sham, o qual é dada por:

$$\hat{F}_{KS} = -\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{1\alpha}} + \sum_{j=1}^n \hat{J}_j(1) + V_{XC}(1) \quad (35)$$

sendo $\hat{J}_j(1) = \int |\psi_j(2)|^2 \frac{1}{r_{12}} dv_2$ o operador de Coulomb e V_{XC} é o potencial de

correlação e troca que é dado pela derivado do funcional $E_{XC}[\rho]$:

$$V_{XC} = \frac{\delta}{\delta\rho} E_{XC}[\rho] \quad (36)$$

Há somente um único problema em usar as equações de Kohn-Sham para encontrar ρ e E , o funcional exato de correlação e troca $E_{XC}[\rho]$ não é conhecido para moléculas. No entanto, existem várias aproximações que permitem calcular propriedades moleculares com vários níveis de precisão. A mais simples delas é chamada de Aproximação de Densidade Local (*Local Density Approximation* – LDA), na qual a densidade corresponde àquela de um gás de elétrons homogêneo. No presente trabalho, contudo, a metodologia de funcionais híbridos foi utilizada para se realizar os cálculos. Esta mistura a Aproximação de Gradiente Generalizado (*Generalized Gradient Approximation* – GGA), na qual os funcionais incorporam uma dependência do gradiente, com o termo exato de troca de Hartree-Fock (LEVINE, 1991; FORESMAN et al., 1995; MORGON et al., 2007).

3.7 Teoria da Modelagem Molecular

O entendimento dos mecanismos de reconhecimento molecular receptor-ligante, além de ser um dos principais desafios da biologia molecular, é um dos aspectos centrais para o sucesso na descoberta e planejamento de novos fármacos dentro da área de desenho racional de fármacos baseados em estrutura. A obtenção de uma descrição feita com cuidado e automatizada do processo de reconhecimento molecular receptor-ligante, utilizando métodos computacionais, é motivada pela possibilidade de redução do tempo e do alto custo para o desenvolvimento de novos medicamentos. No desempenho racional de novos fármacos, os métodos computacionais se tornaram uma parte importante e indispensável de pesquisas associadas a química medicinal e química teórica computacional. O método de modelagem molecular receptor-ligante se tornou um dos principais métodos na pesquisa de desenvolvimento racional de novos fármacos, atraindo o interesse de universidades, indústrias farmacêuticas e empresas de biotecnologia em todo o mundo (MORGON et al., 2007).

O princípio da modelagem molecular receptor-ligante consiste basicamente na predição do modo de ligação de uma pequena molécula ligante (inibidor) na região de ligação (sítio ativo) de um alvo molecular, e na quantificação da afinidade entre o receptor e ligante. Os receptores moleculares podem se tratar como, por exemplo, de uma proteína e enzima, ácido nucleicos. A consideração das flexibilidades das moléculas do receptor e do ligante confere ao problema de modelagem molecular um alto nível de complexidade devido aos inúmeros graus de liberdade, dessa forma, exigindo afinados algoritmos de docking. Além do mais, o reconhecimento molecular se trata de processo dinâmico de grande complexidade que envolve muitas interações intermoleculares entre o receptor, o ligante e o solvente (MORRIS et al., 1998; MORGON et al., 2007).

Há vários programas de modelagem molecular disponíveis para a pesquisa científica, tais como: GOLD, DOCK, AutoDock, FlexX, LUDI, ChemScore e outros. O AutoDock foi o programa de modelagem molecular usado nesse trabalho, visto que esse é o mais utilizado pela comunidade científica para as pesquisas de reconhecimento molecular e também proporciona resultados confiáveis e de boa concordância com os dados experimentais (SOUZA et al., 2006).

O AutoDock é método de modelagem molecular flexível. Para esse método o ligante começa aleatoriamente na parte externa da proteína, explorando translações, orientações e conformações, até que um site ideal seja encontrado. Esse tipo de método geralmente é lento se comparados com o método do programa DOCK, mas ele permite que a flexibilidade dentro do ligante seja modelada e possa utilizar mecanismo molecular mais detalhado para calcular a energia do ligante no contexto do sítio ativo (MORRIS et al., 1998; MORGON et al., 2007).

O AutoDock 4.2 usa um campo de força de energia livre semi-empírico para avaliar conformações durante as simulações de docking. Esse campo de força foi parametrizado usando um grande número de complexos proteína-inibidor para quais ambas as constantes de estrutura e inibição são conhecidas (MORRIS et al., 1998; HUEY et al., 2007; MORRIS et al., 2010).

A abordagem tomada no AutoDock 4.2 é mostrada na figura 8. A energia livre de ligação é estimada para ser igual à diferença entre a energia do ligante e da proteína em um estado não ligado separadamente e a energia do complexo proteína-ligante. Isso é dividido em duas etapas para avaliação: inicialmente, avalia-se a energia intramolecular do estado não ligado para a conformação ligada para cada uma das moléculas separadamente, em seguida, avalia-se a energia intermolecular de trazer as duas

moléculas juntas para a formação do complexo ligado (HUEY et al., 2007; MORRIS et al., 2010).

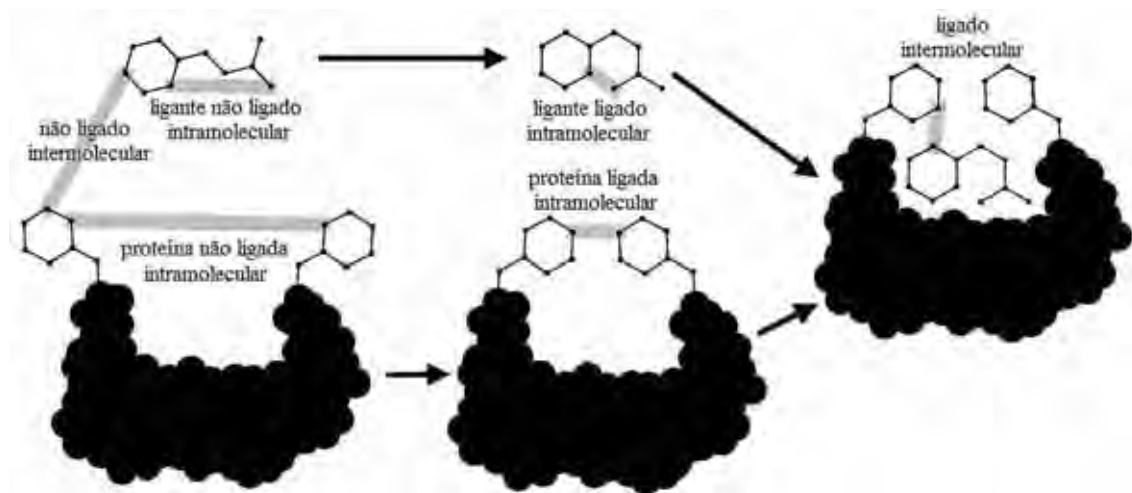


Figura 8: O campo de força avalia a ligação em dois passos. A ligante e a proteína iniciam em uma conformação não ligada. No primeiro passo, as energias intramoleculares são estimadas para a transição desses estados não ligados para a conformação do ligante e proteína no estado ligado. No segundo passo, avalia a energias intermoleculares de combinar o ligante e a proteína em sua conformação ligada.

O campo de força inclui seis pares de avaliação (V) e uma estimativa da entropia conformacional perdida na ligação (ΔS_{conf}) (MORRIS et al., 1998; HUEY et al., 2007; MORRIS et al., 2010):

$$\Delta G = (V_{ligado}^{L-L} - V_{nãoligado}^{L-L}) + (V_{ligado}^{P-P} - V_{nãoligado}^{P-P}) + (V_{ligado}^{P-L} - V_{nãoligado}^{P-L} + \Delta S_{conf}) \quad (37)$$

sendo que L se refere ao ligante e P se refere a proteína em um cálculo de docking proteína-ligante. Cada um dos termos de pares energéticos inclui avaliação para dispersão/repulsão, ligação de hidrogênio, eletrostática e dessolvatação:

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{ld} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) +$$

$$+ W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) \exp \left(- \frac{r_{ij}^2}{2\sigma^2} \right) \quad (38)$$

As constantes de ponderação W são aquelas as quais são otimizadas para calibrar a energia livre empírica baseada em um conjunto de complexos caracterizados experimentalmente. O primeiro termo é um potencial 6/12 típico para interação dispersão/repulsão. Os parâmetros A e B são tomados do campo de força Amber. O segundo termo se refere à ligação de hidrogênio direcional baseado em um potencial 10/12. Os parâmetros C e D são configurados para garantir uma mínima energia de 5 kcal/mol em 1,9 Å para O – H e N – H, e de 1 kcal/mol em 2,5 Å para S – H. A função $E(t)$ fornece a direcionalidade baseada no ângulo t da geometria de uma ligação de hidrogênio ideal. O terceiro termo é um potencial de Coulomb blindado para a eletrostática. O último termo é o potencial de dessolvatação baseado no volume de átomo (V) que cerca um dado átomo e abriga-o do solvente, ponderado por um parâmetro de solvatação (S) e o termo exponencial com fator de ponderação de distância $\sigma = 3,5$ Å (MORRIS et al., 1998; MORGON et al., 2007; HUEY et al., 2007; MORRIS et al., 2010).

O termo para a perda de entropia conformacional na ligação (ΔS_{conf}) é diretamente proporcional ao número de ligações rotativas na molécula (N_{tors}):

$$\Delta S_{conf} = W_{conf} N_{tors} \quad (39)$$

O número de ligações rotativas incluem todos os graus de liberdade de torção, incluindo rotações de átomos de hidrogênio polares e grupos hidroxilas e outros (HUEY et al., 2007).

O campo de força de energia livre semi-empírico utilizado pelo programa AutoDock 4.2 faz uso de um tipo de pré-cálculo realizado pelo programa AutoGrid 4.2 para redução do custo computacional. O AutoGrid constrói mapas de grades para cada tipo de átomo presente na molécula de ligante a ser usada no docking. Os mapas de grades consistem de uma matriz tridimensional de pontos espaçados regularmente, centrada (geralmente) no sítio ativo da proteína ou macromolécula em estudo. Cada ponto dentro dos mapas de grades registra a energia interação de um átomo de prova com a proteína (MORGON et al., 2007; MORRIS et al., 2010).

A complexidade do problema de *docking* requer métodos computacionais com potencial para investigar efetivamente um grande número de soluções possíveis, tendo como objetivo que a solução “ótima” seja encontrada. Os métodos de busca utilizados nos algoritmos de docking ligante-flexível podem ser classificados basicamente em três categorias: métodos de busca sistemáticos, métodos de busca determinística e métodos de busca estocástica. Nos algoritmos de busca sistemática, cada grau de liberdade possui um conjunto de valores, de maneira que todos os graus de liberdade da molécula são explorados combinatoriamente durante a busca. Os métodos de busca determinística são caracterizados pelo fato de, dado o mesmo estado inicial de entrada, produzirem sempre a mesma saída. Nos métodos de busca estocásticas a busca envolve movimentos aleatórios, ocasionando diferentes saídas para o mesmo estado inicial de entrada (uma vez que “sementes” distintas são utilizadas no gerador de números pseudo-aleatórios). A maioria desses métodos não possui garantia de convergência, requerendo múltiplas execuções. Monte Carlo, *Simulated Annealing* e Algoritmos Evolucionários são exemplos de métodos de busca estocásticas que têm sido utilizados para o problema de docking receptor-ligante (MORGON et al., 2007).

O programa de modelagem molecular AutoDock 4.2 utiliza os algoritmos de busca estocásticas: Busca Local (*Local Search* – LS), *Simulated Annealing* (SA), Algoritmo Genético (*Genetic Algorithm* – GA) e Algoritmo Genético Lamarckiano (*Lamarckian Genetic Algorithm* – LGA). No presente trabalho, o algoritmo de busca utilizado foi o LGA, o qual se trata de um Algoritmo Evolucionário que são uma classe de métodos estocásticos de otimização global, inspirados no processo biológico de evolução de populações naturais (MORGON et al., 2007.)

No caso da modelagem molecular, o arranjo particular de um ligante e uma proteína pode ser definida por um conjunto de valores descrevendo a translação, orientação e conformação do ligante com relação à proteína, essas são as variáveis de estado do ligante, no GA, cada variável de estado corresponde a um “gene”. Um conjunto de três tipos de genes constitui um cromossomo, isto é, um “indivíduo”. Três genes representam os graus de liberdade translacionais, quatro genes representam os graus de liberdade rotacionais, e N genes representam os graus de liberdade conformacionais da molécula ligante, sendo que N representa o número de ângulos diedrais da molécula ligante. Para cada cromossomo uma única estrutura tridimensional do ligante está associada (MORRIS et al., 1998; MORGON et al., 2007).

O GA trabalha com uma população de indivíduos, onde cada indivíduo representa uma possível solução para o problema a ser resolvido. A cada geração, novos indivíduos são gerados através da troca dos “genes” entre dois indivíduos “pais” (recombinação) e de mudanças aleatórias nos valores dos “genes” (mutação). Esse processo é repetido de maneira que a população evolua para melhores soluções que minimizem as energias envolvidas na interação receptor-ligante. A hibridização do GA com o algoritmo LS forma o LGA. A cada geração, uma porcentagem predefinida da população é aleatoriamente escolhida para aplicação da LS. O indivíduo resultante da LS substitui o

indivíduo original, em uma alusão à desacreditada teoria de Lamarck sobre a hereditariedade de características adquiridas durante o tempo de vida de um indivíduo. Na otimização do híbrido GA-LS, o resultado da LS é sempre usado para atualizar o critério de minimização das energias envolvidas na interação receptor-ligante associado a um indivíduo no algoritmo de seleção de GA (MORRIS et al., 1998; MORGON et al., 2007).

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

A Albumina do Soro Humano de fração V, etanol absoluto, fosfato de sódio monobásico e dibásico (ambos de pureza > 99%) e cloreto de sódio (pureza > 99%) foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) e usados como fornecidos. Os flavonóides rutina e guaijaverina foram fornecidos pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas do IQ-UNESP, Araraquara. Água ultrapura Mili-Q foi usada para preparar todas as soluções aquosas utilizadas nos experimentos.

4.2 Preparo das Soluções Estoques de Flavonóides e a HSA

A HSA foi dissolvida na solução de tampão fosfato de 50 mM em pH 7,0, contendo 150 mM de cloreto de sódio (NaCl). A solução estoque de HSA foi filtrada com um filtro de Millipore de 0,22 µm. A soluções estoque da Rutina e Guaijaverina foram preparadas em 25% de água Mili-Q e 75% de etanol absoluto (EtOH).

4.3 Espectroscopia de Absorção UV-Vis

A espectroscopia de absorção UV-Vis foi utilizada para a determinação das concentrações das soluções estoques dos flavonóides e da HSA. Para a Rutina foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $19.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 363 nm (KREWSON et al., 1948) e para a Guaijaverina, $28.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 260 nm (EL KHADEM et al., 1958). A concentração estimada da solução estoques da Rutina e da Guaijaverina foram 1,8 e 1,7 mM, respectivamente. Para a HSA foi utilizado o coeficiente de extinção de $36.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 280 nm (PAINTER et al., 1998), a concentração de sua solução estoque foi estimada em 0,45 mM. O espectro de absorção UV-Vis foram coletado em temperatura ambiente em um espectrômetro Cary-3E (Varian, Palo Alto, CA) equipado com uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Os espectros de absorção UV-Vis foram registrados na extensão de 200 a 500 nm com tempo de integração de 0,333 segundos, fazendo-se a subtração da linha de base do tampão da solução analisada.

4.4 Espectroscopia de Fluorescência de Estado Estacionário

As medidas de fluorescência de estado estacionário foram obtidas no espectrofluorímetro ISS PC1 (Champaign, IL, USA) equipado com um banho térmico Nestlab RTE-221 (Thermo Electron Corporation, USA) e com um agitador magnético. As larguras de banda de excitação e emissão utilizadas foram de 8,0 nm. Uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm foi utilizada para os experimentos. O espectrofluorímetro de estado estacionário foi usado nos experimentos de supressão de fluorescência da HSA pelos flavonóides Rutina e Guaijaverina.

Nos experimentos de supressão de fluorescência que investigou a interação dos flavonóides à HSA, o comprimento de onda de excitação foi de 295 nm, pois esse excita unicamente os resíduos de triptofano da proteína, que no caso da HSA é somente o

Trp214. Os espectros de emissão de fluorescência foram coletados na extensão de 305 a 500 nm e esses foram corrigidos subtraindo o espectro de fluorescência do tampão e para efeitos de filtragem interna de acordo com a expressão (LAKOWICZ, 1999; LEESE et al., 1978):

$$F_{corr} = F_{obs} 10^{\left(\frac{A_1 + A_2}{2}\right)} \quad (40)$$

sendo F_{corr} e F_{obs} as intensidades de fluorescência corrigidas e observadas, respectivamente. A_1 e A_2 são as absorvâncias dos comprimentos de onda de excitação e emissão dos supressores, respectivamente.

A supressão de fluorescência a partir da titulação fluorimétrica foi feita mantendo constante a concentração da HSA em 4,0 μM , adicionando-se pequenas alíquotas de uma solução de flavonóides sob agitação e temperatura constantes. Para o experimento de supressão com a Rutina, sua concentração foi de 0 a 4,0 μM com um incremento de 0,4 μM . Para os experimentos de supressão com a Guaijaverina, sua concentração variou de 0 a 8,0 μM com um incremento de 0,4 μM . Ambos os experimentos de supressão foram realizados nas temperaturas de 298 (25), 303 (30) e 308 K (35°C).

4.5 Cálculos *Ab Initio*

As estruturas moleculares dos flavonóides foram investigadas por meio de métodos *ab initio*. Os cálculos foram realizados com o pacote de química quântica computacional Gaussian 98 (FRISCH et al., 1998), usando formalismo da Teoria do Funcional de Densidade (DFT) dentro do nível B3LYP (Três parâmetros Becke com Lee-Yang-Parr) com o conjunto de bases 6-31G(d,p). As geometrias otimizadas da Rutina e da Guaijaverina foram determinadas no vácuo, sem qualquer restrição de

simetria. O potencial eletrostático molecular (*Molecular Electrostatic Potential* – MEP) e a diferença de energia entre o orbital molecular mais alto ocupado (*Highest Occupied Molecular Orbital* – HOMO) e o orbital molecular mais baixo desocupado (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital* – LUMO) foram calculados para auxiliar no estudo da interação dos flavonóides com a HSA. O utilitário NewZMat do programa Gaussian foi utilizado para obter os arquivos de PDB dos flavonóides estudados, esses arquivos foram usados como dados de *input* para o cálculo de modelagem molecular.

4.6 Cálculos de Modelagem Molecular

A estrutura cristalina da HSA (código de entrada do PDB 1AO6) foi obtida do *Protein Data Bank* (PDB) (SUGIO et al., 1999). As estruturas tridimensionais dos flavonóides utilizados no cálculo de modelagem molecular foram obtidas a partir dos dados de *output* do programa Gaussian 98. O *software* AutoDockTools (SANNER et al., 1999) do programa MGL Tools 1.5.4 foi utilizado para preparar a HSA e os flavonóides adicionando átomos de hidrogênio polar, cargas parciais e tipos atômicos. A origem rígida dos ligantes (flavonóides) foi automaticamente selecionada e os possíveis giros e torções de todas as ligações foram ativados. Os mapas de redes foram gerados pelo programa AutoGrid 4.2 (MORRIS et al., 1998) com um espaçamento de 0,375 Å e dimensão de 60 × 60 × 60 pontos. O programa AutoDock 4.2 (MORRIS et al., 1998) foi utilizado para investigar o sítio de interação entre os flavonóides e a HSA aplicando o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) para a minimização usando parâmetros padrão. As posições iniciais aleatórias na entrada da superfície da proteína (HSA) e orientações aleatórias foram usadas para os ligantes. Para a simulação de *docking* dos flavonóides, 30 confôrmeros diferentes foram gerados. O software PMV (SANNER et al., 1999) do programa MGL Tools 1.5.4 foi utilizado para visualizar as

configurações obtidas nos cálculos de modelagem molecular e localizar as interações entre os flavonóides e a HSA.

5 Resultados e Discussões

5.1 Supressão de Fluorescência da HSA pelos Flavonóides

Nos experimentos de supressão de fluorescência da HSA pelos flavonóides, a concentração da HSA foi mantida constante em 4,0 μM e os flavonóides foram titulados à solução aquosa de HSA (tampão fosfato de 50 mM contendo 150 mM de NaCl, em pH 7,0) sob agitação e temperatura constante. A concentração da Rutina variou de 0 a 4,0 μM , enquanto que para a Guajaverina variou de 0 a 8,0 μM , ambas com um incremento de 0,4 μM em cada titulação. Ambos os experimentos de supressão de fluorescência foram realizados em 298, 303 e 308 K.

A solução de HSA foi excitada em 295 nm, visto que esse comprimento de onda excita unicamente resíduos de triptofano da proteína (LAKOWICZ, 1999), em particular, a HSA possui um único resíduo de triptofano, *Trp214*. A emissão de fluorescência da HSA na presença e na ausência dos flavonóides foi registrada de 305 a 500 nm. O efeito dos flavonóide sob a intensidade de fluorescência da HSA em 298 K é mostrada na Figura 9.

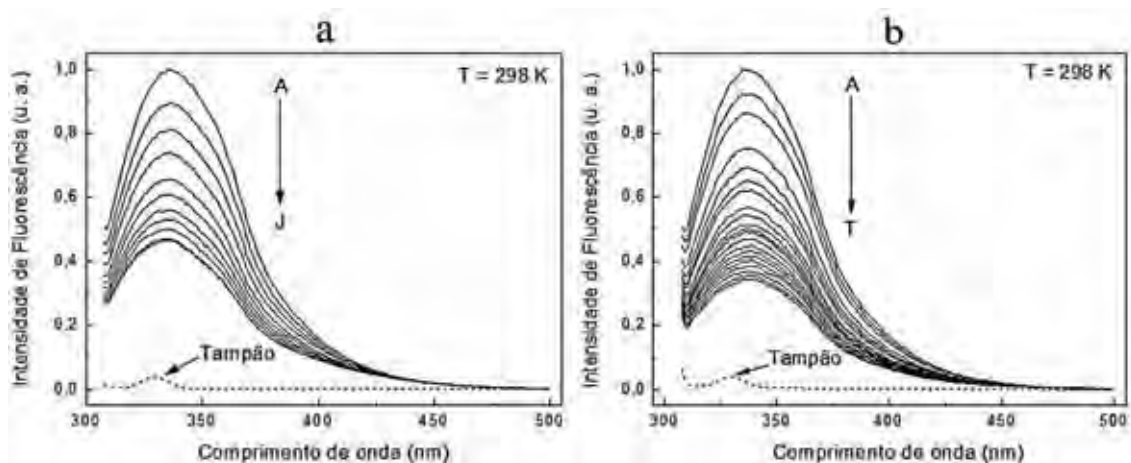


Figura 9: Espectro de emissão da HSA na presença de varias concentrações de Rutina (a) e Guaijaverina (b) ($T = 298\text{ K}$, $\lambda_{ex} = 295\text{ nm}$). $[HSA] = 4.0 \times 10^{-6}\text{ molL}^{-1}$; $[Ru]/(10^{-6}\text{ molL}^{-1})$, A-J: de 0 a 4,0; $[Gua]/(10^{-6}\text{ molL}^{-1})$, A-T: de 0 to 8,0, ambos com incremento de 0,4. As curvas pontilhadas mostram o espectro de emissão do tampão.

A Figura 9 mostra a intensidade de fluorescência da HSA sendo suprimida com o aumento da concentração dos flavonóides em 298 K, indicando que o microambiente na HSA envolvido na interação com os flavonóides deve conter o resíduo de *Trp214*, que se encontra no bolso hidrofóbico do subdomínio IIA. A Figura 10 mostra que, dentro da variação de concentração de flavonóides estudada, os resultados de supressão de fluorescência em 298, 303 e 308 K estão de acordo com a equação de Stern-Volmer (Equação 1).

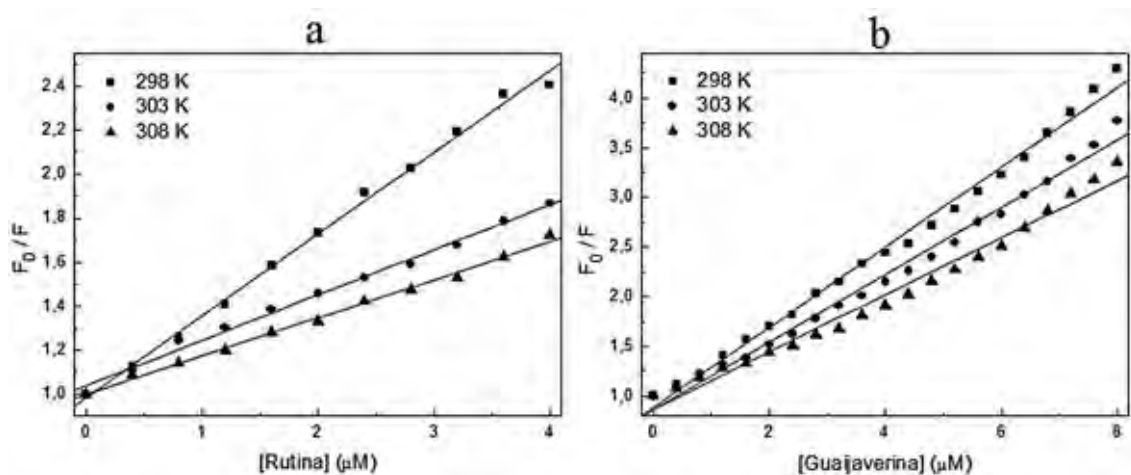


Figura 10: Gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da HSA pela Rutina (a) e Guaijaverina (b) em 298, 303 e 308 K.

O resultado na Tabela 1 mostra os valores para as constantes de supressão de Stern-Volmer K_{SV} em 298, 303 e 308 K, as quais são obtidas a partir do ajuste linear aos dados experimentais. A Tabela 1 demonstra que os valores de K_{SV} são inversamente correlacionados com o aumento da temperatura, indicando que o mecanismo de supressão da HSA pelos flavonóides é iniciado pela formação do complexo HSA-flavonóides, ou seja, sugerindo a ocorrência do mecanismo de supressão estático (LAKOWICZ, 1999).

Tabela 1: Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}) e constate de supressão bimolecular (K_q) do complexo HSA-flavonóides em 298, 303 e 308 K.

<i>pH</i>	<i>T</i> (K)	Rutina			Guaijaverina		
		K_{SV} ($\times 10^5 M^{-1}$)	K_q ($\times 10^{13} M^{-1} s^{-1}$)	R^a	K_{SV} ($\times 10^5 M^{-1}$)	K_q ($\times 10^{13} M^{-1} s^{-1}$)	R^a
	298	3,7	3,7	0,998	4,0	4,0	0,999
7,0	303	2,1	2,1	0,997	3,4	3,4	0,998
	308	1,7	1,7	0,998	2,9	2,9	0,998

^a *R* é o coeficiente de correlação.

Os valores K_q apresentados na Tabela 1 foram calculados utilizando a relação $K_q = K_{SV}/\tau_0$ advinda da Equação 1, utilizando-se $\tau_0 = 10^{-8} s$ (LAKOWICZ et al., 1973). A Tabela 1 também mostra que os valores de K_q para a reação de ligação HSA-flavonóides são maiores do que $2.0 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$, que na literatura corresponde a uma taxa constante da supressão colisional de difusão máxima de supressores com biopolímeros (WARE, 1962). Consequentemente, o mecanismo de supressão de fluorescência da HSA pelos flavonóides deve seguir um processo de supressão estático.

Os dados de supressão de fluorescência da HSA também foram analisados pela forma modificada da equação de Stern-Volmer (Equação 3). A Figura 11 mostra os gráficos de Stern-Volmer modificados para a supressão de fluorescência da HSA pelos flavonóides em 298, 303 e 308 K.

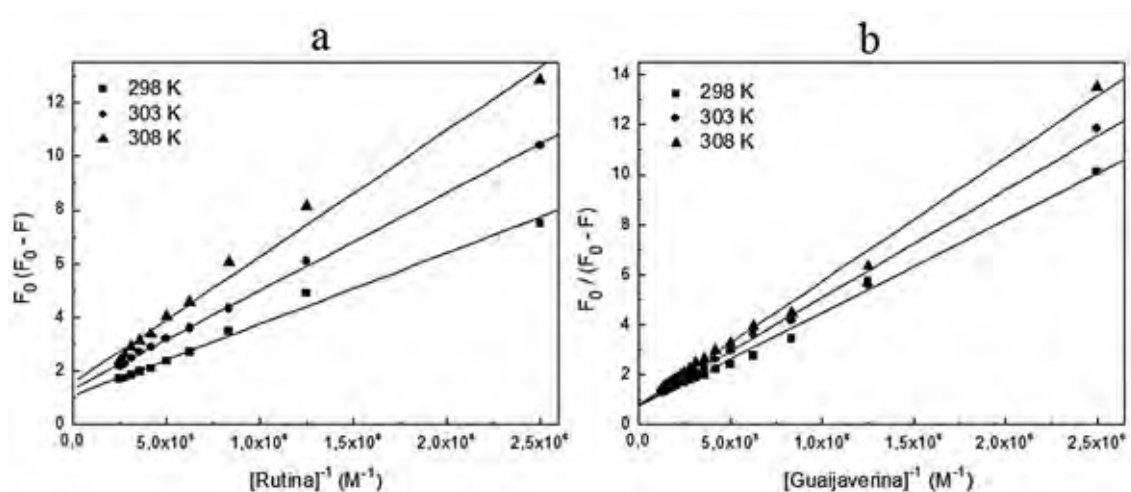


Figura 11: Gráficos de Stern-Volmer modificados para a supressão de fluorescência da HSA pela Rutina (a) e Guaijaverina (b) em 298, 303 e 308 K.

Os resultados para supressão de fluorescência da HSA analisados pela forma modificada da equação de Stern-Volmer estão apresentados na Tabela 2. Os valores de K_a para a Rutina e a Guaijaverina foram calculados a partir da equação 3, ajustando-se

uma reta aos dados experimentais em 298, 303 e 308 K. A Tabela 2 mostra que os valores de K_a obtidos diminuem com o aumento da temperatura o que está em concordância com a interdependência entre K_{SV} e a temperatura como mencionado previamente, indicando que o mecanismo de supressão de fluorescência é estático (LAKOWICZ, 1999). Pode-se observar que o efeito da temperatura na constante de ligação entre a HSA e os flavonóides é pouco significativo. Dessa forma, os flavonóides podem ser acondicionados e carregados pela HSA no corpo humano, como sugerido para outros ligantes com a Albumina do Soro Humano e Bovino (LIU et al., 2000; HU et al., 2004; HU et al., 2005).

Tabela 2: Constantes de supressão efetiva para fluoróforo acessível (K_a) do complexo HSA-flavonóides em 298, 303 e 308 K.

<i>pH</i>	K_a	Rutina		Guaijaverina	
		K_a ($\times 10^5 M^{-1}$)	R^a	K_a ($\times 10^5 M^{-1}$)	R^a
	298	4,0	0,994	2,0	0,997
7,0	303	3,6	0,999	1,8	0,995
	308	3,3	0,993	1,6	0,991

^a R é o coeficiente de correlação.

A partir dos dados apresentados na Tabela 2 pode-se observar que os valores de K_a para a Rutina são ligeiramente maiores do que os valores para a Guaijaverina em cada temperatura separadamente, resultando numa maior eficiência da supressão de fluorescência ao fluoróforo acessível *Trp214* da HSA. Entretanto, com o aumento da temperatura a diminuição relativa dos valores de K_a para a Rutina é aproximadamente de 0,4, enquanto que para a Guaijaverina é por volta de 0,2, indicando assim uma maior estabilidade do complexo HSA-Gua do que do complexo HSA-Ru sob influência da temperatura.

5.2 Análise Termodinâmica da Interação entre os Flavonóides e a HSA

Os parâmetros termodinâmicos para o complexo HSA-flavonóides foram determinados a partir da equação de van't Hoff utilizando as constantes de supressão efetiva K_a . A Figura 12 mostra os gráficos de van't Hoff para a interação da HSA com a Rutina e a Guaijaverina em 298, 303 e 308 K.

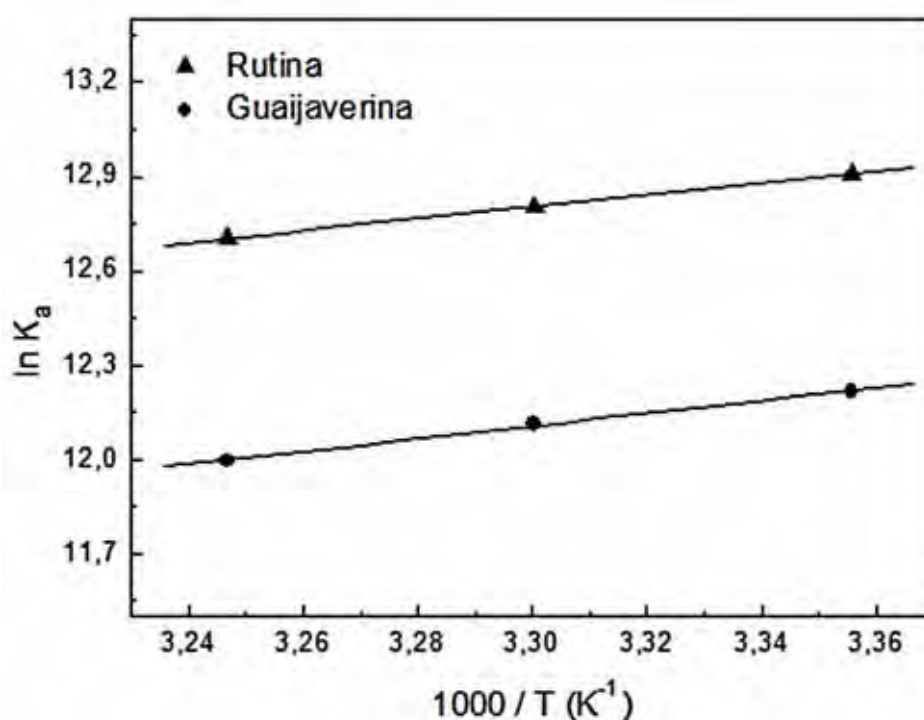


Figura 12: Gráficos de van't Hoff para o complexo HSA-flavonóides para as temperaturas de 298, 303 e 308 K.

O ajuste linear obtido a partir do gráfico de van't Hoff de $\ln K_a$ versus $1/T$ de acordo com a Equação 4, está em boa concordância com os dados experimentais, isto mostra que a suposição de que ΔH é quase constante está justificada (ver Figura 12). Os valores de variação de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) foram determinados a partir

das inclinações e das intersecções com o eixo das ordenadas, respectivamente. As energias livres de Gibbs (ΔG) foram obtidas utilizando a Equação 5.

A Tabela 3 mostra os parâmetros termodinâmicos para os complexos formados entre a HSA e os flavonóides em 298, 303 e 308 K.

Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos do complexo HSA-flavonóides em 298, 303 e 308 K.

<i>pH</i>	<i>T(K)</i>	Rutina			Guajaverina		
		ΔH (<i>kJmol⁻¹</i>)	ΔG (<i>kJmol⁻¹</i>)	ΔS (<i>Jmol⁻¹K⁻¹</i>)	ΔH (<i>kJmol⁻¹</i>)	ΔG (<i>kJmol⁻¹</i>)	ΔS (<i>Jmol⁻¹K⁻¹</i>)
	298		-32,0			-30,3	
7,0	303	-15,7	-32,3	54,7	-16,9	-30,5	44,9
	308		-32,5			-30,7	

Os valores negativos das variações de energias livres de Gibbs (ΔG) apresentados na Tabela 3 suportam a afirmação de que tanto a reação de ligação da HSA a Rutina quanto a Guajaverina são espontâneas. A partir dos valores de ΔG negativos é possível observar que o complexo HSA-Ru têm sua formação mais favorecida do que o complexo HSA-Gua para cada temperatura.

Baseando-se nos sinais e magnitudes dos parâmetros termodinâmicos mostrados na Tabela 3 é possível discutir o tipo individual de contribuição das interações que podem ocorrer na formação dos complexos HSA-flavonóides. A comparação entre as magnitudes de variação de entalpia e entropia definirá se a contribuição hidrofóbica ou eletrostática desempenhará um papel importante na estabilização dos complexos. De acordo com a literatura, valores positivos de ΔS e ΔH implicam tipicamente em interações hidrofóbicas, enquanto que valores negativos implicam em forças de van der Waals e ligações de hidrogênio. Com base em estudos de estrutura da água, uma

variação de entropia positiva é geralmente considerada como evidência de interação hidrofóbica. Em adição, interação eletrostática específica entre espécies de íons e, solução aquosa é caracterizada por um valor de ΔS positivo enquanto que o valor de ΔH é ligeiramente positivo ou negativo (ROSS et al., 1981; LU et al., 2009). Para os complexos HSA-Ru e HSA-Gua, a Tabela 3 mostra que $\Delta S > 0$ e $\Delta H < 0$ para ambos os flavonóides, indicando que as interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio devem desempenhar um papel importante na estabilização dos complexos formados. Os valores dos sinais da variação de entalpia e entropia sugerem que, inicialmente, a interação é dirigida pelas interações hidrofóbicas, condicionando os flavonóides ao sitio I do bolso hidrofóbico do subdomínio IIA da HSA e, por fim, o complexos HSA-Ru e HSA-Gua são estabilizados pelas forças de van der Waals e pontes de hidrogênio.

Na formação do complexo HSA-Ru, os parâmetros termodinâmicos apresentados na Tabela 3 mostram que a contribuição entrópica ($-T\Delta S$) e entálpica (ΔH) no balanço da energia livre de Gibbs são muito próximas. Enquanto que para o complexo HSA-Gua o balanço entálpico-entrópico é mais favorável à entalpia.

5.3 Análise de Equilíbrio de Ligação

Utilizando os dados de supressão de fluorescência da HSA pelos flavonóides, o método de análise de equilíbrio de ligação foi realizado e, com isso, tornou-se possível determinar as constantes de ligação (K_b) e os sítios de ligação (n) para a interação HSA-flavonóides. A figura 13 mostra os gráficos de equilíbrio de ligação para a supressão de fluorescência da HSA pelos flavonóides em 298, 303 e 308 K.

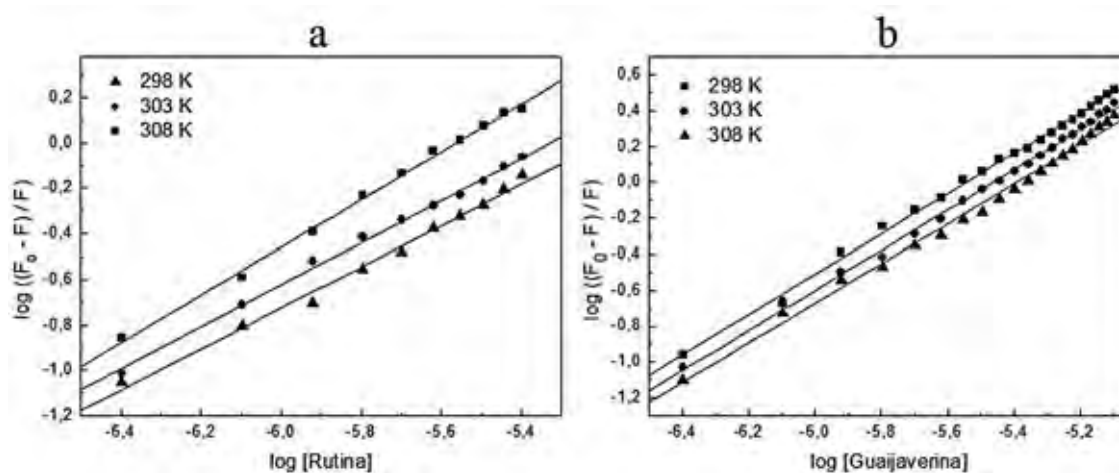


Figura 13: Gráficos log-log do efeito da supressão da Rutina (a) e da Guajaverina (b) na fluorescência da HSA em 298, 303 e 308 K.

Para os dados experimentais dos complexos HSA-flavonóides, os valores de K_b e n são determinados a partir da intersecção com o eixo das ordenadas e da inclinação da reta ajustada em 298, 303 e 308 K, de acordo com a Equação 10. Os resultados da análise de equilíbrio de ligação são apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Constantes de ligação (K_b) e sítios de ligação (n) do complexo HSA-flavonóides em 298, 303 e 308 K.

pH	$T(K)$	Rutina			Guajaverina		
		K_b ($\times 10^5 M^{-1}$)	n	R^a	K_b ($\times 10^6 M^{-1}$)	n	R^a
	298	6,9	1,1	0,999	1,6	1,1	0,999
7,0	303	0,9	0,9	0,998	1,2	1,1	0,998
	308	0,5	0,9	0,997	0,9	1,1	0,997

^a R é o coeficiente de correlação.

É possível observar a partir dos dados da Tabela 4 que número de sítios de ligação entre a HSA e os flavonóides é aproximadamente igual a 1,0, indicando que há somente uma molécula de flavonóide para o sítio I da HSA. Todos os coeficientes de correlação (R) para a Rutina e Guajaverina são maiores do que 0,99, sugerindo que a interação

entre HSA e os flavonóides é consistente com o modelo sítio-ligação apresentado na Equação 6. A Tabela 4 mostra que os valores de K_b diminuem em relação ao aumento da temperatura, o que está de acordo com a tendência de K_{SV} e K_a mencionada previamente.

5.4 Medidas das Distâncias entre a HSA-*Trp* 214 e os Flavonóides

A partir da teoria de FRET foi possível estimar as prováveis distâncias entre a HSA-*Trp*214 e os flavonóides. A Figura 14 mostra a sobreposição espectral entre o espectro de emissão de fluorescência da HSA com os espectros de absorbância da Rutina e Guaijaverina em 298 K, sendo uma das exigências da teoria de FRET. Com vistas a obtenção da distância entre o doador (HSA-*Trp*214) e o aceitador (Ru e Gua), os espectros de emissão de fluorescência de estado estacionário e de absorbância, respectivamente, foram determinados utilizando uma concentração de 4,0 μM para ambos.

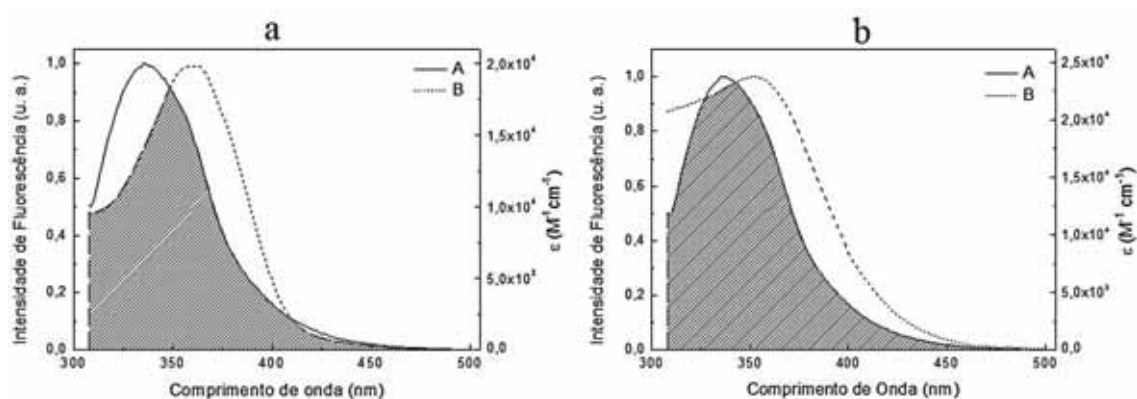


Figura 14: Sobreposição espectral da emissão de Fluorescência da HSA (—A) com espectro de absorbância da Rutina (a, ----B) e o espectro de absorbância da Guaijaverina (b, ----B) ($[HSA] = [Ru] = [Gua] = 4.0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$).

Para esses estudos de FRET foram usados os seguintes valores: $K^2 = 2/3$, $n = 1,36$, e $\phi = 0,074$ (HU et al., 2004). De acordo com as Equações de 11 a 13 foram calculados os valores da integral de sobreposição (J), a energia de transferência (E), a distância crítica (R_0) e a distância média (r), os quais estão apresentados na Tabela 5. A integral de sobreposição espectral foi calculada utilizando a ferramenta de integração do programa Origin 4.0 (Microcal Software INC., EUA).

Tabela 5: Dados referentes aos cálculos de FRET em 298 K: integral de sobreposição (J), energia de transferência (E), distância crítica (R_0) e distância média (r).

Flavonóide	J ($cm^3 L mol^{-1}$)	E	R_0 (nm)	r (nm)
Rutina	$2,1 \times 10^{-14}$	0,6	2,5	2,4
Guaijaverina	$3,0 \times 10^{-14}$	0,6	2,7	2,5

De acordo com dados da Tabela 5, a distância média entre o doador (HSA-*Trp214*) e o aceitador (Ru e Gua) está dentro da escala de 2,0 a 8,0 nm (WEISS, 1999), indicando que pode ocorrer uma provável transferência de energia entre o resíduo de *Trp214* da HSA e os flavonóides.

5.5 Cálculos *Ab Initio*

Os cálculos *ab initio* foram realizados utilizando a série de programas Gaussian 98 (FRISCH et al., 1998). A estrutura otimizada foi calculada para as moléculas de flavonóides na fase gasosa isolada (no vácuo) usando o funcional B3LYP com o conjunto base 6-31G(d,p), sem qualquer restrição de simetria.

O valor da diferença de energia entre os orbitais moleculares HOMO e LUMO é uma propriedade molecular e está relacionada a uma aproximação da primeira energia

de excitação eletrônica (ZHAN et al., 2003; KAVITHA et al., 2010). As diferenças de energias HOMO-LUMO ($\Delta E_{gap} = E_{LUMO} - E_{HOMO}$) da Rutina e da Guaijaverina são aproximadamente de 3,960 e 3,812 eV, correspondente aos comprimentos de onda de 313 e 326 nm, respectivamente. Os comprimentos de ondas caracterizam a transição HOMO→LUMO, os quais se encontram na extensão do espectro de absorbância experimentais de ambos os flavonóides, como pode ser visto nos espectros B da Figura 14. Portanto, os resultados dos cálculos *ab initio* da Rutina e da Guaijaverina (na fase gasosa) são corroborados com o perfil das bandas de absorção obtida experimentalmente para cada flavonóide. Tal abordagem indica que a geometria otimizada é razoavelmente aceita para o próximo passo da descrição da interação entre a HSA e os flavonóides.

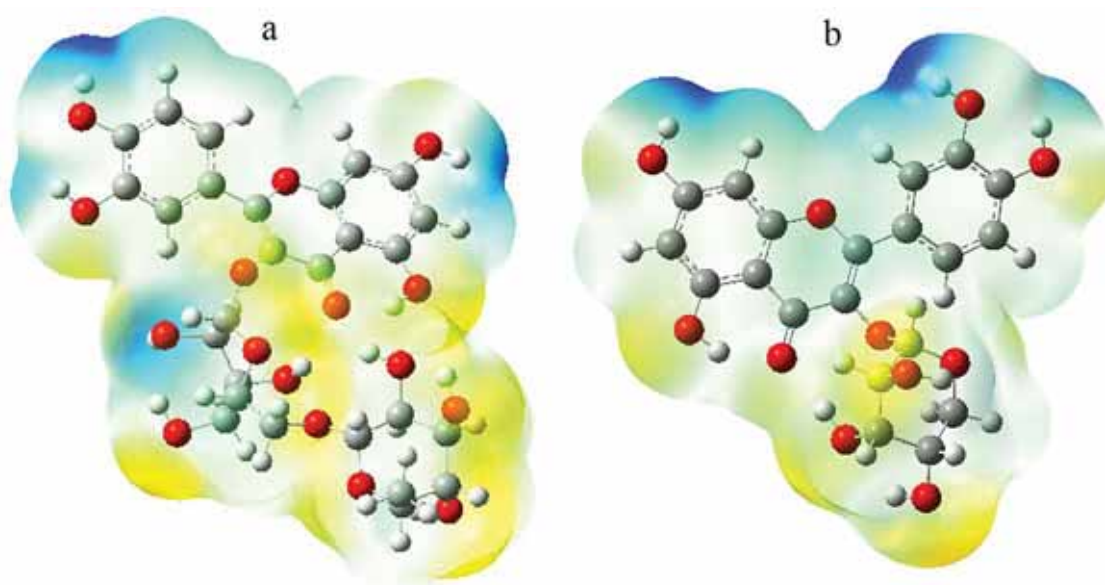


Figura 15: Potencial eletrostático molecular da Rutina (a) e da Guaijaverina (b), regiões eletropositivas (azul) e eletronegativas (amarelo).

A Figura 15 mostra o potencial eletrostático molecular (MEP) para os flavonóides. O MEP consiste basicamente da energia potencial de uma carga teste de próton em uma

localização particular próximo a uma molécula. De acordo com a Figura 15, pode-se observar que tanto o MEP da Rutina quanto da Guaijaverina revela uma majoritária distribuição de carga positiva ao redor do flavonol Quercetina, enquanto que uma majoritária distribuição de carga negativa é encontrada ao redor da Rutinose (Ru) e da Arabinose (Gua). As regiões transparentes ou de menor coloração amarelada ou azulada representam porções neutras (não polares), essas porções se encontram principalmente na mesma região compreendida entre os dois anéis benzenos do flavonol Quercetina.

As regiões de distribuições de cargas positivas (flavonol Quercetina) e negativas (Rutinose e Arabinose) reveladas pelos potenciais eletrostáticos moleculares de ambos os flavonóides, sugerem que as interações eletrostáticas podem desempenhar um papel importante na complementaridade de distribuição de cargas na formação dos complexos HSA-flavonóides. Enquanto que na região cuja distribuição a carga é neutra (entre os anéis benzenos) podem estar envolvida em interações hidrofóbicas.

5.6 Cálculos de Modelagem Molecular

Para os cálculos de modelagem molecular foram utilizados a estrutura cristalina da HSA obtida do *Protein Data Bank* com o código de PDB 1AO6 (SUGIO et al., 1999) e as geometrias otimizadas dos flavonóides determinadas a partir dos cálculos *ab initio*. Frente aos resultados experimentais a grade dos mapas de ligação da HSA com a Rutina e a Guaijaverina utilizando a ferramenta de modelagem molecular foi restrita ao microambiente onde se localiza o *Trp214*. As figuras 16 (Ru) e 17 (Gua) mostram os resultados para as melhores energias de ligação teóricas calculadas pelas simulações de modelagem molecular, para 30 diferentes conformeros gerados. As melhores energias de ligação da interação da HSA com a Rutina e a Guaijaverina foram $-31,8$ e $-29,3 \text{ kJmol}^{-1}$, respectivamente, o que está em bom acordo com os resultados

experimentais apresentados na análise dos parâmetros termodinâmicos (Ru: $-32,0$ e Gua: $-30,3 \text{ kJmol}^{-1}$ em 298 K), seção 4.2 de Resultados e Discussões, indicando que também o complexo HSA-Ru tem sua formação mais favorecida do que o complexo HSA-Gua.

As constantes de ligação teóricas podem ser calculadas a partir das energias de ligação teórica obtidas dos cálculos de modelagem molecular de acordo com a seguinte equação:

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta G_b}{RT}\right) \quad (41)$$

sendo K a constante de ligação teórica, R a constante dos gases universal ($8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T a temperatura e ΔG_b a energia de ligação teórica. Os valores de K obtidos para a Rutina e a Guaijaverina foram $3,8 \times 10^5$ e $1,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente, o que está em boa concordância com os valores de K_a (Ru: $4,0 \times 10^5$ e Gua: $2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ em 298 K) determinados experimentalmente para a interação HSA-flavonóides.

Tanto a Figura 16.a (Ru) quanto a Figura 17.a (Gua) mostram que os flavonóides estão situados no sítio I da HSA, dentro do bolso hidrofóbico do subdomínio IIA, o qual é formado por um conjunto de seis hélices. Os cálculos de modelagem molecular indicam que os flavonóides se localizam próximos do resíduo de triptofano *Trp214*, o que está de bom acordo com os resultados obtidos experimentalmente para a supressão de fluorescência da HSA pelos flavonóides, seção 4.1 de Resultados e Discussão.

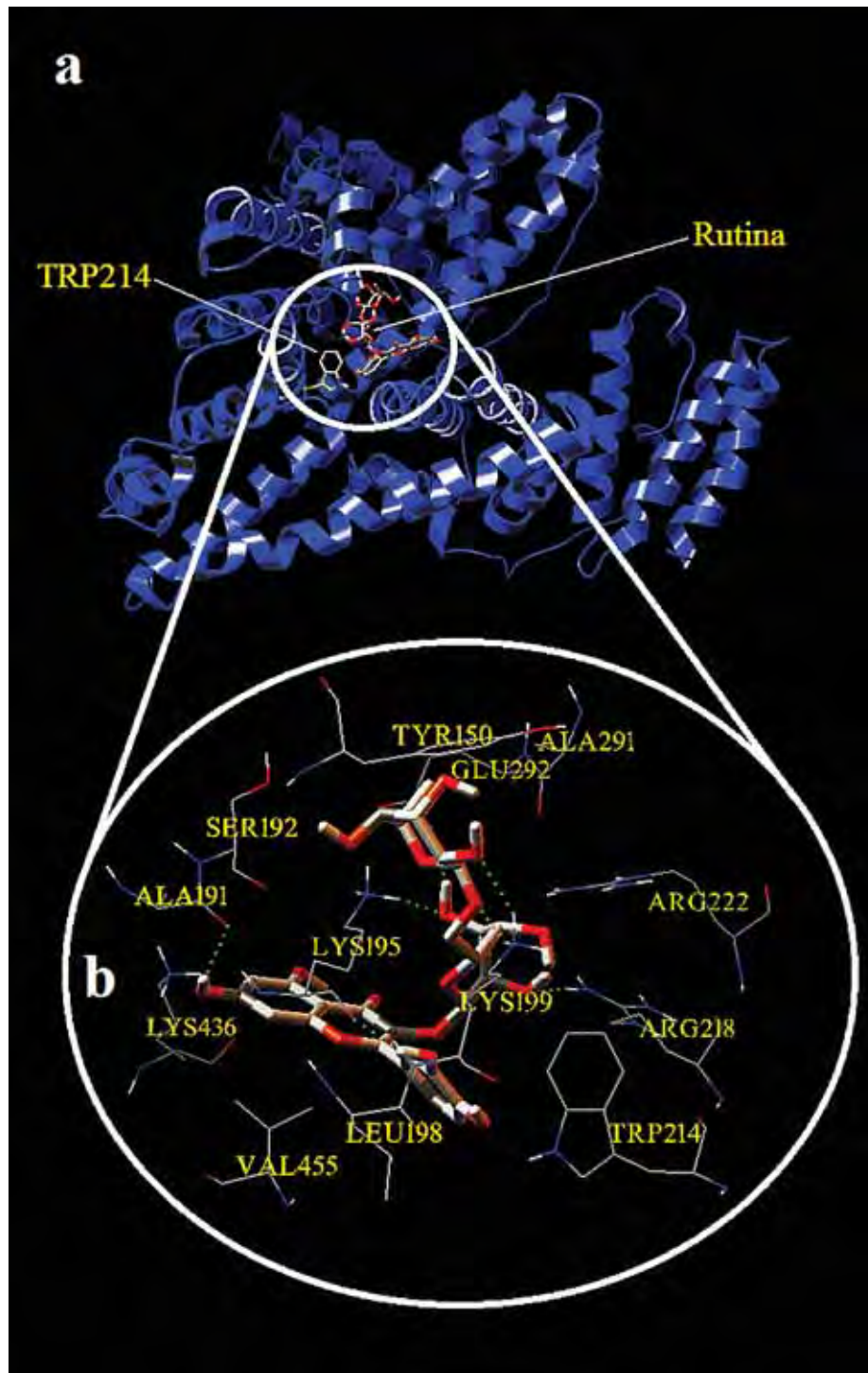


Figura 16: (a) Localização da molécula de Rutina próxima ao único resíduo de triptofano da HSA (*Trp214*) no subdomínio IIA (sítio I). (b) Detalhes estruturais da interação entre a HSA e a Rutina obtidos pelo método de modelagem molecular. A Rutina é representada utilizando o modelo de cilindros (C, cinza; O, vermelho; N, azul; H, branco), os resíduos de aminoácidos são denotados como modelo de *wireframe* e as pontes de hidrogênio representadas linhas pontilhadas verdes.

A Figura 16.b mostra os detalhes do bolso hidrofóbico de interação da Rutina e a HSA. Um primeiro conjunto de resíduos de cadeia lateral hidrofóbica (*Leu198*, *Trp214*, *Val455*) contribuem para a interação com o flavonol Quercetina, o qual apresenta uma região neutra entre os anéis benzenos, como pode ser observado na Figura 15.a. Esta propriedade do flavonol Quercetina corresponde corretamente ao microambiente dos resíduos hidrofóbicos que ajudam a estabilizar a interação HSA-Ru. Em particular os resíduos de cadeia lateral apolar *Ala191* e *Ala291* não participam exclusivamente de interações hidrofóbicas, mas também das interações eletrostáticas, visto que o oxigênio da cadeia principal do resíduo *Ala191* participa da formação de uma ligação de hidrogênio com a Rutina (H7) e o resíduo *Ala291* se encontra nas proximidades da Rutinose. Um segundo conjunto de resíduos de cadeia lateral polar (*Tyr150*, *Lys195*, *Ser192*, *Lys199*, *Arg218*, *Arg222*, *Glu292*, *Lys436*) é responsável por estabilizar as regiões de distribuições de cargas eletropositivas e eletronegativas da Rutina e pela formação de pontes de hidrogênio, as quais estão caracterizadas na Tabela 6. O ligante (Ru) como um todo ajusta sua arquitetura molecular com o sitio I da HSA com a vantagem da glicosilação, que propriamente tem potencial eletrostático molecular negativo (ver Figura 15.a).

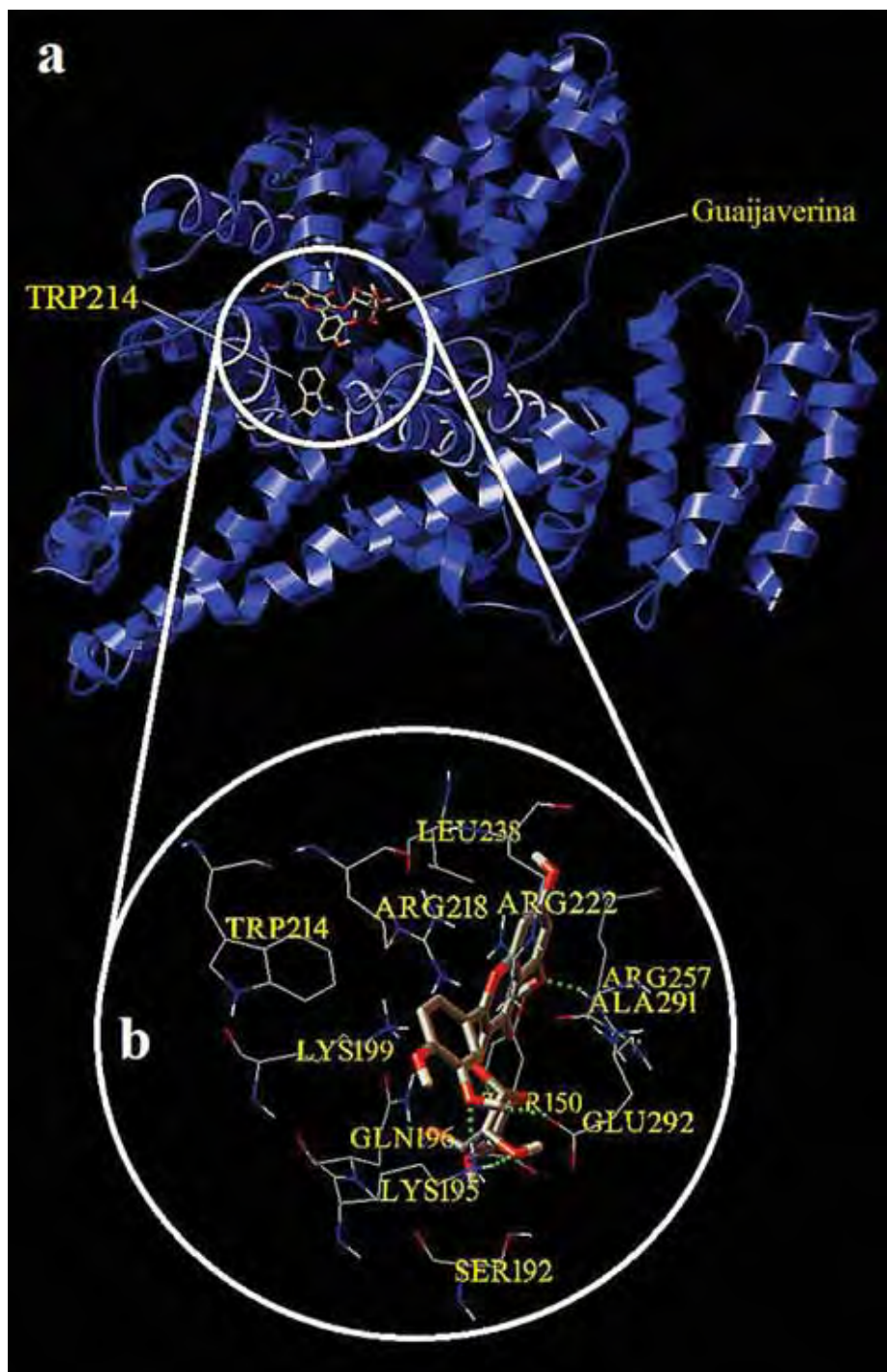


Figura 17: (a) Localização da molécula de Guaijaverina próxima ao único resíduo de triptofano da HSA (*Trp214*) no subdomínio IIA (sítio I). (b) Detalhes estruturais da interação entre a HSA e a Guaijaverina obtidos pelo método de modelagem molecular. A Guaijaverina é representada utilizando o modelo de cilindros (C, cinza; O, vermelho; N, azul; H, branco), os resíduos de aminoácidos são denotados como modelo de *wireframe* e as pontes de hidrogênio representadas linhas pontilhadas verdes.

A Figura 17.b mostra os detalhes do bolso hidrofóbico de interação da Guaijaverina e a HSA. Um primeiro conjunto de resíduos de cadeia lateral hidrofóbica (*Trp214*, *Leu238*, *Ala291*) contribuem para a interação com o flavonol Quercetina, o qual apresenta uma região neutra entre os anéis benzenos, como pode ser observado na Figura 15.b. Esta propriedade do flavonol Quercetina corresponde corretamente ao microambiente dos resíduos hidrofóbicos que ajudam a estabilizar a interação HSA-Gua. Um segundo conjunto de resíduos de cadeia lateral polar (*Tyr150*, *Ser192*, *Lys195*, *Gln196*, *Lys199*, *Arg218*, *Arg222*, *Arg257*, *Glu292*) é responsável por estabilizar as regiões de distribuições de cargas eletropositivas e eletronegativas da Guaijaverina e pela formação de pontes de hidrogênio, as quais estão caracterizadas na Tabela 6. O ligante (Gua) como um todo ajusta sua arquitetura molecular com o sítio I da HSA com a vantagem da glicosilação Arabinose, que propriamente tem potencial eletrostático molecular negativo (ver Figura 15.b).

Tabela 06: Resíduos de aminoácidos da HSA e átomos dos flavonóides envolvidos nas ligações de hidrogênio obtidas dos cálculos de modelagem molecular.

Rutina			Guaijaverina		
Resíduos de Aminoácidos	Átomos da Rutina	Distância (Å)	Resíduos de Aminoácidos	Átomos da Guaijaverina	Distância (Å)
<i>Ala191</i>	H7	2,158			
<i>Lys195</i>	H3'	1,989	<i>Lys195</i>	O3'	1,879
<i>Lys195</i>	O3''	1,969	<i>Lys195</i>	O2''	1,921
<i>Lys199</i>	O6''	1,814			
<i>Lys199</i>	O2'''	2,142	<i>Arg257</i>	O5	1,877
<i>Arg218</i>	O2''	2,050			
<i>Glu292</i>	H3''	1,924	<i>Glu292</i>	H3'	1,926

A análise dos detalhes estruturais dos resíduos de aminoácidos envolvidos na interação HSA-flavonóides mostra que os resultados da modelagem molecular para a

Rutina e Guajaverina indicam que a interação tem uma contribuição hidrofóbica, com formação de ligações de hidrogênio e complementaridade das distribuições de cargas positivas e negativas proporcionada pelas interações eletrostáticas, o que está em boa concordância com a análise dos parâmetros termodinâmicos apresentados na seção 4.2 de Resultados e Discussões.

6 Conclusão

A interação entre os flavonóides (Ru e Gua) e a HSA foi investigada usando espectroscopia de fluorescência no estado estacionário em combinação com cálculos *ab initio* e de modelagem molecular. Foi observado usando a supressão de fluorescência que o mecanismo mais provável para a interação dos flavonóides com a HSA é o processo estático. Esse resultado indica que os flavonóides se ligam ao sítio I da HSA e a interação ocorre próximo ao resíduo *Trp214*, o qual está localizado dentro do bolso hidrofóbico do subdomínio IIA. Os dados de fluorescência mostram que a Rutina suprime a emissão do *Trp214* com maior eficiência do que a Guajaverina e que o complexo HSA-Gua é mais estável termicamente do que o complexo HSA-Ru. Os valores da energia livre de Gibbs indicam que a interação é espontânea ($\Delta G < 0$), com a formação do complexo HSA-Ru sendo mais favorável do que do complexo HSA-Gua. Os sinais dos parâmetros termodinâmicos entálpicos ($\Delta H < 0$) e entrópicos ($\Delta S > 0$) para ambos os flavonóides, indicam que as interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio devem desempenhar um papel importante no direcionamento e na estabilização dos complexos formados. Na formação dos complexos, os dados experimentais indicam que um único flavonóide se liga ao sítio I da HSA. As prováveis distâncias médias entre o doador (HSA-*Trp214*) e o aceitador

Rutina e Guaijaverina calculadas pela teoria de FRET foram de 2,4 e 2,5 nm, respectivamente. Os estudos de modelagem molecular indicam que a Rutina e a Guaijaverina se ligam na proximidade do resíduo *Trp214* e esse resultado está em acordo com os dados de espectroscopia de fluorescência. Os valores de energias e de constantes de ligações experimentais e teóricos apresentam boa concordância. A configuração do microambiente de ligação sugerida pelo cálculo de modelagem molecular correlaciona com as distribuições de cargas da Rutina e da Guaijaverina demonstradas pelo MEP que se ajusta a análise dos parâmetros termodinâmicos.

O presente estudo traz significativa contribuição para o entendimento do mecanismo de transporte dos flavonóides desempenhado pela principal proteína do soro humano, a HSA. O trabalho caracteriza em nível molecular a interação da Rutina e da Guaijaverina com a HSA, fornecendo uma ampla descrição de como a HSA carregaria os flavonóides através do fluxo sanguíneo e, com isso, esses compostos fenólicos seriam disponibilizados para suas atividades fins.

7 Referências Bibliográficas

- ANDERSEN, Ø. M.; Markham, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006.
- BI, S; DING, L.; TIAN, Y.; SONG, D.; ZHOU, X.; LIUA, X.; ZHANG, H. Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 703, p. 37-45, 2004.
- BOHM, B. A. **Introduction to flavonoids**. Amsterdam: Chemistry and biochemistry of organic natural products, v.2, 1998.
- BOLLI, A.; MARINO, M.; RIMBACH, G.; FANALI, G.; FASANO, M.; ASCENZI, P. Flavonoid binding to human serum albumin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, p. 444-449, 2010.
- BORN, M.; OPPENHEIMER, R. Zur Quantentheorie der Molekeln. **Annalen der Physik**, v. 84, p. 457-484, 1927.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

CUSHNIE, T. P.; LAMP, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DUFOUR, C.; DANGLES, O. Flavonoids-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1721, p. 164-173, 2005.

EL KHADEM, H.; MOHAMMED, Y. S. Constituents of the Leaves of *Psidium guajava*, L. Part II. Quercetin, Avicularin, and Guaijavarin. **Journal of the Chemical Society**, p. 3320-3323, 1958.

EWING, G. W. **Métodos Instrumentais de Análise Química**. São Paulo: Edgard Blücher: EDUSP, v. 2, 1972

FABJAN, N.; ROLE, J.; KOSIR, I. J.; WANG, Z.; ZHANG, Z.; KREFT, I. Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum Gaertn.*) as a Source of Dietary Rutin and Quercetin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6452-6455, 2003.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 89-111, 2001.

FOESMAN, J. B.; FRISCH, AE. **Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods**. Pittsburgh, PA: Gaussian, Inc., 2nd ed., 1995.

FÖRSTER, T. Intermolecular Energy Migration and Fluorescence. **Annals of Physics**, v. 2, p. 55-75, 1948.

FRAISSE, D.; HEITZ, A.; CAMAT, A.; CAMAT, A. -P.; LAMAISON, J. -L. Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 463-464, 2000.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; ZAKZEWSKI, V. G.; MONTGOMERY, J. A.; STRATMANN, Jr. R. E.; BURANT, J. C.; DAPPRICH, S.; MILLAM, J. M.; DANIELS, A. D.; KUDIN, K. N.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; TOMASI, J.; BARONE, V.; COSSI, M.; CAMMI, R.; MENNUCCI, B.; POMELLI, C.; ADAMO, C.; CLIFFORD, S.; OCHTERSKI, J.; PETERSSON, G. A.; AYALA, P. Y.; CUI, Q.; MOROKUMA, K.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FOESMAN, J. B.; CIOSLOWSKI, J.; ORTIZ, J. V.; BABOUL, A. G.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; GOMPERTS, R.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; ALLAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; ANDRES, J. L.; GONZALEZ, C.; HEAD-GORDON, M.; REPLOGLE, E. S.; POPLER, J. A. *Gaussian 98*, Revision A. 9, Inc., Gaussian: Pittsburgh, PA, 1998.

GHUMAN, J.; ZUNZAIN, P. A.; PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A.; OTAGIRI, M.; CURRY, S. Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin. **Journal of Molecular Biology**, v. 353, p. 38-52, 2005.

GROTEWOLD, E. **The Science of Flavonoids**. Columbus: Springer, 2006.

HALL, G. G. The Molecular Orbital Theory of Chemical Valency. VIII. A Method of Calculating Ionization Potentials. **Proceedings of the Royal Society London A**, v. 205, p. 541-552, 1951.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous electron gas. **Physical Review**, v. 136, n. 3B, p. B864-B871, 1964.

HU, Y. J.; LI, W.; LIU, Y.; DONG, J. X.; QU, S. S. Fluorometric investigation of the interaction between Methylene Blue and Human Serum Albumin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 740-745, 2005.

HU, Y. J.; LIU, Y.; WANG, J. B.; XIAO, X. H.; QU, S. S. Study of the interaction between Monoammonium Glycyrrhizinate and Bovine Serum Albumin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 915-919, 2004.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSSELL, D. S. Software News and Update, A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, p. 1145-1152, 2007.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RINCÓN, M.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) as a New Source of Antioxidant Dietary Fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5489-5493, 2001.

JURASEKOVA, Z.; MARCONI, G.; SANCHEZ-CORTES, S.; TORREGGIANI, A. Spectroscopic and Molecular Modeling Studies on the Binding of the Flavonoid Luteolin and Human Serum Albumin. **Biopolymers**, v. 91, n. 11, p. 917-927, 2009.

KANAKIS, C. D.; TARANTILIS, P. A.; POLLISIOU, M. G.; DIAMANTOGLU, S.; TAJMIR-RIahi, H. A. Antioxidant flavonoids bind Human Serum Albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 798, p. 69-74, 2006.

KAVITHA, E.; SUNDARAGANESAN, N.; SEBASTIAN, S. Molecular Structure, vibrational spectroscopy and HOMO, LUMO studies of 4-nitroaniline by density functional method. **Indian Journal of Pure and Applied Physics**, v. 48, p. 20-30, 2010.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Physical Review**, v. 140, n. 4A, p. A1133-A1138, 1965.

KREWSON, C. F.; COUCH, J. F. Isolation of Rutin from a Citrus Hybrid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 70, p. 257-258, 1948.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. New York: Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, 2nd ed., 1999.

LAKOWICZ, J. R.; WEBER, G. Quenching of Fluorescence by Oxygen. A Probe for Structural Fluctuations in Macromolecules. **Biochemistry**, v. 12, p. 4161-4170, 1973.

LECKBAND, D. Measuring the Forces that Control Protein Interactions. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 29, p. 1-26, 2000.

LEESE, R. A.; WEHRY, E. L. Corrections for Inner-Filter Effects in Fluorescence Quenching Measurements via Right-Angle and Front-Surface Illumination. **Analytical Chemistry**, v. 50, p. 1193-1197, 1978.

LEVINE, I. N. **Quantum Chemistry**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 4th ed., 1991.

LIU, E. H.; QI, L. W.; LI, P. Structural Relationship and Binding Mechanisms of Five Flavonoids with Bovine Serum Albumin. **Molecules**, v. 15, p. 9092-9103, 2010.

LIU, E. H.; QI, L. W.; LI, P. Structural Relationship and Binding Mechanisms of Five Flavonoids with Bovine Serum Albumin. **Molecules**, v. 15, p. 9092-9103, 2000.

LU, Y.; WANG, Y. L.; GAO, S. H.; WANG, G. K.; YAN, C. L.; CHEN, D. J. Interaction of Quercetin with Ovalbumin: Spectroscopic and Molecular Modeling Studies. **Journal of Luminescence**, v. 129, p. 1048-1054, 2009.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MINGHETTI, P. P.; RUFFNER, D. E.; KUANG, W. J.; DENNISON, O. E.; HAWKINS, J. W.; BEATTIE, W. G.; DUGAICZYK, A. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, pp. 6747-6757, 1986.

MISHRA, B.; BARIK, A.; PRIYADARSINI, K. I.; MOHAN, H. Fluorescence spectroscopic on binding of a flavonoid antioxidant quercetin to serum albumins. **Journal of Chemical Sciences**, v. 117, n. 6, p. 641-647, 2005.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**, São Paulo: Editora Livraria da Física, 1nd ed., 2007.

MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; PIQUE, M. E.; LINDSTRON, W.; HUEY, R.; FORLI, S.; HART, W. E.; HALLIDAY, S.; BELEW, R.; OLSON, A. J. **User Guide, AutoDock Version 4.2: Automated Docking of Flexible Ligands to Flexible Receptor**. La Jolla: The Scripps Research Institute, 2010.

SHEU, J. R.; HSIAO, G.; CHOU, P. H.; SHEN, M. Y.; CHOU, D. S. Mechanisms Involved in the Antiplatelet Activity of Rutin, a Glycoside of the Flavonol Quercetin, in Human Platelets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4414-4418, 2004.

PAINTER, L.; HARDING, M. M.; BEEBY, P. J. Synthesis and interaction with Human Serum Albumin of the first 3,18-disubstituted derivative of Bilirubin. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 18, p. 3041-3044, 1998.

PASTUKHOV, A. V.; LEVCHENKO, L. A.; SADKOV, A. P. Spectroscopy study on binding of Rutin to Human Serum Albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 842, p. 60-66, 2007.

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

PRABU, G. R.; GNANAMANI, A.; SADULLA, S. Guaijaverin – a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 487-495, 2006.

ROOTHAAN, C. C. J. New Developments in Molecular Orbital Theory. **Reviews of Modern Physics**, v. 23, p. 69-89, 1951.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: Bioavailability metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAM, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. **Biochemistry**, v. 20, p. 3096-3102, 1981.

SANNER, M. F. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. **Journal of Molecular Graphics and Modeling**, v. 17, p. 57-61, 1999.

SANTOS, P. M. L.; SCHRIPEMA, J.; KUSTER, R. M. Glycosyl flavonoids from *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 321-325, 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre: Bookma, 5th ed., 2002.

SOUZA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Protein-ligand docking: current status and future challenges. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, p. 15-26, 2006.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. **Molecular Pharmacology**, v. 11, p. 824-832, 1975.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. Further Characterization of Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. **Molecular Pharmacology**, v. 12, p. 1052-1061, 1976.

SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIKUZI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. Cristal structure of Human Serum Albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Engineering**, v. 12, p. 439-446, 1999.

SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIKUZI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. Cristal structure of Human Serum Albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Engineering**, v. 12, p. 439-446, 1999.

WARE, W. R. Oxygen Quenching of Fluorescence in Solution: An Experimental Study of the Diffusion Process. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 66, p. 455-458, 1962.

WANG, M.; TADMOR, Y.; WU, Q. L.; CHIN, C. K.; GARRISON, S. A.; SIMON, J. E. Quantification of Protodioscin and Rutin in Asparagus Shoots by LC/MS and HPLC Methods. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 51, p. 6132-6136, 2003.

WEISS, S. Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules. **Science**, v. 283, p.1676-1683, 1999.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of Rutin. **LWT**, v. 41, p. 1060-1066, 2008.

ZHAN, C. G.; NICHOLS, J. A.; DIXON, D. A. Ionization Potential, Electron Affinity, Electronegativity, Hardness, and Electron Excitation Energy: Molecular Properties from Density Functional Theory Orbital Energies. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 107, p. 4184-4195, 2003.

ZHANG, Y.; LI, Y.; DONG, L.; LI, J.; HE, W.; CHEN, X.; HU, Z. Investigation of the interaction between naringin and human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 875, p. 1-8, 2008.

ZSILA, F.; BIKÁDI, Z.; SIMONYI, M. Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modeling methods. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 447-456, 2003.