

**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” - IBILCE**

CINTIA RAMOS CAMARGO

**Caracterização espectral e computacional da interação de derivados de
benzoil-tiraminas e albumina humana**

São José do Rio Preto
2017

CINTIA RAMOS CAMARGO

Caracterização espectral e computacional da interação de derivados de benzoil-tiraminas e albumina humana

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - IBILCE, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio.

São José do Rio Preto
2017

Camargo, Cintia Ramos.

Caracterização espectral e computacional da interação de derivados de benzoil-tiraminas e albumina humana/ Cintia Ramos Camargo. -- São José do Rio Preto, 2017
64 f. : il.

Orientador: Marinônio Lopes Cornélio

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Albumina. 4. Fluorescência. 5. Espectroscopia. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 577.3

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

CINTIA RAMOS CAMARGO

Caracterização espectral e computacional da interação de derivados de benzoil-tiraminas e albumina humana

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - IBILCE, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio

UNESP - São José do Rio Preto

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

USP - Ribeirão Preto

Prof. Dr. Hamilton Cabral

USP - Ribeirão Preto

Prof. Dr. Prof. Dr. Jose Ramon Beltran Abrego

UNESP - São José do Rio Preto

Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo

UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

2017

Dedico esse trabalho à minha família por ter me acompanhado nesta jornada

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio pela orientação, ensinamentos e apoio prestados durante este trabalho e por todos os anos de convivência, os quais foram muito importantes para meu desenvolvimento e amadurecimento profissional e pessoal.

Ao Ícaro pelos ensinamentos e colaboração para o desenvolvimento do trabalho.

À todos os amigos do laboratório do nosso grupo de pesquisa do departamento de Física que fizeram parte da minha vida acadêmica.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao professor Altair Benedito Moreira pelo uso do fluorímetro, apoiado pela Fapesp (Processo 2014/22400-3).

À minha família por todo apoio e companheirismo para que eu realizasse e concluísse mais essa etapa dos meus estudos

"O remédio para nossas preocupações consiste em estar inteiramente ocupado, realizando alguma coisa construtiva".

Maria Zownseand

RESUMO

A folha de louro verde brasileira, uma especiaria muito apreciada na cozinha local (*Aniba riparia*, Lauraceae), contém compostos químicos que apresentam derivados de benzoíla chamados riparinas, que possuem propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e ansiolíticas. No entanto, não está claro qual o tipo de interação que as riparinas desempenham com qualquer alvo molecular. Como um alvo rentável, a albumina de soro humano (HSA) é uma das principais proteínas extracelulares, com uma capacidade excepcional para interagir com várias moléculas, e também desempenha um papel crucial no transporte, distribuição e metabolismo de uma grande variedade de ligantes endógenos e exógenos. Para delinear o mecanismo de interação HSA-riparina, a espectroscopia e os métodos computacionais foram aplicados de forma sinérgica. Uma avaliação através de espectroscopia de fluorescência mostrou que a emissão, atribuída ao Trp 214, a 346 nm, diminuiu com as titulações das riparinas. Observou-se um mecanismo de supressão estática na ligação das riparinas à HSA. Os experimentos de fluorescência realizados em 298, 308 e 318 K possibilitaram a realização de análises termodinâmicas que indicassem uma reação espontânea na formação do complexo ($\Delta G < 0$). O experimento do balanço entálpico-entrópico e com um cálculo de modelagem molecular revelou que interações hidrofóbicas, ligação de hidrogênio e interações não específicas estão presentes para as riparinas I - III com a HSA. O conjunto de resultados das mudanças da fração de fluorescência obtidos através de Schatchard não foi conclusivo ao estabelecer que tipo de cooperatividade esteja presente na interação. Para esclarecer o complexo HSA-riparinas, a abordagem de Hill foi utilizada para distinguir o índice de afinidade e a constante de ligação. Observou-se uma correspondência entre as estruturas moleculares das riparinas, devido à presença do grupo hidroxila no anel B, com parâmetros termodinâmicos e índice de afinidade. Riparin III realiza uma ligação de hidrogênio intramolecular, que afeta o coeficiente de Hill e a constante de ligação. Portanto, a presença de grupos hidroxila é capaz de modular a interação entre riparinas e HSA. Os experimentos de competição de sítio indicaram o sítio I como sendo o mais acessado, e as ferramentas de modelagem molecular reforçavam os resultados experimentais detalhando a participação de resíduos.

Palavras-chave: riparina, albumina do soro humano, fluorescência, deslocamento de drogas.

ABSTRACT

The green Brazilian bay leaf, a spice much prized in local cuisine (*Aniba riparia*, Lauraceae), contains chemical compounds presenting benzoyl-derivatives named riparins, which have anti-inflammatory, antimicrobial and anxiolytic properties. However, it is unclear what kind of interaction riparins perform with any molecular target. As a profitable target, human serum albumin (HSA) is one of the principal extracellular proteins, with an exceptional capacity to interact with several molecules, and it also plays a crucial role in the transport, distribution, and metabolism of a wide variety of endogenous and exogenous ligands. To outline the HSA-riparin interaction mechanism, spectroscopy and computational methods were synergistically applied. An evaluation through fluorescence spectroscopy showed that the emission, attributed to Trp 214, at 346 nm decreased with titrations of riparins. A static quenching mechanism was observed in the binding of riparins to HSA. Fluorescence experiments performed at 298, 308 and 318 K made it possible to conduct thermodynamic analysis indicating a spontaneous reaction in the complex formation ($\Delta G < 0$). The enthalpy-entropy balance experiment with a molecular modeling calculation revealed that hydrophobic, hydrogen bond and non-specific interactions are present for riparin I - III with HSA. The set of results from fractional fluorescence changes obtained through Schatchard was inconclusive in establishing what kind of cooperativity is present in the interaction. To shed light upon the HSA-riparins complex, Hill's approach was utilized to distinguish the index of affinity and the binding constant. A correspondence between the molecular structures of riparins, due to the presence of the hydroxyl group in the B-ring, with thermodynamic parameters and index of affinity were observed. Riparin III performs an intramolecular hydrogen bond, which affects the Hill coefficient and the binding constant. Therefore, the presence of hydroxyl groups is capable of modulating the interaction between riparins and HSA. Site marker competitive experiments indicated Site I as being the most suitable, and the molecular modeling tools reinforced the experimental results detailing the participation of residues.

Keywords: riparin, human serum albumin, fluorescence, drug displacement.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Aniba Riparia</i>	15
Figura 2 - Estrutura química das riparinas I (A), II (B) e III (C).	16
Figura 3 - Estrutura da albumina do soro humano	18
Figura 4 - Diagrama de Jablonski.	20
Figura 5 - Espectros de emissão da fluorescência da HSA (4 μ M) obtidos em diferentes concentrações (0 a 8 μ M) da riparina I (a), II (b) e III (c), em 298 K. Incertos mostram a estrutura molecular correspondente de cada composto.	30
Figura 6: Espectros de emissão da fluorescência da HSA (4 μ M) obtidos em diferentes concentrações (0 a 8 μ M) da riparina I (a), II (b) e III (c), em 298 K, cujas emissões correspondentes ao sinal da riparina II e III foram subtraídas de fluorescência da HSA.	31
Figura 7 - Gráfico de Stern–Volmer referentes à supressão de fluorescência da HSA (4 μ M) na presença da riparina I (A), II (B) e III (C) em 298, 308 e 318 K	32
Figura 8 - Gráfico duplo logarítmico, obtidos a partir da supressão de fluorescência da (4 μ M) na presença da riparina I (A), II (B) e III (C) em 298, 308 e 318 K. Os insertos mostram os gráficos de Van't Hoff.	33
Figura 9 - supressão da fluorescência da HSA em diferentes concentrações (0-10 M) de riparina I (A), II (B) e III (C) na ausência e presença de marcadores de sítio (varfarina, laranja de metila ou ibuprofeno). [HSA] = [Marcador] = 4MM, pH 7 e 298 K.	35
Figura 10 - gráficos semilogarítmico da fluorescência titulação de (A) riparina I (B) II e (C) III com HSA em duas concentrações diferentes de proteína em 298 K. As linhas verticais indicam as concentrações totais de ligante $[L]_{T1}$ e $[L]_{T2}$ ao mesmo valor selecionado da mudança de fluorescência observada, marcada pela linha horizontal, ΔF_{OBS} , em que a média total de ligação de ligante é a mesma para as curvas de titulação.	37
Figura 11 - Conjuntos de pares de concentração (L_T ; M_T) para exemplificar a utilização da Equação 6, obtendo valores de Σv_i e $[L]_{livre}$ para (A) riparina I (B) II e (C) III.	38
Figura 12 - Gráficos de Scatchard da (A) riparina I, (B) riparina II e (C) riparina III com HSA.	39
Figura 13- (A) Localização das moléculas de riparina no subdomínio IIA (sítio I) da HSA, próximo do único resíduo de triptofano (TRP214). A proteína é mostrada como desenhos e as moléculas de riparina como esferas. Detalhe estrutural tridimensional de interação do microambiente de interação da riparina I (B), II (C) e III (D) com o sítio I da HSA obtido por	

cálculos de modelagem molecular. As moléculas de riparina são mostradas como bastões e esferas, os resíduos de aminoácidos são denotados como bastões (C, cinzento, O, vermelho, N, azul, H, branco) e as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares por linhas pontilhadas verde e vermelha, respectivamente. Representação bidimensional dos mapas de interação entre riparina I (E), II (F) e III (G) e resíduos do sítio I da HSA. A representação estrutural foi preparada utilizando Pymol (DELANO, 2002) e o mapa de interação foi calculado utilizando LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constante de Stern-Volmer (K_{SV}), constante biomolecular de supressão (K_Q), constante de ligação (K_A) e o número de sítios de ligação (n) da interação das riparinas I, II e III com a HSA. Os valores foram obtidos a partir da supressão da fluorescência da albumina humana em função da titulação das riparinas em 298, 308 e 318 K. 33

Tabela 2 - Parâmetros termodinâmicos dos complexos HSA- ligante em 298, 308 e 318 K 34

Tabela 3 - Coeficiente de Hill (n_H) e constante de ligação (K) obtida usando função de Hill para os sistemas HSA-riparina I- III. 40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Família Lauraceae	13
1.2 Albumina do soro humano	17
1.3 Espectroscopia de Fluorescência	19
2 OBJETIVO GERAL	21
2.1 Objetivos específicos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Químicos	22
3.2. Espectroscopia de Fluorescência	22
3.3 Experimentos de competição de sítio	23
3.4 Cálculo <i>Ab initio</i>	24
3.5 Cálculo de modelagem molecular	24
3.6 Métodos e Cálculos	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
4.1 Supressão da fluorescência da HSA sob adição das riparinas	29
4.2. Mecanismo de supressão de fluorescência	31
4.3. Parâmetros termodinâmicos e forças de ligação	34
4.4. Identificação dos sítios de ligação das riparinas na HSA	34
4.5. Função de densidade de ligação	36
4.6 Cálculo <i>Ab initio</i>	41
4.7 Cálculo de modelagem molecular	41
5. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE A - Espectro de absorção das riparinas e determinação de seus coeficientes de extinção molar	52
APÊNDICE B - Detalhes estruturais da estrutura otimizada das riparinas e mapa do potencial eletrostático (MEP) das moléculas de riparina.	55
APÊNDICE C - Artigo Publicado na <i>Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy</i> .	57

1 INTRODUÇÃO

Aniba riparia é uma espécie de planta nativa da Amazônia, pertencente à família *Lauraceae*, da qual as riparinas I, II e III podem ser isoladas. (DOS SANTOS et al., 2011). Estas substâncias, do ponto de vista fitoquímico, apresentam uma classe especial de alcaloides contendo uma função alcamida. As alcamidas são consideradas compostos bioativos com eficácia medicinal, aromatizante e no controle biológico (inseticida, bactericida); sendo, portanto, um grupo de metabólito de grande interesse atual (TORRES; CHAVEZ, 2001).

Estudos indicam que as riparinas apresentam diversas atividades biológicas: antimicrobiana, relaxante, antidepressiva e ansiolítica. No entanto, até o momento não estão claras as interações destes derivados de benzoíla com qualquer molecular específico; as investigações da bioatividade foram realizadas “*in vitro*” e em modelos animais, especialmente envolvendo roedores. Como um alvo factível, a albumina do soro humano (HSA) é uma das macromoléculas mais importantes e abundantes no sistema circulatório. A investigação da interação entre as riparinas I, II e III com a HSA contribui para a compreensão da afinidade riparina-proteína, bem como a disposição, transporte e metabolismo destas benzoil-tiraminas no nível molecular.

No presente estudo, a supressão do sinal de fluorescência foi empregada para analisar a interação das riparinas à HSA, em condições fisiológicas simuladas. Em particular, foi investigada a influência do padrão de hidroxilação, presente nas riparinas II e III, na característica de ligação com HSA e os sítios específicos de ligação de cada riparina na HSA. Os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para a compreensão do potencial das riparinas e os seus possíveis mecanismos de interação.

1.1 FAMÍLIA LAURACEAE

Consideradas uma das mais primitivas famílias pertencentes à divisão Magnoliophyta, a família *Lauraceae* é formada por cerca de 50 gêneros e 2500-3000 espécies de plantas encontradas em florestas tropicais e subtropicais. (DOS SANTOS et al., 2011). No Brasil, os domínios fitogeográficos destes vegetais são a Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal, onde habitam 24 gêneros e 441 espécies. As espécies são,

predominantemente, árvores e arbusto; exceto as plantas do gênero *Cassytha*, que são trepadeiras parasitas. (QUINET et al., 2015). Economicamente, as Lauraceae se destacam na fabricação de papel, indústria madeireira e construção civil. Os seus óleos essenciais e alcaloides são altamente usados na perfumaria, cosmetologia e farmacêutica. Algumas espécies - como a *Cinnamomum camphora*, *Ocotea aciphylla*, *O. spectabilis*, *O. pulchella*, *O. teleiandra*, *Laurus nobilis* e *Aniba riparia*- são empregadas na medicina popular; outras, são conhecidas mundialmente devido aos seus usos na culinária, como o abacate (*Persea americana*) e canela (*Cinnamomum zeylanicu*) (MARQUES, 2001; QUINET; ANDREATA, 2002). Neste cenário de ampla utilidade das espécies, associado à exploração econômica e a inexistência de programas efetivos de manejo florestal, um número elevado dessas estão ameaçadas de extinção (OLIVEIRA; MARCCUS, 2013).

1.1.1 *Aniba riparia*

O gênero *Aniba* compreende cerca de 40 espécies, das quais 29 são encontradas no Brasil, principalmente na Amazônia. (MARQUES; AZEVEDO, 2011; URBINATI et al., 2014; QUINET et al., 2015). Dentre estas, destaca-se a *Aniba riparia* (Ness) Mez (Figura 1), cujo extrato obtido do fruto verde possui atividade antimicrobiana comprovada contra *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (MARQUES, 2001).

Figura 1 - *Aniba Riparia*

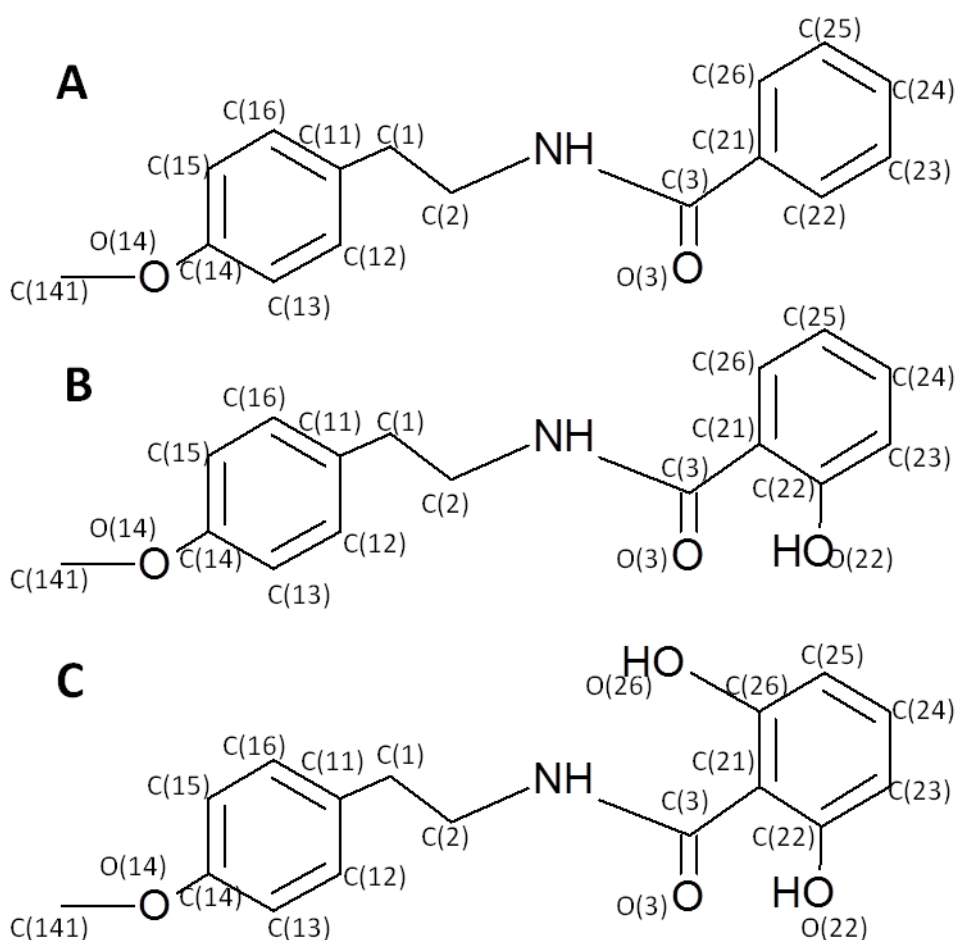


Fonte: *Aniba* in **Flora do Brasil 2020 em construção** (2017).

Popularmente conhecida no Brasil como “louro”, esta espécie é uma planta típica da região norte do país, encontrada nos estados Amazonas, Rondônia e Roraima. (SILVA et al., 2015; ANIBA, 2017). Os frutos desta angiosperma contêm diferentes componentes químicos, tais como flavonóides, neolignanas, stilipironas e alcanidas (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Estas últimas, formadas a partir de feniletilaminas naturais -como a tiramina e dopamina- com ácidos orgânicos, têm despertado amplo interesse farmacológico em virtude de apresentarem efeito notável sobre um organismo vivo, tecido ou células receptoras, mesmo em pequenas quantidades (OLIVEIRA, 2012).

A partir do fruto verde da *Aniba riparia*, podem ser isoladas as tiraminas conjugadas (Figura 2) N-benzoil-tiramina (riparina I) e os seus análogos N-2-hidroxi-benzoil-tiramina (riparina II) e N-2,6-dihidroxi-benzoil-tiramina (riparina III) (CASTELO-BRANCO et al., 2000). Resultados da condensação do éter metílico da tiramina (agente simpaticomimético) e do ácido salicílico (agente queratolítico e antimicótico), as riparinas - denominadas assim em referência à planta - denotam efeitos antimicrobiano, ansiolítico e amplo potencial terapêutico (CASTELO-BRANCO et al., 2000; CATÃO et al., 2010; DE CARVALHO et al., 2013)

Figura 2 - Estrutura química das riparinas I (A), II (B) e III (C).



Fonte: Adaptada de DE CARVALHO et al. (2013, p. 166).

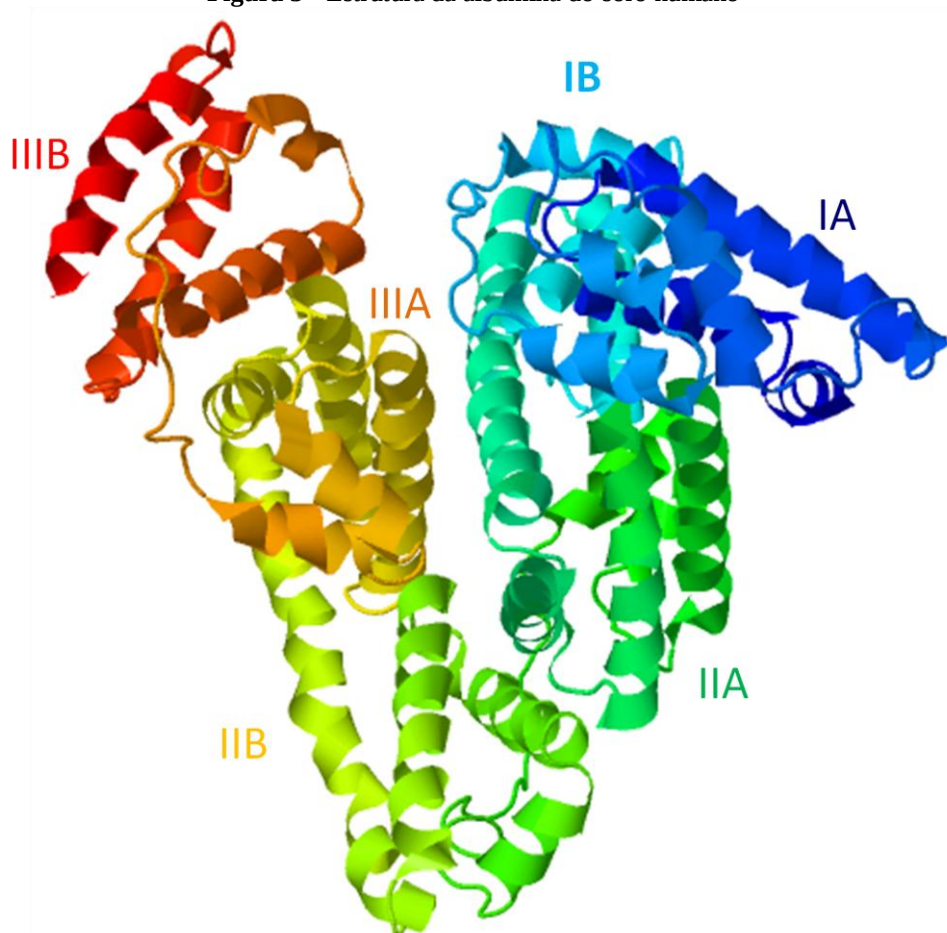
A riparina I demonstra atividade antinociceptiva (ARAÚJO et al., 2009), por exemplo, efeitos de antiansiedade em modelos animais, (DE SOUSA et al., 2005). A riparina II tem demonstrado efeito inibitório - direto ou indireto - sobre a atividade, produção ou

libertação de mediadores pró-inflamatórios envolvidos na geração de dor associada à inflamação, (DE CARVALHO et al., 2013) e significativa atividade antidepressiva, (TEIXEIRA et al., 2013). A riparina III, administradas intraperitonealmente ou oralmente, também mostra atividade antidepressiva e ansiolítica em roedores, (SOUSA et al., 2004; DE MELO et al., 2006, 2013). E, as três riparinas naturais demonstram atividade antimicrobiana em cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (CATÃO et al., 2010).

1.2 ALBUMINA DO SORO HUMANO

A albumina do soro humano (HSA, Figura 3) é uma proteína globular, monomérica, produzida no fígado. A HSA é constituída por 585 resíduos de aminoácidos e composta por três domínios helicoidais homólogos (denotados I, II e III), cada dividido em dois subdomínios (A e B), estruturalmente semelhantes (DOCKAL; CATER; RÜKER, 1999). Na HSA há um total de 17 pontes dissulfeto, um tiol livre de Cys34 e apenas um resíduo de triptofano (Trp) na posição 214 (Trp 214) localizado no subdomínio IIA (ZHANG; WILCOX, 2002; ZHANG; MA, 2013).

A proteína apresenta em sua estrutura sete sítios de ligação, sendo os sítios I e II, chamados Sudlow I e II. Estes estão localizados, respectivamente, nas cavidades hidrofóbicas dos subdomínios IIA e IIIA e, são os dois principais sítios de ligação para pequenas moléculas orgânicas. Recentemente, o subdomínio IB (sítio III) foi identificado como local de ligação primário ou secundário para alguns compostos (ZSILA, 2013).

Figura 3 - Estrutura da albumina do soro humano

Fonte: SUGIO et al (1999).

A HSA é uma importante e abundante proteína componente do plasma sanguíneo. Esta possui importantes funções fisiológicas como: contribuição para manutenção da pressão osmótica do plasma e regulação da concentração de fluídos em diferentes tecidos, devido à sua carga negativa. Ademais, a albumina é uma molécula de transporte, na qual a região exterior é essencialmente polar e a interior tem caráter hidrofóbico. Neste sentido, a proteína possui uma excepcional capacidade de interagir com uma variedade de moléculas - bilirrubina, hemina, tiroxina, compostos lipofílicos, por exemplo -, tendo papel fundamental no transporte, distribuição, metabolismo de ligantes endógenos e exógenos, (GELAMO; TABAK, 2000; PETITPAS et al., 2001).

Características estruturais dos compostos, especificamente o número e a configuração do radical hidroxila, influencia as características de ligação com a HSA. O radical OH também está associado com a reatividade das moléculas aromáticas e é importante para as suas atividades biológicas (HEIJNEN et al., 2001; WOODMAN; MEEKER; BOUJAOUDE, 2005; XIAO et al., 2008).

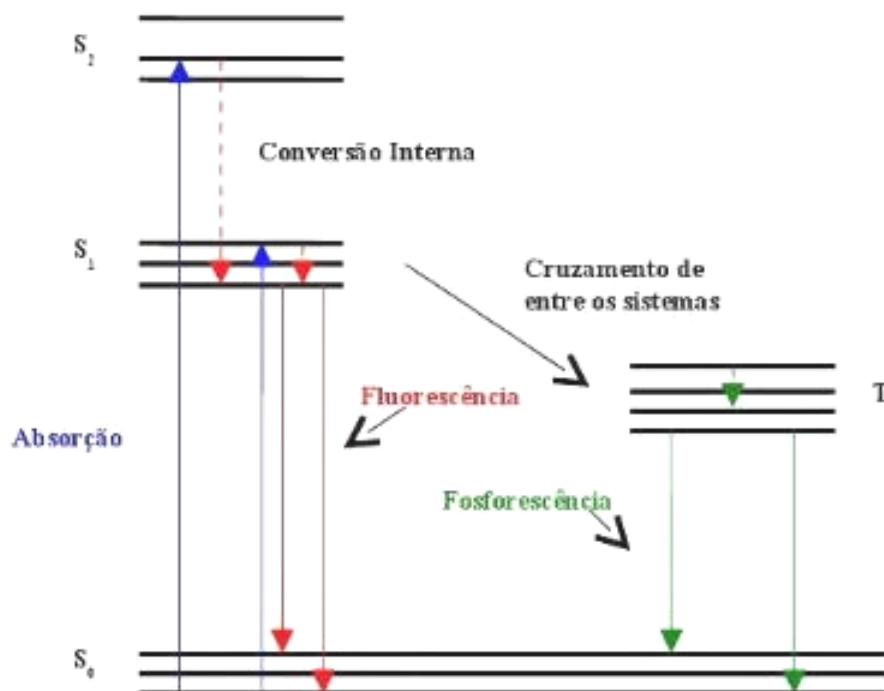
1.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica experimental muito empregada em sistemas biológicos, cujo princípio se baseia nas transições eletrônicas entre os estados excitados e o de menor energia. As moléculas (fluoróforos) em seu estado natural encontram-se no estado de menor energia - estado fundamental - e após absorverem radiação proveniente de uma fonte externa, como uma lâmpada incandescente ou um laser adquire uma nova configuração - estado excitado (S_1 , $S_2, \dots$).

No entanto, as moléculas não permanecem nos estados eletrônicos excitados. Assim, ao atingirem um dos níveis de vibração de um estado excitado as moléculas perdem rapidamente energia através de modos não radiativos (conversão interna) e decaem até o menor nível de vibração do menor estado eletrônico excitado. A partir deste nível, ao retornar ao estado fundamental, pode ocorrer emissão de energia (fóton) gerando o sinal de fluorescência, cuja taxa é tipicamente 10^{-8} s (LAKOWICZ, 1999). Na Figura 4 está disposto o diagrama de Jablonski, o qual ilustra este processo.

A transição não radiativa entre dois níveis vibracionais isoenergéticos pertencentes a estados eletrônicos de multiplicidades diferentes é denominada cruzamento intersistema (CIS). Uma molécula excitada para o nível vibracional S_1 pode mover-se para o nível vibracional isoenergético do estado tripleto (T), de modo que a relaxação vibracional promove-a para o nível vibracional mais baixo de T_1 . O estado tripleto é caracterizado pelo emparelhamento nos orbitais eletrônicos, ou seja, os spins dos elétrons estão paralelos. No caso em que a molécula entra em um estado excitado tripleto (T_1), o retorno desta para o estado fundamental (S_0) dá origem à fosforescência. Neste mecanismo, o intervalo de tempo entre a captação do fóton e a emissão da energia captada envolve tempos de até milissegundos (LAKOWICZ, 1999).

Figura 4 - Diagrama de Jablonski.



Fonte: Adaptado de Lakowicz (1999, p.557)

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica analítica que se baseia na fluorescência. Toda molécula fluorescente pode ser caracterizada por dois tipos de espectro: o de emissão e o de excitação. O espectro de excitação é um gráfico da intensidade de fluorescência emitida em função do comprimento de onda de excitação, em um comprimento de onda de emissão fixo. O gráfico da intensidade relativa da luz emitida em função do comprimento de onda emitido, em um comprimento de onda de excitação fixo é designado espectro de emissão. O comprimento de onda de emissão e a intensidade de fluorescência são determinados pela estrutura da molécula (LAKOWICZ, 1999).

1.3.1 FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA DEVIDA AO RESÍDUO DE TRIPTOFANO

As aplicações bioquímicas da técnica de fluorescência utilizam frequentemente moléculas que possuem fluorescência intrínseca. Em proteínas, os três aminoácidos

aromáticos - fenilalanina, tirosina e triptofano- são fluorescentes. A emissão de proteína é dominada pelo triptofano, que absorve no comprimento de onda mais longo e exibe o maior coeficiente de extinção. A emissão devida somente ao resíduo de triptofano ocorre próximo ao ultravioleta e pode ser seletivamente medida excitando a amostra em 295nm; nesse comprimento de onda não há absorção dos demais resíduos aromáticos (LAKOWICZ, 1999).

Uma característica valiosa da fluorescência intrínseca de proteínas é a elevada sensibilidade do resíduo de triptofano a perturbações em seu microambiente devidas às transições de conformação, ligação de substrato e desnaturação, por exemplo. Essas podem afetar o microambiente em torno do aminoácido e alterar o seu espectro de emissão. Em virtude disso, o espectro de emissão, anisotropia e a supressão dos resíduos de triptofano nas proteínas são altamente empregados para analisar estrutura, função de proteínas e reação de associação, (LAKOWICZ, 2006).

2 OBJETIVO GERAL

Investigar a afinidade das riparinas I, II e III com a HSA em condições fisiológicas simuladas empregando-se a espectroscopia de fluorescência e os métodos computacionais.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o modo de supressão da fluorescência da HSA devido à adição das riparinas I - III;
- Investigar a afinidade das riparinas com a HSA;
- Analisar a influência do padrão de hidroxilação, presente na riparina II e III, nas características de ligação com a HSA;
- Identificar o sítio de ligação específico para cada riparina na HSA;
- Delinear o mecanismo de interação HSA-riparina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 QUÍMICOS

As riparinas, para o estudo, foram extraídas por síntese orgânica e gentilmente cedidas por um de nossos colaboradores na forma pura e de acordo com a metodologia descrita na literatura (BARBOSA-FILHO; SILVA; BHATTACHARYYA, 1990). Albumina sérica humana, varfarina, ibuprofeno, alaranjado de metila, fosfato de sódio dibásico, metanol e cloreto de sódio (NaCl) foram adquiridos da *Sigma Aldrich Chemical Company* (EUA). Todos os outros produtos químicos são de grau analítico e a água ultrapura produzida pelo equipamento Milli-Q foi utilizada nos experimentos. A HSA foi dissolvida em solução tampão de fosfato 50 mM contendo NaCl (150 mM, pH 7.0). A concentração de proteína foi determinada espectrofotometricamente, utilizando o coeficiente de extinção molar de $36500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 280 nm (PAINTER; HARDING; BEEBY, 1998). As soluções estoque das riparinas I, II e III foram preparadas em metanol nas concentrações 23,8, 5,42 e 1,23 mM, respectivamente. As concentrações das riparinas I, II e III foram confirmadas espectrofotometricamente, utilizando os coeficientes de extinção molar de 34959, 22280 e $16198 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 225 nm, respectivamente, os quais foram determinados utilizando espectros de absorbância das riparinas, mostrados no Apêndice A.

3.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Os experimentos de fluorescência foram realizados no espectrofotômetro de fluorescência *Varian Cary Eclipse* equipado com células de quartzo de 1,0 cm e banho termostato *Siga Eclipse*. A fenda de excitação e de emissão, ambas, foram fixadas em 5,0 nm.

A emissão do triptofano (Trp 214) foi seletivamente medida excitando as amostras em 295 nm e os espectros de fluorescência foram registrados no intervalo 300 - 505 nm. Todas as intensidades de fluorescência foram corrigidas para o tampão e efeitos de filtro interno (Equação 1) (LAKOWICZ, 1999; WU et al., 2015; CARUSO et al., 2016).

$$F_{corr} = F_{obs} \times e^{(A_{ex}+A_{em})/2} \quad (1)$$

F_{corr} e F_{obs} são as intensidades de fluorescência corrigida e observada e A_{ex} e A_{em} são a absorbância do sistema no comprimento de onda de excitação e de emissão, respectivamente.

Nos experimentos de supressão de fluorescência a titulação do ligante foi realizada com a adição de quantidades apropriadas de solução estoque de riparina I, II e III à solução de HSA (2,0 mL) em concentrações constante de 2,0, 4,0 e 8,0 μM . Os ensaios, visando serem investigados através do método Stern - Volmer e do gráfico duplo- logarítmico, foram executados empregando-se solução de HSA 4 μM , riparina I, II e III variando de 0 à 8 μM , com incremento de 1 μM . Os experimentos foram realizados em temperaturas constantes de 298K, 308 e 318K. Os dados, cujas análises foram feitas pelo método Função de Densidade de Ligação, foram obtidos em 298 K, utilizando-se soluções de HSA 2 e 8 μM , riparina I, II e III na faixa de concentração de 0 - 12 μM , também com incremento de 1,0 μM .

Com o intuito de verificar o efeito do metanol como cosolvente, alíquotas deste álcool foram adicionadas à solução de HSA (2,0, 4,0 e 8,0 μM , em 298 K) de modo que a variação de volume correspondesse às utilizadas nos experimentos de titulação, nos quais as soluções de riparina I, II e III em metanol foram empregadas. O volume final de metanol na solução tampão foi <1%, em todos os experimentos.

3.3 EXPERIMENTOS DE COMPETIÇÃO DE SÍTIO

Os experimentos de competição de sítio foram efetuados empregando-se a varfarina, o ibuprofeno e o alaranjado de metila, os quais se ligam, respectivamente, ao sítio I, II e III da proteína do soro humano, (WYBRANOWSKI et al., 2008; ZSILA, 2013). As soluções de HSA contendo o marcador de sítio foram preparadas na proporção 1:1 (4,0 μM cada). A mistura foi homogeneizada por de 1h no escuro e a titulação da solução de riparina I, II e III (de 0 a 10 μM , com incrementos de 1,0 μM) foi feita. Os espectros de fluorescência foram registrados a temperatura de 298 K, sob as mesmas condições experimentais descritas anteriormente.

3.4 CÁLCULO AB INITIO

O programa Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009) fornecido pelo Núcleo de Computação Científica da Universidade Estadual Paulista (NCC / GridUNESP) foi aplicado para calcular as estruturas das riparinas. A geometria otimizada foi calculada na fase gasosa com as moléculas de riparina isoladas usando o método DFT / B3LYP / 6-31G (d, p). O cálculo da frequência vibracional foi realizado a fim de verificar a otimização das moléculas de riparina. O mapa de potencial eletrostático molecular (*Molecular Electrostatic Potential* – MEP) foi calculado para investigar a distribuição da densidade de carga na superfície molecular da riparina I, II e III.

3.5 CÁLCULO DE MODELAGEM MOLECULAR

A estrutura cristalina da HSA (PDB ID: 1AO6) (SUGIO et al., 1999) foi obtida no Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank, PDB*). As estruturas tridimensionais das moléculas de riparina foram obtidas a partir do programa Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009). O programa AutoDockTools (ADT) (SANNER, 1999) foi utilizado para preparar a HSA e as riparinas por fusão de átomos de hidrogênio não-polares, adicionando cargas parciais e tipos atômicos. A raiz rígida do ligante foi gerada automaticamente, definindo como ativa todas as ligações rotativas e as torções possíveis para as riparinas I e II; para a riparina III, a ligação C3-C21 foi definida como não rotativa, mantendo a ligação de hidrogênio intramolecular entre o átomo de hidrogênio H22 da hidroxila e o oxigênio O3 do grupo carbonila. Os mapas de redes foram gerados com um espaçamento de 0,375 Å e dimensões de 60 x 60 x 60 pontos pelo programa AutoGrid 4.2 (MORRIS et al., 1998), centrado no sítio I da estrutura da HSA. O programa AutoDock 4.2 (MORRIS et al., 1998) foi empregado para estudar o sítio de interação entre as riparinas e a HSA, aplicando o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) para minimização, usando 2,5 milhões como número de avaliações de energia, 150 como tamanho de população e tolerância desvio quadrático médio (*root-square-mean deviation, RMSD*) para análise de *cluster* de 2,0 Å. Posições de partida aleatórias em toda a superfície da proteína e orientações aleatórias foram utilizadas para os ligantes. Para cada simulação de acoplamento, foram gerados 100 confôrmeros diferentes. A representação estrutural foi

preparada usando PyMOL (DELANO, 2002), e o mapa de interação foi calculado usando LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).

3.6 MÉTODOS E CÁLCULOS

3.6.1. SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA NO ESTADO ESTACIONÁRIO

Os mecanismos de supressão da fluorescência são classificados como dinâmicos ou estáticos. O primeiro é devido a colisão entre o supressor e fluoróforo e, o último à formação de um complexo não fluorescente no estado fundamental. Estes dois mecanismos podem ser discriminados em resposta à temperatura. Os complexos ligados, para a supressão estática, tornam-se mais instáveis à medida que a temperatura aumenta e as constantes de supressão diminuem; comportamento oposto é observado para a supressão dinâmica. Os mecanismos de supressão tem sido amplamente analisados pelo modelo de Stern-Volmer (Equação 2) (LAKOWICZ, 1999):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [L] = 1 + K_{SV} [L] \quad (2)$$

F_0 e F representam as intensidades relativas de fluorescência antes e após a adição do supressor, respectivamente; K_q é a constante de velocidade biomolecular de supressão; τ_0 é o tempo de vida médio das biomoléculas na ausência de supressor, normalmente 10^{-8} s (LAKOWICZ, 1999); $[L]$ é a concentração do supressor e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer, a qual pode ser determinada pela regressão linear do gráfico F_0/F versus $[Q]$.

Em sistemas em que o mecanismo de supressão estático está envolvido na interação, a constante de associação (K_a) e o número de sítios (n) por molécula de proteína podem ser obtidos a partir do gráfico duplo logarítmico (BI et al., 2004):

$$\log \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = n \log K_a - n \log \left(\frac{1}{\left([L] - \frac{(F_0 - F)}{F_0} [P] \right)} \right) \quad (3)$$

na qual [P] é a concentração da proteína.

3.6.2 TERMODINÂMICA DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA COM O LIGANTE

Em geral, as forças que regem a interação entre uma molécula pequena e uma proteína incluem forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). Análises dos espectros de fluorescência obtidos em diferentes temperaturas permitem determinar os parâmetros termodinâmicos - mudanças de entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e energia livre (ΔG) - envolvidos na interação do ligante com a macromolécula. De acordo com as análises de Van't Hoff, se a entalpia não muda significativamente com o intervalo de temperatura aplicado experimentalmente, então, o valor de entropia pode ser obtido empregando-se a Equação 4

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

K_a é a constante de ligação na temperatura correspondente e R é a constante universal dos gases ($\sim 8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). A energia livre de Gibbs pode ser estimada a partir da Equação 5.

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

Os sinais e a magnitude dos parâmetros termodinâmicos ajudam a descrever a espontaneidade do processo de formação do complexo e a inferir a natureza das ligações que determinam a inserção do ligante no arcabouço proteico (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). O valor negativo para a energia de Gibbs indica que o processo entre o ligante e a macromolécula é espontâneo. Este é regido pela contribuição da entalpia para valores de $\Delta H \ll 0$, pela entropia para $\Delta H \geq 0$ e $\Delta S \gg 0$. Interações relacionadas, principalmente, com o termo da entalpia, são do tipo intermolecular, tais como: ligações de hidrogênio, interações eletrostática e de Van der Waals; reorganização do solvente é associada à entropia. Assim, valores positivos para ΔH e ΔS evidenciam interações hidrofóbicas e quando negativos, para ambos parâmetros, sugerem ligação de hidrogênio ou interações de Van der Waals; interações

eletrostáticas entre as espécies iônicas presentes na solução aquosa são caracterizadas por $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ (CARUSO et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

3.6.3 FUNÇÃO DE DENSIDADE DE LIGAÇÃO

Isotérmicas de ligação de equilíbrio podem fornecer informações sobre a estequiometria de ligação e a afinidade macroscópica entre o ligante e a macromolécula. O método gráfico função de densidade de ligação (BDF, do inglês, *binding density function*) permite obter quantitativamente parâmetros de interação entre o ligante e a macromolécula, que podem não ser acessados por outros métodos. O BDF pode ser aplicado à qualquer sistema macromolécula-ligante, cuja reação de associação foi monitorada usando o sinal espectroscópico proveniente da macromolécula de referência na presença do ligante (LOHMAN; BUJALOWSKI, 1991).

A base termodinâmica para o método é que a distribuição de ligantes ligados por macromolécula em i estados diferentes ($\sum v_i$) é estritamente determinada no equilíbrio pelas concentrações de ligante livre ($[L]_{\text{livre}}$) (BECKETT, 2011). Em duas (ou mais) concentrações diferentes de macromolécula ($[P]_{T1}$ e $[P]_{T2}$), a concentração de ligante livre é a mesma em cada solução, bem como $\sum v_i$. Como resultado, pode ser encontrado um conjunto de pares de concentração ($[L]_T$ e $[P]_T$) que satisfazem a equação de conservação de massa (Equação 6) para os quais $\sum v_i$ e $[L]_{\text{livre}}$ são constantes (BUJALOWSKI; JEZEWSKA, 2011).

$$[L]_T = [L]_{\text{livre}} + \sum v_i [P]_T \quad (6)$$

Considerando a relação geral entre a concentração de cada espécie de macromolécula com i ligantes ligados e o sinal observado experimentalmente observado (S_{obs}) da macromolécula, a fração molar da variação do sinal de fluorescência (ΔF_{obs}) observadas na presença de $[L]_T$ e $[P]_T$ serão dadas pela Equação 7 (LOHMAN; BUJALOWSKI, 1991).

$$\Delta F_{\text{obs}} = \frac{F_{\text{obs}} - F_{\text{livre}}[P]_T}{F_{\text{livre}}[P]_T} \quad (7)$$

F_{obs} é o sinal espectroscópico observado, $F_{livre} [P]_T$ é o sinal espectroscópico observado para a macromolécula na ausência de ligante. Assim, para experimentos de fluorescência pode-se escrever:

$$\Delta F_{obs} = \frac{F - F_0}{F_0} \quad (8)$$

F_0 é o sinal de fluorescência da macromolécula na ausência do ligante e F na presença.

Em duas concentrações diferentes de macromolécula os valores de ΔF_{obs} são iguais. Então Σv_i e $[L]_{livre}$ devem ser os mesmos para ambas curvas de titulação (CARUSO et al., 2016). Uma vez obtidos Σv_i e $[L]_{livre}$, diferentes modelos gráficos de análise que dependem das características do processo de ligação podem ser aplicados.

O método de Scatchard é altamente empregado para a análise de dados de ligação entre ligante-aceitador em ciências biológicas (ZHIVKOVA, 2015). O perfil do gráfico de Scatchard ($\Sigma v_i / [L]_{livre}$ versus $[L]_{livre}$) prove informações sobre o comportamento de ligação do ligante à molécula alvo. Em curvas lineares o sistema ligante-proteína possui um conjunto de sítios idênticos e independentes. Na presença de cooperatividade, um desvio da relação linear é observado (BORDBAR; SABOURY; MOOSAVI-MOVAHEDI, 1996). Nestes casos, a ligação de uma molécula de ligante afeta a afinidade de ligação de sítios não ocupados. O gráfico Scatchard para tal sistema pode ser obtido com um máximo ou mínimo, ou apresentar curvatura para baixo ou para cima. À vista disso, a aplicação de mais de um método de análise pode melhor clarificar a interação entre o ligante e a macromolécula.

A primeira descrição da ligação cooperativa em uma proteína com múltiplos sítios foi desenvolvida por A.V. Hill. Ele sugeriu uma equação fenomenológica (Equação 9) que estima a afinidade de ligação, por meio do coeficiente de Hill (n_H), e a constante de associação combinada de i moléculas ligantes (K) (BORDBAR; SABOURY; MOOSAVI-MOVAHEDI, 1996; VAN HOLDE; JOHNSON; HO, 1998; DAUNE, 1999; STEFAN; LE NOVÈRE, 2013).

$$\Sigma v_i = \frac{n_H (K [L]_{livre})^{n_H}}{1 + (K [L]_{livre})^{n_H}} \quad (9)$$

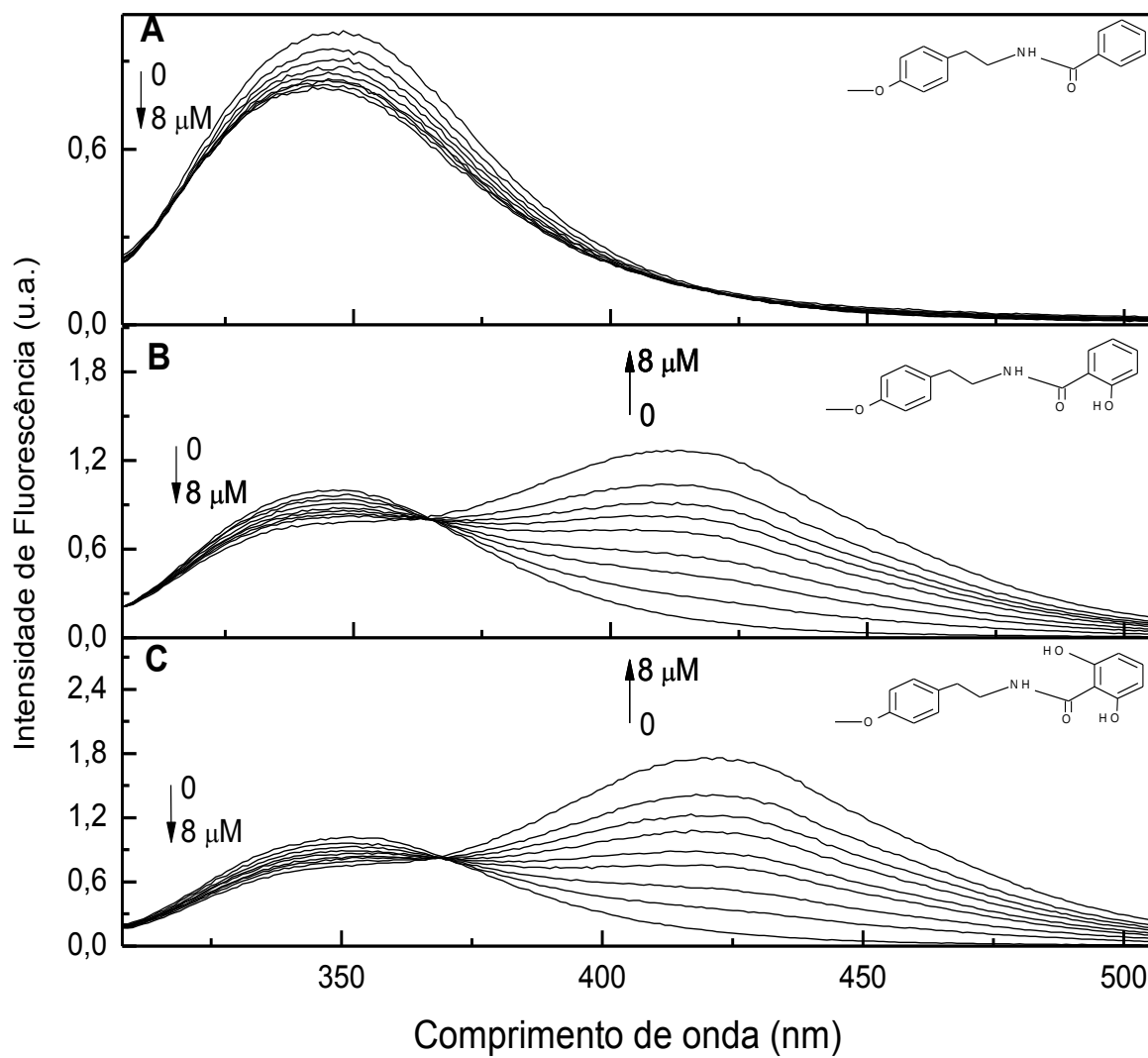
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SUPRESSÕES DA FLUORESCÊNCIA DA HSA COM A ADIÇÃO DAS RIPARINAS

Os espectros da fluorescência intrínseca da HSA (fluoróforo) obtidos com o incremento da concentração de riparina I, II e III (supressores) estão mostrados, respectivamente, na Figura 5 a, b e c. Verifica-se que, após excitação em 295 nm, a HSA exibe ponto máximo de emissão em torno de 346 nm, referente à contribuição do resíduo de triptofano (Trp 214), presente na proteína. O aumento gradativo da concentração da riparina I, II e III nas amostras promove diminuições sucessivas da emissão da HSA, indicando que a interação dos derivados benzóis-tiraminas suprime a fluorescência intrínseca da HSA.

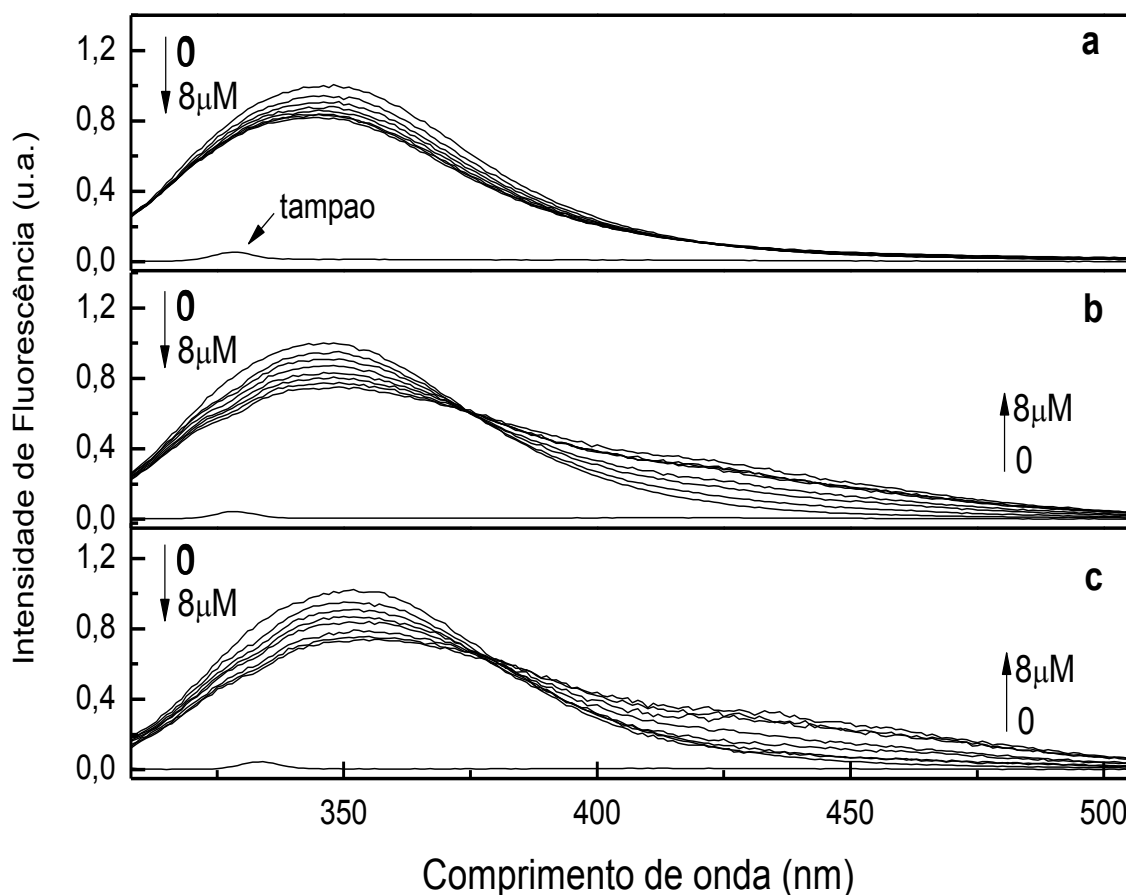
Além disso, mediante as adições das riparinas II e III, observou-se a formação de um ponto isobéstico em 364 e 369 nm, respectivamente. Este fenômeno indica a existência de derivados de benzoil-tiramina ligados a HSA em equilíbrio (YUE et al., 2016). Os espectros das riparinas II e III mostraram, também, com a titulação, um segundo pico de emissão em 413 e 422 nm, respectivamente. Essas emissões correspondem ao sinal da riparina II e III, respectivamente, as quais foram subtraídas do sinal de fluorescência da HSA para as análises futuras (ver **Figura 6**).

Figura 5 - Espectros de emissão da fluorescência da HSA (4 μM) obtidos em diferentes concentrações (0 a 8 μM) da riparina I (a), II (b) e III (c), em 298 K. Incertos mostram a estrutura molecular correspondente de cada composto.



Fonte: Imagem cedida pela autora, 2017.

Figura 6 - Espectros de emissão da fluorescência da HSA ($4 \mu\text{M}$) obtidos em diferentes concentrações (0 a $8 \mu\text{M}$) da riparina I (a), II (b) e III (c), em 298 K, cujas emissões correspondentes ao sinal da riparina II e III foram subtraídas de fluorescência da HSA.

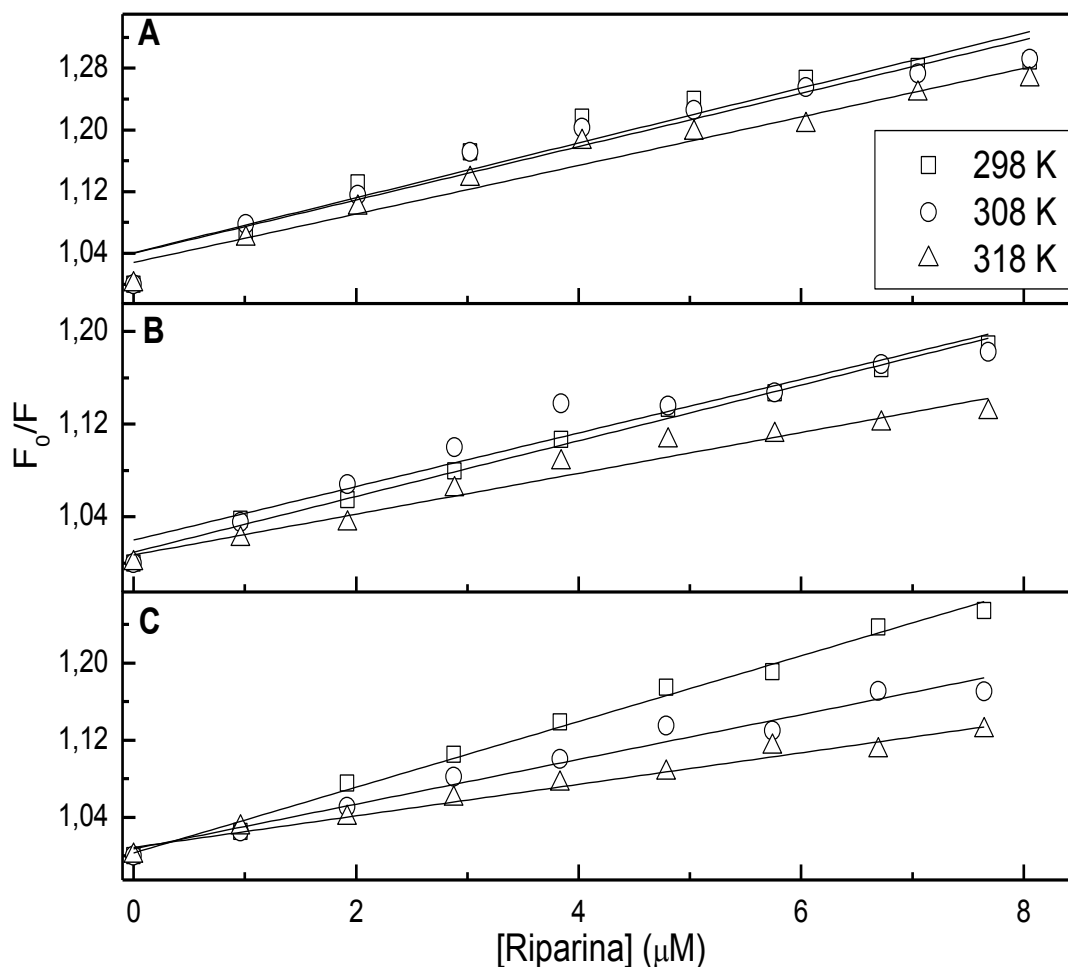


Fonte: Imagem cedida pela autora, 2017.

4.2. MECANISMO DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA

O mecanismo de supressão de fluorescência foi analisado pelo modelo Stern-Volmer empregando a Equação 2. Os gráficos de Stern-Volmer referentes à supressão da fluorescência da HSA ($4 \mu\text{M}$), na presença da riparina I, II e III em 298, 308 e 318 K estão apresentados na Figura 7. De acordo com o ajuste linear aos dados experimentais, as inclinações das curvas (algebricamente dadas pelos valores K_{SV} e K_q , dispostos na Tabela 1) mostram uma tendência de queda, com o aumento de temperatura. Tal resposta com a temperatura corresponde ao mecanismo de supressão estático.

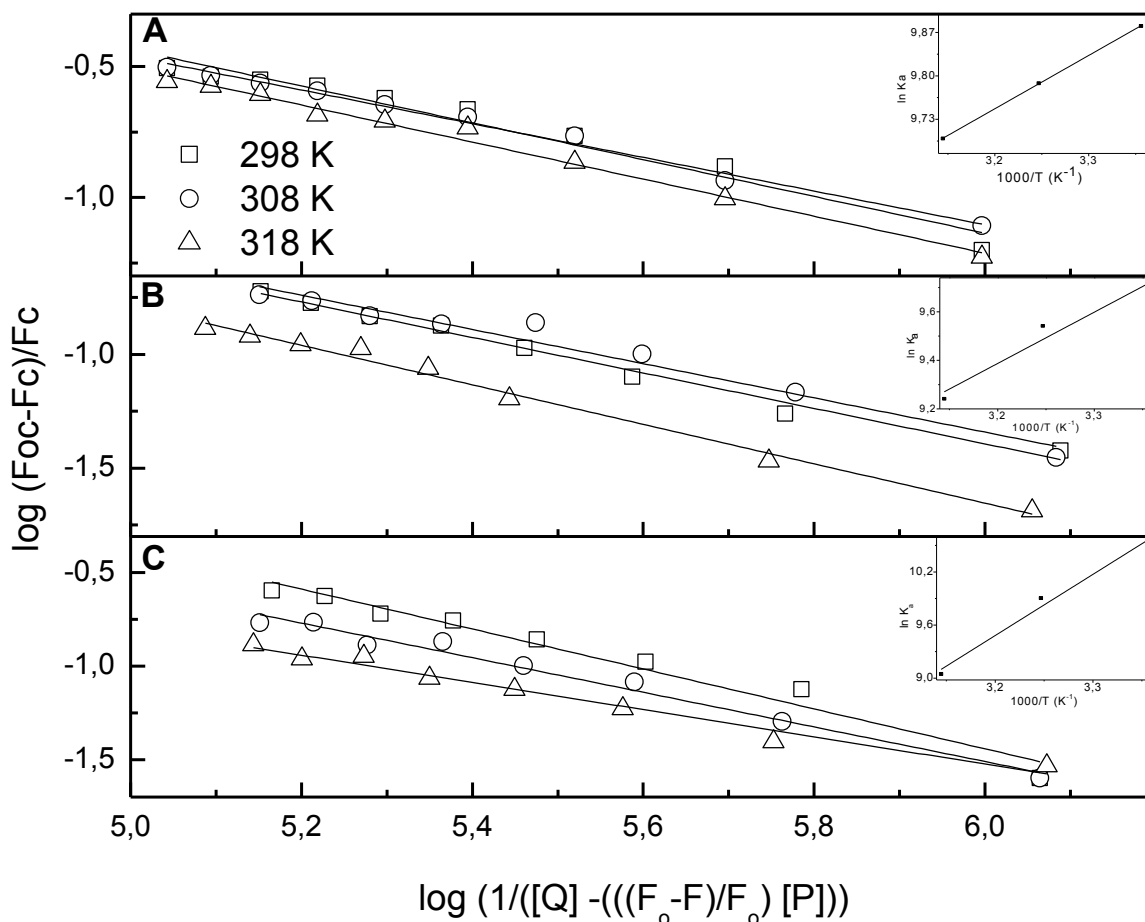
Figura 7 - Gráfico de Stern–Volmer referentes à supressão de fluorescência da HSA (4 μM) na presença da riparina I (A), II (B) e III (C) em 298, 308 e 318 K



Fonte: Imagem cedida pela autora, 2017.

Uma vez que o mecanismo de supressão estático está envolvido na interação fluoróforo- supressor, a constante de ligação (K_a) e o número de sítios de ligação por proteína (n) podem ser obtidos do gráfico duplo logarítmico (BI et al., 2004). Tais gráficos estão mostrados na Figura 8 e os valores de K_a e n listados na Tabela 1. Essas constantes representam parâmetros fenomenológicos: n indica a quantidade de sítios de ligação e K_b à afinidade de ligação destes (LISSI; CALDERÓN; CAMPOS, 2013). Os valores de n são aproximadamente 1,0 e os de K_a são da ordem de 10^4 M^{-1} , os quais indicam a existência de uma afinidade moderada entre a HSA e as riparinas (NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013). A magnitude de K_b contém importantes informações sobre a formação do complexo. Este responde a variação de temperatura, auxiliando na busca das forças que estabilizam o complexo (YUE et al., 2016). A Tabela 1 resume as constantes K_{SV} , K_q e K_a .

Figura 8 - Gráfico duplo logarítmico, obtidos a partir da supressão de fluorescência da (4 μ M) na presença da riparin I (A), II (B) e III (C) em 298, 308 e 318 K. Os insertos mostram os gráficos de Van't Hoff.



Fonte: Imagem cedida pela autora, 2017.

Tabela 1 - Constante de Stern-Volmer (K_{SV}), constante biomolecular de supressão (K_Q), constante de ligação (K_A) e o número de sítios de ligação (n) da interação das riparinas I, II e III com a HSA. Os valores foram obtidos a partir da supressão da fluorescência da albumina humana em função da titulação das riparinas em 298, 308 e 318 K.

Supressor	T(K)	K_{SV} ($\times 10^4 M^{-1}$)	K_Q ($\times 10^{12} M^{-1} s^{-1}$)	R^a	K_a ($\times 10^4 M^{-1}$)	n	R^b
Riparin I	298	3,559	3,559	0,958	1,954	0,621	0,961
	308	3,455	3,455	0,955	1,782	0,624	0,991
	318	3,145	3,145	0,941	1,630	0,660	0,988
Riparin II	298	2,406	2,406	0,991	1,747	0,779	0,985
	308	2,315	2,315	0,935	1,641	0,752	0,961
	318	1,763	1,763	0,957	1,238	0,867	0,989
Riparin III	298	3,407	3,407	0,991	4,277	1,041	0,967
	308	2,319	2,319	0,968	2,152	0,901	0,979
	318	1,633	1,633	0,975	0,774	0,721	0,972

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

^a R é o coeficiente de correlação para o gráfico de Stern-Volmer

^b R é o coeficiente de correlação para o gráfico duplo- logarítmico

4.3. PARÂMETROS TERMODINÂMICOS E FORÇAS DE LIGAÇÃO

Os gráficos de Van't Hoff ($\ln K_a$ versus $1/T$), para a ligação da riparina I, II e III na HSA, estão apresentados como inserções na Figura 8, os quais correspondem aos parâmetros termodinâmicos listados na Tabela 2. Os valores negativos de ΔG , para todas as riparinas, indicam que a interação destes compostos com a proteína é um processo espontâneo. Os valores negativos para ΔH e positivos para ΔS determinado para os complexos riparina I e riparina II- HSA sugerem que as forças entre essas riparinas e a HSA são compostas por interações não específicas; enquanto, ambos os valores negativos para ΔH e ΔS para o complexo riparina III-HSA indicam que interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio têm contribuições importantes durante o processo de interação da riparina III com a HSA (CARUSO et al., 2012).

Tabela 2 - Parâmetros termodinâmicos dos complexos HSA- ligante em 298, 308 e 318 K

Supressor	T(K)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	R
Riparina I	298	-7,14	58,15	-24,47	0,999
	308			-25,05	
	318			-25,63	
Riparina II	298	-14,91	31,16	-24,19	0,998
	308			-24,51	
	318			-24,82	
Riparina III	298	-66,97	-135,60	-26,56	0,966
	308			-25,20	
	318			-23,85	

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

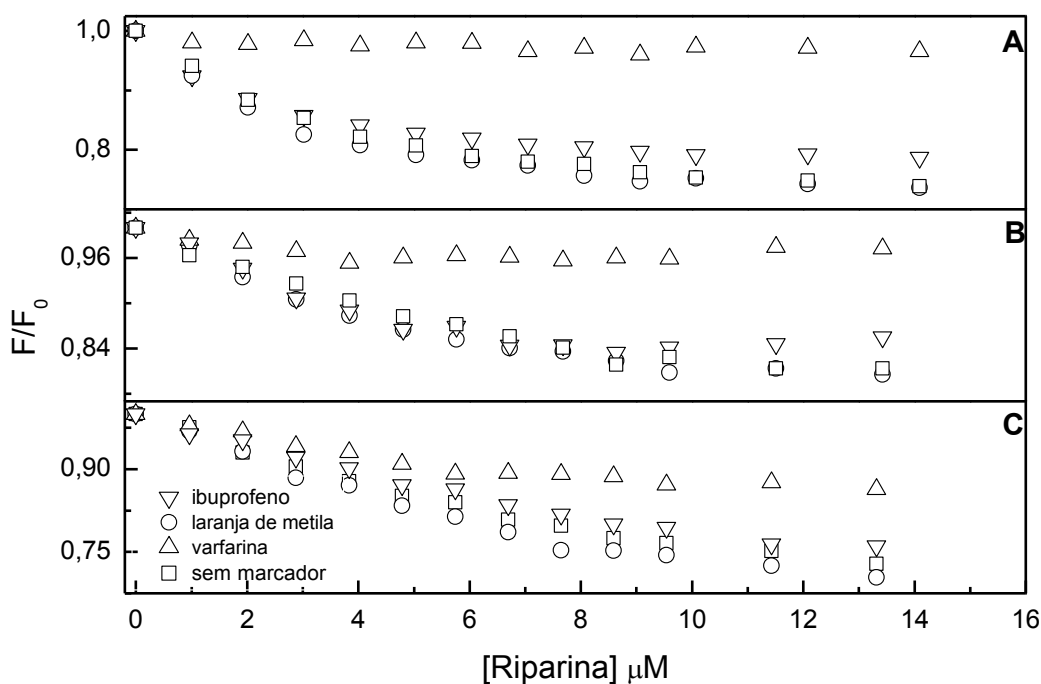
4.4. IDENTIFICAÇÃO DOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DAS RIPARINAS NA HSA

A HSA interage reversivelmente com fármacos que se ligam com um ou mais sítios constantes de associação típicas na ordem de 10^4 - 10^6 M⁻¹. Estudos pioneiros realizados por Sudlow e colaboradores (SUDLOW, BIRKETT, & WADE, 1975), aplicando o método do deslocamento da sonda fluorescente, mostraram que a maioria dos fármacos se liga com alta afinidade a dois sítios específicos de ligação de drogas, denominados o sítio I (subdomínios

IIA, também chamado de sítio de ligação da varfarina) e o sítio II (subdomínios IIIA, o sítio de ligação do ibuprofeno) (ZHANG; MA, 2013). No entanto, alguns sítios de ligação de fármacos diferem dos sítios I e II, identificados como subdomínios que não são o IIA nem o IIIA (KRAGH-HANSEN; CHUANG; OTAGIRI, 2002; YAMASAKI et al., 2013); a laranja de metila liga no sítio III (subdomínio IB) (YUE et al., 2016). Os sítios de ligação são comumente identificados pela aplicação de ligante padrão, tais como varfarina, ibuprofeno e laranja de metila, que se ligam ao sítio I, II e III, respectivamente.

Assim, a competição das riparinas com varfarina, ibuprofeno e laranja de metila foi investigada. A taxa de supressão de fluorescência (F/F_0) na presença e ausência de marcadores foi comparada e é apresentada na Figura 9. A diferença na taxa de supressão na presença da varfarina, quando comparada com a taxa de supressão sem marcador, é a mais notável. Isso indica que as riparinas competem pelo mesmo sítio da varfarina e se ligam à HSA principalmente no sítio I.

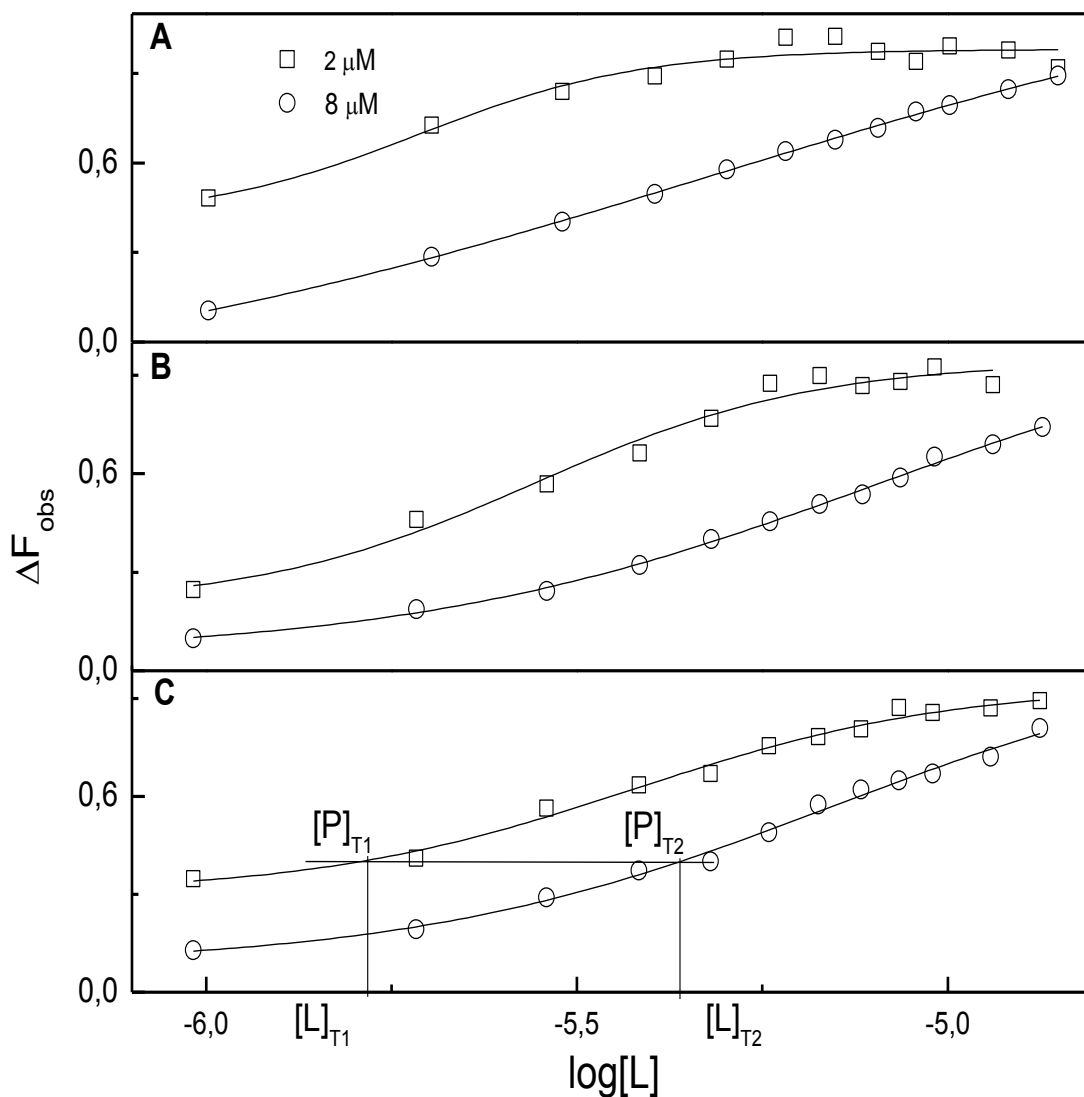
Figura 9 - supressão da fluorescência da HSA em diferentes concentrações (0-10 M) de riparina I (A), II (B) e III (C) na ausência e presença de marcadores de sítio (varfarina, laranja de metila ou ibuprofeno). [HSA] = [Marcador] = 4MM, pH 7 e 298 K.



4.5. FUNÇÃO DE DENSIDADE DE LIGAÇÃO

A fim de assegurar uma abordagem mais realista quanto à formação e estabilidade do complexo, um segundo método experimental foi aplicado: o método gráfico função de densidade de ligação. Os valores de ΔF_{obs} foram traçados como uma função do logaritmo da concentração total do ligante $[L]_T$ (ver Figura 10). Com o intuito de encontrar um conjunto de pares de concentração (L_T ; P_T) no mesmo valor de ΔF_{obs} , um procedimento de interpolação foi realizado usando um ajuste sigmóide para ambas as concentrações de macromoléculas.

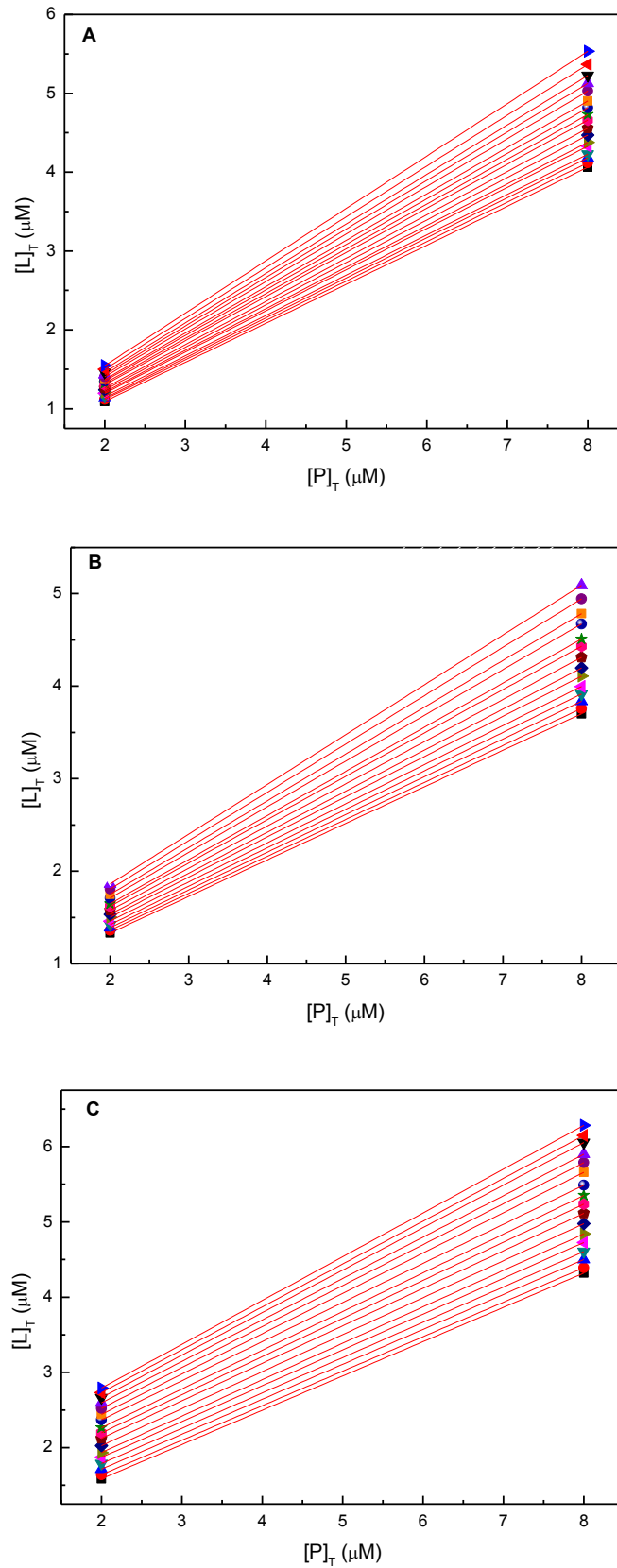
Figura 10 - gráficos semilogarítmico da fluorescência titulação de (A) riparina I (B) II e (C) III com HSA em duas concentrações diferentes de proteína em 298 K. As linhas verticais indicam as concentrações totais de ligante $[L]_{T1}$ e $[L]_{T2}$ ao mesmo valor selecionado da mudança de fluorescência observada, marcada pela linha horizontal, ΔF_{OBS} , em que a média total de ligação de ligante é a mesma para as curvas de titulação.



Fonte: Imagem cedida pela autora, 2017.

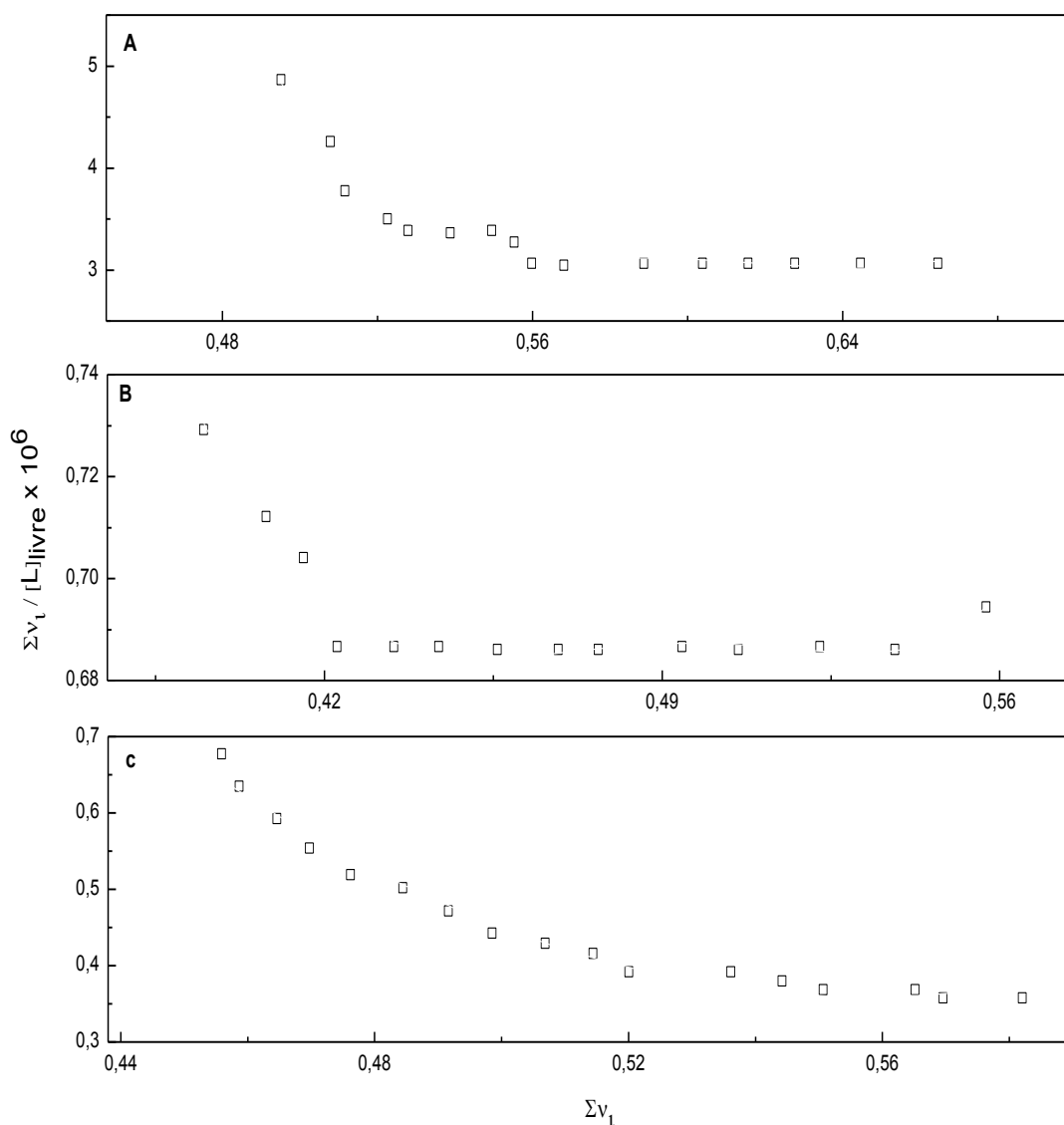
Empregando-se a equação conservação das massas (Equação 6), os parâmetros Σv_i e $[L]_{livre}$ foram determinados a partir do gráfico $[L]_T$ versus $[P]_T$ (ver Figura 11) (LOHMAN; BUJALOWSKI, 1991). Uma vez que Σv_i , $[L]_{free}$ and $[L]_{free}$ foram obtidos, os gráficos de Scatchard ($\Sigma v_i/[L]_{free}$ versus Σv_i) foram construídos e apresentados na Figura 12.

Figura 11 - Conjuntos de pares de concentração (L_T ; M_T) para exemplificar a utilização da Equação 6, obtendo valores de Σv_i e $[L]_{\text{livre}}$ para (A) riparina I (B) II e (C) III.



Fonte: Imagem cedida pela autora, 2017.

Figura 12 - Gráficos de Scatchard da (A) riparina I, (B) riparina II e (C) riparina III com HSA.



Fonte: Imagem cedida pela autora, 2017.

O gráfico de Schatchard apresenta um formato côncavo com uma "cauda" perto da saturação para riparina I e II, Figura 12a e b, respectivamente. A concavidade, nestes casos, indica que o processo de ligação do ligante pode ter uma mistura de cooperatividade negativa e positiva; para a riparina III, Figura 12c mostra que o alongamento na concavidade é menor o que pode ser considerada cooperatividade negativa (BORDBAR; SABOURY; MOOSAVI-MOVAHEDI, 1996). Os perfis de resposta das parcelas de Schatchard não são conclusivos, pelo que é necessário recorrer ao formalismo de Hill para entender o mecanismo de interação. A relação de Hill foi usada de acordo com Equação 10.

Os resultados obtidos com o emprego da Equação 10 estão sumarizados na Tabela 3. O coeficiente de Hill (n_H) pode ser interpretado como o índice de afinidade entre o ligante e a macromolécula, e a constante de ligação (K). Os valores de n_H obtidos para a riparina I, isenta do grupo OH, são semelhantes dos obtidos para a riparina II, que possui o primeiro grupo OH posicionado em átomos de carbono C2, ambos apresentaram uma constante de associação moderada. Da avaliação termodinâmica, as riparinas I e II, ao interagir com a HSA, realizaram uma reação espontânea ($\Delta G < 0$), e o equilíbrio entálpico-entrópico, no equilíbrio, revelou semelhança entre interações hidrofóbicas e não específicas. Os resultados apresentados para a riparina III, que tem o segundo grupo OH posicionado em átomos de carbono C6, desviaram-se dos resultados anteriores. Verificou-se que o índice de afinidade era o mais baixo de todos. A constante de associação decaiu por um fator de dois, em comparação com a riparina II, e o equilíbrio energético, embora favorável ($\Delta G < 0$), durante a avaliação entalpia-entropia, resulta em uma mudança importante no sinal e na magnitude para a contribuição entrópica, que se torna negativa, talvez uma indicação de interações não específicas, não observadas anteriormente. A capacidade de realizar ligações de hidrogênio é esperada para o ligante, enquanto interage com a proteína (XIAO et al., 2008), ao menos que tal interação ocorra preferencialmente num modo intramolecular, o que afeta a constante de ligação. De acordo com a literatura (MARQUES et al., 2005), a riparina III é capaz de realizar ligação de hidrogênio intramolecular entre o átomo de H do grupo OH e o átomo de O do grupo C=O.

Tabela 3 - Coeficiente de Hill (n_H) e constante de ligação (K) obtida usando função de Hill para os sistemas HSA-riparina I- III.

Supressor	n_H	$K (M^{-1})$
Riparin I	5,9	$4,03 \times 10^6$
Riparin II	6,1	$1,25 \times 10^6$
Riparin III	3,4	$5,57 \times 10^5$

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

4.6 CÁLCULO *AB INITIO*

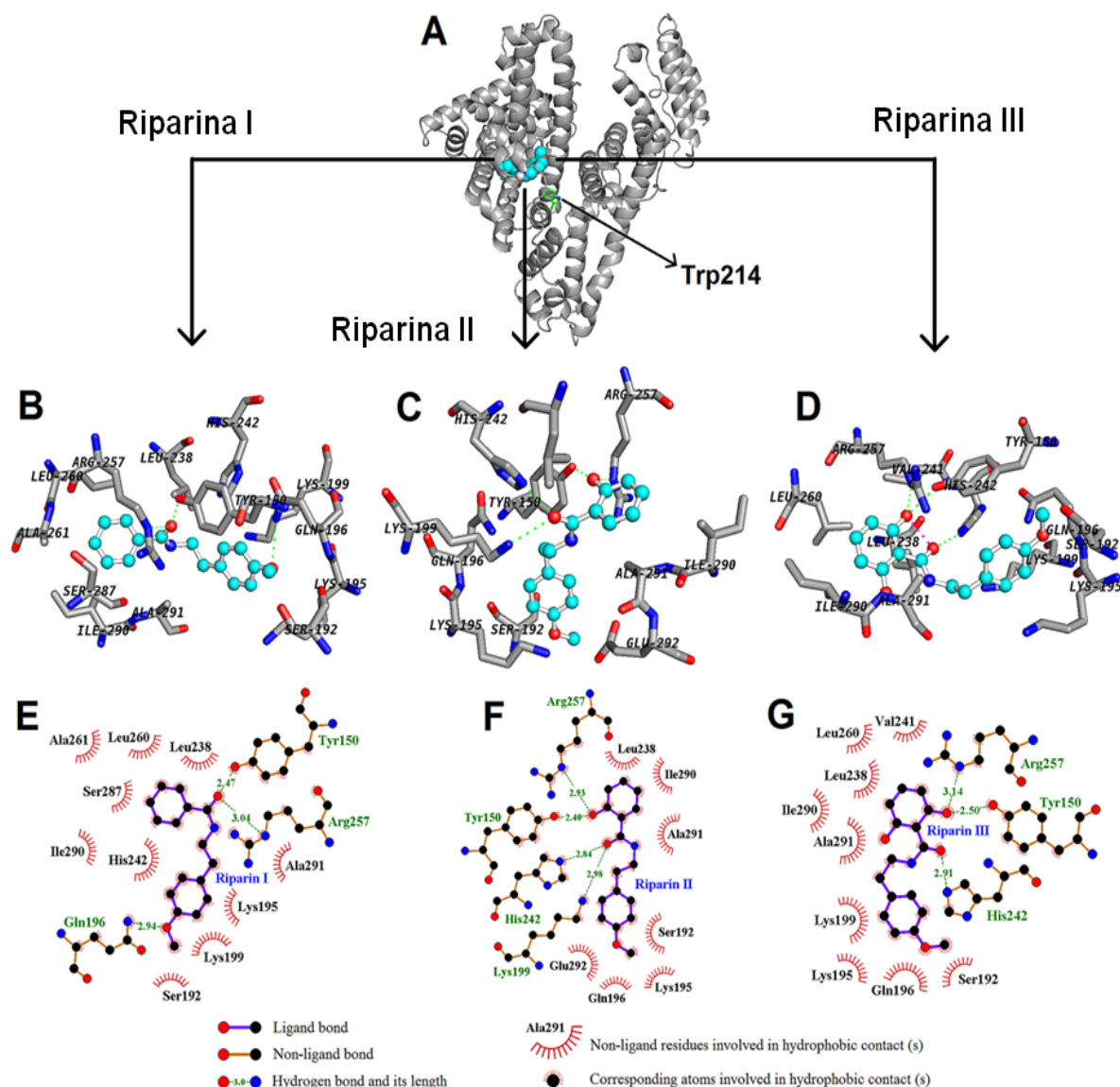
O cálculo de otimização e vibração realizado para as riparinas usando o método DFT/B3LYP / 6-31G (d, p) mostrou que a estrutura otimizada é estável (mínimo global na superfície de energia potencial), uma vez que não é obtida nenhuma frequência imaginária.

Algumas distâncias de ligação calculadas, ângulos de ligação e ângulos diedros são apresentados na Tabela B-1. Do MEP das riparinas (Figura B-1), é possível notar a existência de uma distribuição de carga neutra nas faces planar dos anéis da molécula. Uma distribuição densa de cargas parciais negativas também pode ser vista perto do átomo de oxigênio O3 para a riparina I, átomo O22 para riparina II e III. Por outro lado, um potencial eletrostático positivo é localizado perto do átomo de hidrogênio H^N nas riparinas e outras regiões das moléculas comparativamente menos densas perto dos hidrogênios dos átomos de carbono C141.

4.7 CÁLCULO DE MODELAGEM MOLECULAR

Os resultados do deslocamento da sonda fluorescente foram utilizados para realizar os cálculos de modelagem molecular, posicionando as moléculas de riparina no sítio I de HSA. As melhores energias de ligação teórica (ΔG_B) para riparina I, II e III são -29,8, -30,7 e -28,3 kJ mol⁻¹, com constantes de ligação teóricas correspondentes de $1,7 \times 10^5$, $2,4 \times 10^5$ e $9,0 \times 10^4$ M⁻¹ em 298 K, respectivamente, que é muito próximo da tendência encontrada experimentalmente.

Figura 13- (A) Localização das moléculas de riparina no subdomínio IIA (sítio I) da HSA, próximo do único resíduo de triptofano (TRP214). A proteína é mostrada como desenhos e as moléculas de riparina como esferas. Detalhe estrutural tridimensional de interação do microambiente de interação da riparina I (B), II (C) e III (D) com o sítio I da HSA obtido por cálculos de modelagem molecular. As moléculas de riparina são mostradas como bastões e esferas, os resíduos de aminoácidos são denotados como bastões (C, cinzento, O, vermelho, N, azul, H, branco) e as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares por linhas pontilhadas verde e vermelha, respectivamente. Representação bidimensional dos mapas de interação entre riparina I (E), II (F) e III (G) e resíduos do sítio I da HSA. A representação estrutural foi preparada utilizando Pymol (DELANO, 2002) e o mapa de interação foi calculado utilizando LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).



Fonte: Imagem cedida pela autora, 2017.

A Figura 13 resume a interação entre HSA e as riparinas de três perspectivas diferentes. No topo, a Figura 13A mostra a estrutura terciária da HSA com a localização das moléculas de riparina em seu subdomínio IIA (sítio I), bem como a posição de seu único resíduo Trp214. No meio, Figura 13 B, C e D apresentam mais detalhadamente o ambiente de ligação tridimensional de riparina I, II e III no sítio I da HSA, respectivamente, mostrando os resíduos de aminoácidos da proteína envolvidos na interação com as riparinas. No fim, Figura 13 E, F e G mostram a análise das interações não covalentes no sítio I para riparina I, II e III, respectivamente, realizadas com o programa LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).

À esquerda (Figura 13E), os resíduos Ser192, Lys 195, Lys199, Leu238, His242, Leu260, Ala261, Ser287, Ile290 e Ala291 estão envolvidos em interações hidrofóbicas com a riparina I. Os resíduos de Tyr150, Gln196 e Arg257 ligam-se por ligações de hidrogênio com o ligante. O grupo OH e NH da cadeia lateral Tyr150 e Arg257 compõem duas ligações de hidrogênio com o átomo de oxigênio O3 da riparina I, apresentando distâncias de formação de 2,47 e 3,04 Å, respectivamente. Esse átomo de oxigênio apresenta a distribuição mais densa de carga parcial negativa como pode ser observada no MEP da molécula (Figura B-1 A). O grupo NH₂ da cadeia lateral Gln196 forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio O14 de riparina I, com uma distância de formação de 2,94 Å. Um caso especial ocorre com o resíduo Lys199, o qual realiza interação eletrostática do tipo cation- π com o anel A (Figura 2A) da riparina I (Figura 13B).

No centro (Figura 13F), os resíduos Ser192, Lys195, Gln196, Leu238, Ile290, Ala291 e Glu292 estão participando de contribuições hidrofóbicas da interação com a riparina II. Os resíduos Tyr150, Lys199, His242 e Arg257 formam ligações de hidrogênio com a molécula. O grupo OH e NH da cadeia lateral Tyr150 e Arg257 formam duas ligações de hidrogênio com o átomo de oxigênio O22 da riparina II, mostrando distâncias de formação de 2,40 e 2,93 Å, respectivamente. Este átomo O22 apresenta a maior distribuição de carga negativa, como pode ser observado no MEP da molécula (Figura B-1 B). O grupo NH₃⁺ e NH (posição E1) da cadeia lateral Lys199 e His242 compõem duas ligações de hidrogênio com o átomo de oxigênio O3 da riparina II, com uma distância de formação de 2,98 e 2,84 Å, respectivamente. Um caso especial ocorre com o resíduo Lys199.

À direita (Figura 13G), os resíduos Ser192, Lys195, Gln196, Lys199, Leu238, Val241, Leu260, Ile290 e Ala291 estão participando de interações hidrofóbicas com a molécula de riparina III. Os resíduos Tyr150, His242 e Arg257 formam ligações de hidrogênio com o ligante. O grupo OH e NH da cadeia lateral Tyr150 e Arg257 compõem duas

ligações de hidrogênio com o átomo de oxigênio O22 do ligante, apresentando distâncias de formação de 2,49 e 3,05 Å, respectivamente. O grupo NH ($\epsilon 2$) da cadeia lateral His242 forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio O3 da riparina III, com uma distância de formação de 2,91 Å.

A partir dos resultados de LigPlot, é possível ver que as interações hidrofóbicas são as de maior na ligação da riparinas ao sítio I da HSA, com a seguinte sequência: riparina I (dez resíduos), riparina III (oito resíduos) e riparina II (sete resíduos). No entanto, as interações eletrostáticas apresentam uma significativa contribuição para a estabilização do complexo na formação de ligações de hidrogênio. O complexo HSA-riparina II possui quatro ligações de hidrogênio enquanto a interação das riparinas I e III com HSA apresenta três. É importante notar que os resíduos de aminoácidos de HSA envolvidos na ligação com riparinas são altamente preservados e os resíduos de Tyr150 e Arg257 estão sempre presentes na formação de ligações de hidrogênio com riparinas, desempenhando um papel fundamental na ligação dos ligantes no sítio I da proteína.

5. CONCLUSÃO

O mecanismo molecular de interação entre as riparinas e a albumina de soro humano foi explorado através de espectroscopia de fluorescência e métodos computacionais. A intensidade de fluorescência endógena do Trp 214 é a chave para monitorar a interação como um todo, possibilitando pesquisar o mecanismo de supressão, sítios de ligação, índice de afinidade e parâmetros termodinâmicos. Os resultados da análise de dados de ligação mostraram que todas as riparinas acessaram o mesmo sítio de ligação (sítio I), porém com diferenças no índice de afinidade, indicando que algumas características específicas podem estar relacionadas com a estrutura da riparina. Riparin I e II apresentaram uma ligeira diferença no valor da constante de ligação, que pode ser devido à presença do primeiro grupo químico de OH na molécula de riparina II. No caso da riparina III, a diminuição da constante de ligação foi mais pronunciada quando comparada à riparina I e II, o que novamente pode apontar para a adição do segundo grupo químico de OH à estrutura de riparina. Todos estes resultados têm uma relação direta com os ensaios termodinâmicos. Para riparina I e II, os sinais para ΔG , ΔH são negativos, enquanto ΔS positivos. Em termos de magnitude, a contribuição de entalpia para riparina II, em comparação com a riparina I, quase dobrou em

valor, sendo mais provável formar ligações de hidrogênio. Por outro lado, o valor da entropia caiu quase metade, o que significa que a contribuição da interação não específica tornou-se menos efetiva. As mudanças de sinal e magnitude da contribuição entrópica no caso da riparina III estão relacionadas ao seu esqueleto molecular de riparina, mais precisamente com o anel B que é a estrutura onde o grupo hidroxila liga. A adição de um grupo OH à riparina II e dois à riparina III mostra sua importância durante a formação dos complexos, interferindo no índice de afinidade. Isso pode estar ligado à capacidade da riparina III para realizar uma ligação de hidrogênio intramolecular, perceptível através das respostas experimentais e detalhadas por ferramentas computacionais. Em conclusão, sugerimos que o grupo hidroxila modulou a interação entre riparina e albumina de soro humano.

REFERÊNCIAS

- ANIBA. **Aniba**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB84247>>. Acesso em: 5 ago. 2016.
- ARAÚJO, F. L. O.; MELO, C. T. V.; ROCHA, N. F. M.; MOURA, B. A.; LEITE, C. P.; AMARAL, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; DE SOUSA, F. C. F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, n. 4, p. 337–344, 2009.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. **Synthesis of several new phenylethylamines of substituted benzoic acids** *Quim. Nova*, 1990. .
- BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. de C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YOUNG, M. C. M. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2615–2617, 1987.
- BECKETT, D. **Measurement and analysis of equilibrium binding titrations: A beginner's guide**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 488
- BI, S.; DING, L.; TIAN, Y.; SONG, D.; ZHOU, X.; LIU, X.; ZHANG, H. Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 703, n. 1–3, p. 37–45, 2004.
- BORDBAR, A. K.; SABOURY, A. A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. The Shapes of Scatchard Plots for Systems with Two Sets of Binding Sites. **Biochemical Education**, v. 24, n. 3, p. 172–175, 1996.
- BUJALOWSKI, W.; JEZEWSKA, M. J. **Macromolecular Competition Titration Method: Accessing thermodynamics of the unmodified macromolecule-ligand interactions through spectroscopic titrations of fluorescent analogs**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 488
- CARUSO, Í. P.; FILHO, J. M. B.; DE ARAÚJO, A. S.; DE SOUZA, F. P.; FOSSEY, M. A.; CORNÉLIO, M. L. An integrated approach with experimental and computational tools outlining the cooperative binding between 2-phenylchromone and human serum albumin. **Food Chemistry**, v. 196, p. 935–942, 2016.
- CARUSO, Í. P.; VILEGAS, W.; FOSSEY, M. A.; CORNÉLIO, M. L. Exploring the binding mechanism of Guaijaverin to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy and computational approach. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 97, p. 449–455, 2012.
- CASTELO-BRANCO, U. V.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; THOMAS, G.; DE ARAÚJO, C. C.; BARBOSA-FILHO, J. M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Nees) mez (Lauraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 197–202, 2000.
- CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. D. O.; PEREIRA, M. do S. V.; ARRUDA, T. A.; MIRANDA, R. P. A. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 42, n. 1, p. 9–14, 2010.
- DAUNE, M. **Molecular Biophysics. Structures in motion**. New York: Oxford University Press, 1999.

DE CARVALHO, A. M. R.; ROCHA, N. F. M.; VASCONCELOS, L. F.; RIOS, E. R. V.; DIAS, M. L.; SILVA, M. I. G.; DE FRANÇA FONTELES, M. M.; FILHO, J. M. B.; GUTIERREZ, S. J. C.; DE SOUSA, F. C. F. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chemico-Biological Interactions**, v. 205, n. 3, p. 165–172, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.07.007>>.

DE MELO, C. T. V.; DE CARVALHO, A. M. R.; MOURA, B. A.; TEIXEIRA, C. P. L.; VASCONCELOS, L. F.; FEITOSA, M. L.; DE OLIVEIRA, G. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CHAVEZ GUTIERREZ, S. J.; DE FRANÇA FONTELES, M. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; DE SOUSA, F. C. F. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 104–112, 2013.

DE MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; DE ARAÚJO, F. L. O.; LIMA, V. T. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DE FRANÇA FONTELES, M. M.; DE VASCONCELOS, S. M. M.; DE BARROS VIANA, G. S.; DE SOUSA, F. C. F. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 3, p. 451–454, 2006.

DE SOUSA, F. C. F.; MONTEIRO, A. P.; DE MELO, C. T. V.; DE OLIVEIRA, G. R.; VASCONCELOS, S. M. M.; DE FRANÇA FONTELES, M. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 12, p. 1005–1008, dez. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.1771>>.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. [s.l.: s.n.]

DOCKAL, M.; CATER, D. C.; RÜKER, F. The Three Recombinant Domains of Human Serum Albumin. **October**, v. 274, n. 41, p. 29303–29310, 1999.

DOS SANTOS, S. G.; QUEIROGA, K. F.; DE OLIVEIRA, A. M. F.; TAVARES, J. F.; GUTIERREZ, S. J. C.; DINIZ, M. D. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA SILVA, M. S. Blood matrix effects for male and female Wistar rats, in simultaneous HPLC-UV determination of riparin I and III from *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae). **Talanta**, v. 86, n. 1, p. 233–240, 2011.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A.; JR., J. E. P.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, O.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSŁOWSKI, J.; FOX, D. J. **Gaussian 09, Revision A.02**. [s.l.: s.n.]

GELAMO, E. L.; TABAK, M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. v. 56, p. 2255–2271, 2000.

HEIJNEN, C. G. M.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN ACKER, F. A. A.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: The role of the hydroxyl groups. **Toxicology in Vitro**, v. 15, n. 1, p. 3–6, 2001.

KRAGH-HANSEN, U.; CHUANG, V. T. G.; OTAGIRI, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 25, n. 6, p. 695–704, 2002.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 2. ed. New York: Kluwer Academic Publisher/Plenum Press, 1999.

LAKOWICZ, J. R. Protein Fluorescence. In: **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Boston, MA: Springer US, 2006. 30p. 529–575.

LISSI, E.; CALDERÓN, C.; CAMPOS, A. Evaluation of the number of binding sites in proteins from their intrinsic fluorescence: Limitations and pitfalls. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 6, p. 1413–1416, 2013.

LOHMAN, T. M.; BUJALOWSKI, W. Thermodynamic methods for model-independent determination of equilibrium binding isotherms for protein-DNA interactions: spectroscopic approaches to monitor binding. **Methods in Enzymology**, v. 208, p. 258–290, 1991.

MARQUES, A. D. S.; ZHENG, C.; LIN, C. T.; TAKAHATA, Y.; BARBOSA-FILHO, M.; GUTIERREZ, S. J. C. Electronic and structural effects in muscular relaxants: Riparin I and Riparin III. **Journal of Molecular Structure**, v. 753, n. 1–3, p. 13–21, 2005.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195–206, 2001.

MARQUES, C. A.; AZEVEDO, A. A. Caracterização anatômica da folha de Aniba firmula (Nees & C. Mart.) Mez (Lauraceae). **Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 2, p. 251–256, 2011.

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, n. 14, p. 1639–1662, 1998.

NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S. Binding of serum albumins with bioactive substances - Nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 14, n. 1, p. 53–71, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.001>>.

NI, Y.; ZHU, R.; KOKOT, S. Competitive binding of small molecules with biopolymers: a fluorescence spectroscopy and chemometrics study of the interaction of aspirin and ibuprofen with BSA. **The Analyst**, v. 136, n. 22, p. 4794, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21952617>>.

OLIVEIRA, I. C. M. **Efeitos centrais da riparina I de aniba riparina (NEES) mez (Lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade, depressão, sono e convulsão em camundongos**. /. 2012. Universidade Federal do Ceará, 2012.

OLIVEIRA, S.; MARCCUS, S. Sinopse taxonômica da família Lauraceae na porção norte da Floresta Atlântica brasileira¹. p. 14–28, 2013.

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. 1, n. 18, p. 3041–3044, 1998.

PETITPAS, I.; GRU, T.; BHATTACHARYA, A. a; CURRY, S. Crystal Structures of Human Serum Albumin Complexed with Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids. p. 955–960, 2001.

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 53, n. 82, p. 59–121, 2002.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. de; ASSIS, L.; ALVES, F. M. **Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil . Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB143>>. Acesso em: 5 ago. 2016.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, 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. **J Mol Graph Model**, v. 17, n. 1, p. 57–61, 1999.

SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R. B.; SILVA, I. S.; SILVA, V. G.; BRITO, C. F. C.; TEIXEIRA, A. ??der A.; NUNES, G. B. L.; CAMARA, C. A.; FILHO, J. M. B.; GUTIERREZ, S. J. C.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, J. V. R. Riparin A, a compound from Aniba riparia, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chemico-Biological Interactions**, v. 229, p. 55–63, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.029>>.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LIMA, V. T. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; PEREIRA, B. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. F.; VIANA, G. S. B. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 78, n. 1, p. 27–33, 2004.

STEFAN, M. I.; LE NOVÈRE, N. Cooperative Binding. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 6, p. 2–7, 2013.

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

SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIZUKI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein engineering**, v. 12, n. 6, p. 439–446, 1999.

TEIXEIRA, C. P. L.; DE MELO, C. T. V.; DE ARAÚJO, F. L. O.; DE CARVALHO, A. M. R.; SILVA, M. I. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MACÊDO, D. S.; DE BARROS VIANA, G. S.; DE SOUSA, F. C. F. Antidepressant-like effect of riparin II from Aniba riparia in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 129–137, 2013.

TORRES, J. M.; CHAVEZ, A. G. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. **Avance y perspectiva**, v. 20, n. Noviembre-Diciembre, p. 377–387, 2001.

URBINATI, C. V.; SILVA, R. C. R. da; SILVA, S. S. da; LISBOA, P. L. B.; MORI, F. A. Structure of the secondary xylem of *Aniba* Aubl. species from the Brazilian Amazon. **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, n. 3, p. 484–488, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062014000300022&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

VAN HOLDE, K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S. Principles of Physical Biochemistry. **Library of Congress Cataloging-in-Publication Data**, v. 36, p. 657, abr. 1998. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed076p474.1>>.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein engineering**, v. 8, n. 2, p. 127–34, 15 fev. 1995. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/25.24.4940>>.

WOODMAN, O. L.; MEEKER, W. F.; BOUJAOUDE, M. Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones: structure-activity relationships. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 302–309, 2005.

WU, D.; YAN, J.; WANG, J.; WANG, Q.; LI, H. Characterisation of interaction between food colourant allura red AC and human serum albumin: Multispectroscopic analyses and docking simulations. **Food Chemistry**, v. 170, p. 423–429, 2015.

WYBRANOWSKI, T.; CYRANKIEWICZ, M.; ZIOMKOWSKA, B.; KRUSZEWSKI, S. The HSA affinity of warfarin and flurbiprofen determined by fluorescence anisotropy measurements of camptothecin. **BioSystems**, v. 94, n. 3, p. 258–262, 2008.

XIAO, J.; SUZUKI, M.; JIANG, X.; YAMAMOTO, K.; REN, F.; XU, M. Influence of B-Ring Hydroxylation on Interactions of Flavonols with Bovine Serum Albumin Influence of B-Ring Hydroxylation on Interactions of Flavonols with Bovine Serum Albumin. **Society**, p. 2–9, 2008.

YAMASAKI, K.; CHUANG, V. T. G.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 12, p. 5435–5443, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.005>>.

YUE, Y.; DONG, Q.; ZHANG, Y.; LI, X.; YAN, X.; SUN, Y.; LIU, J. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Synthesis of imidazole derivatives and the spectral characterization of the binding properties towards human serum albumin. **Saa**, v. 153, p. 688–703, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2015.09.023>>.

ZHANG, G.; MA, Y. Mechanistic and conformational studies on the interaction of food dye amaranth with human serum albumin by multispectroscopic methods. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 442–448, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.026>>.

ZHANG, X. P.; HOU, Y. H.; WANG, L.; ZHANG, Y. Z.; LIU, Y. Exploring the mechanism of interaction between sulindac and human serum albumin: Spectroscopic and molecular modeling methods. v. 138, p. 8–14, 2013.

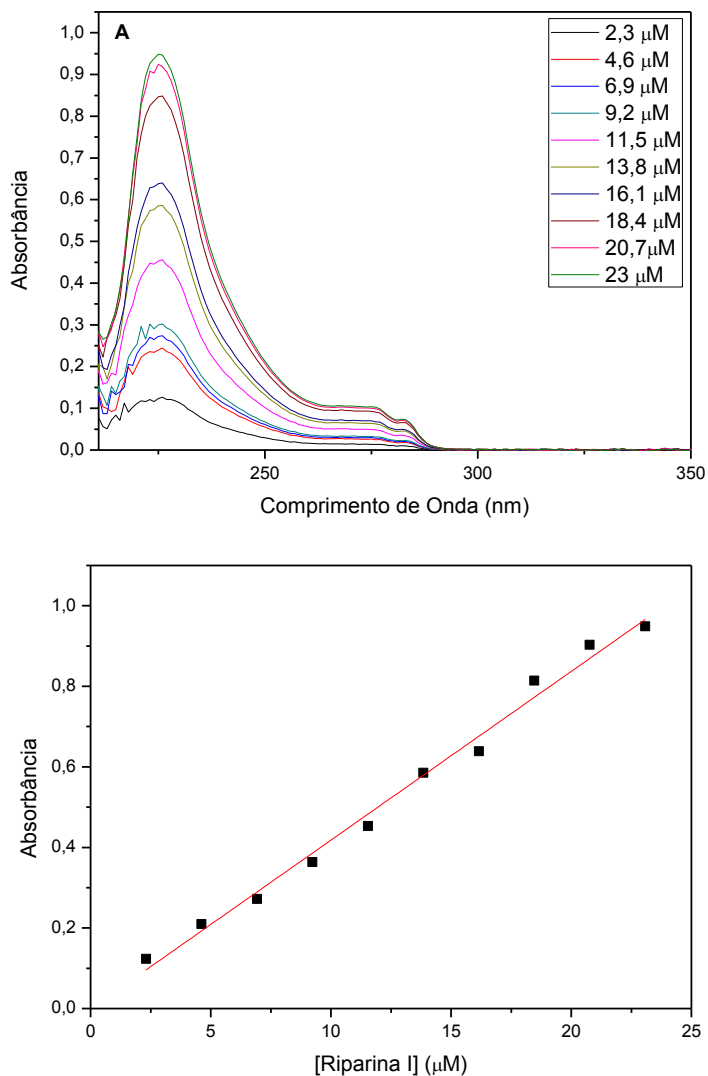
ZHANG, Y.; WILCOX, D. E. Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 327–337, 2002.

ZHIVKOVA, Z. D. Studies on Drug – Human Serum Albumin Binding : The Current State of the Matter. n. 4, p. 1817–1830, 2015.

ZSILA, F. Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: Toward the three-sites model. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 5, p. 1668–1682, 2013.

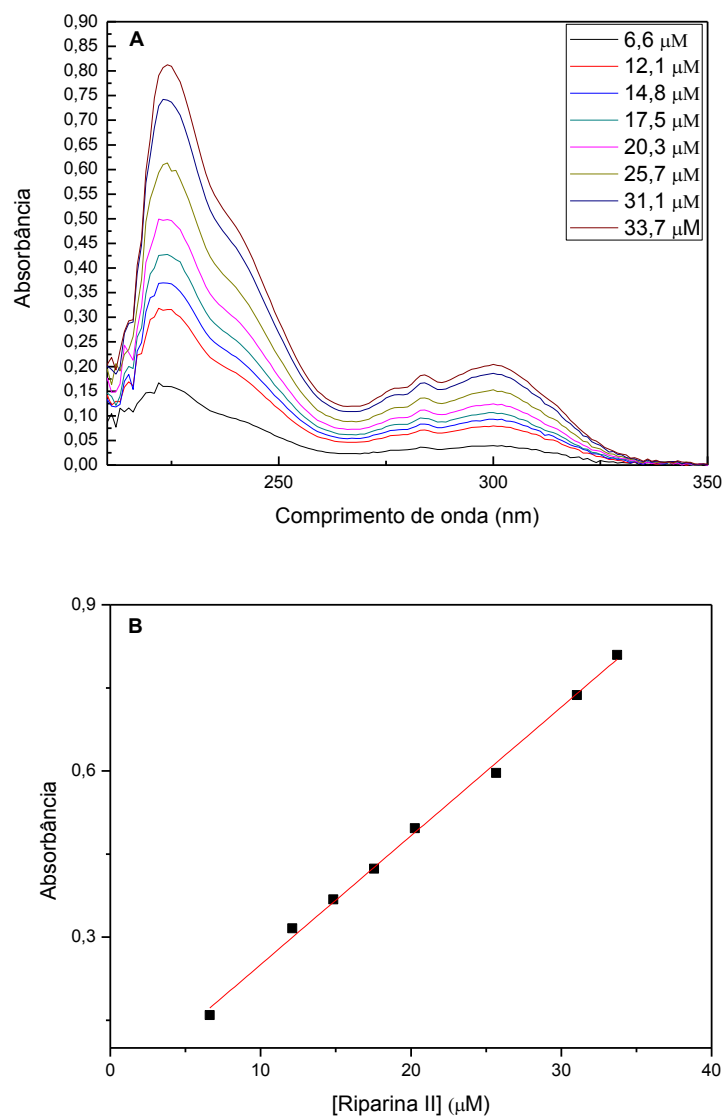
APÊNDICE A - Espectro de absorção das riparinas e determinação de seus coeficientes de extinção molar

Figura A1 - (A) Espectro UV- visível da riparina I em metanol, usando cubeta de caminho óptico de 1,0 cm e (B) Determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ) em 225nm, empregando a lei de Beer - Lambert e através do coeficiente angular da reta formada pelos pontos do gráfico.



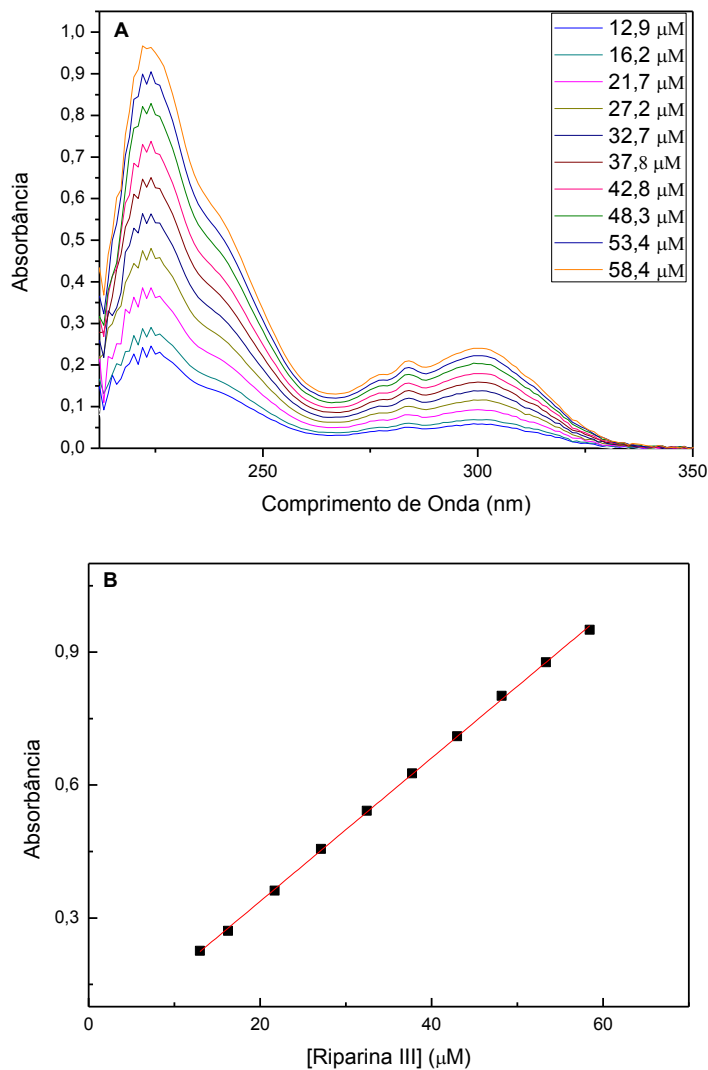
Fonte: Imagem cedida pela autora, 2017.

Figura A2 - (A) Espectro UV- visível da riparina II em metanol, usando cubeta de caminho óptico de 1,0 cm e (B) Determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ) em 225nm, empregando a lei de Beer - Lambert e através do coeficiente angular da reta formada pelos pontos do gráfico.



Fonte: Imagem cedida pela autora, 2017.

Figura A3 - (A) Espectro UV- visível da riparina III em metanol, usando cubeta de caminho óptico de 1,0 cm e (B) Determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ) em 225nm, empregando a lei de Beer - Lambert e através do coeficiente angular da reta formada pelos pontos do gráfico.



Fonte: Imagem cedida pela autora, 2017.

Tabela A1- Coeficiente de extinção molar (ϵ) em 225nm, empregando a lei de Beer - Lambert determinadas a partir do coeficiente angular da reta formada pelos pontos dos gráficos acima.

Riparina	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)
I	34959
II	22280
III	16198

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

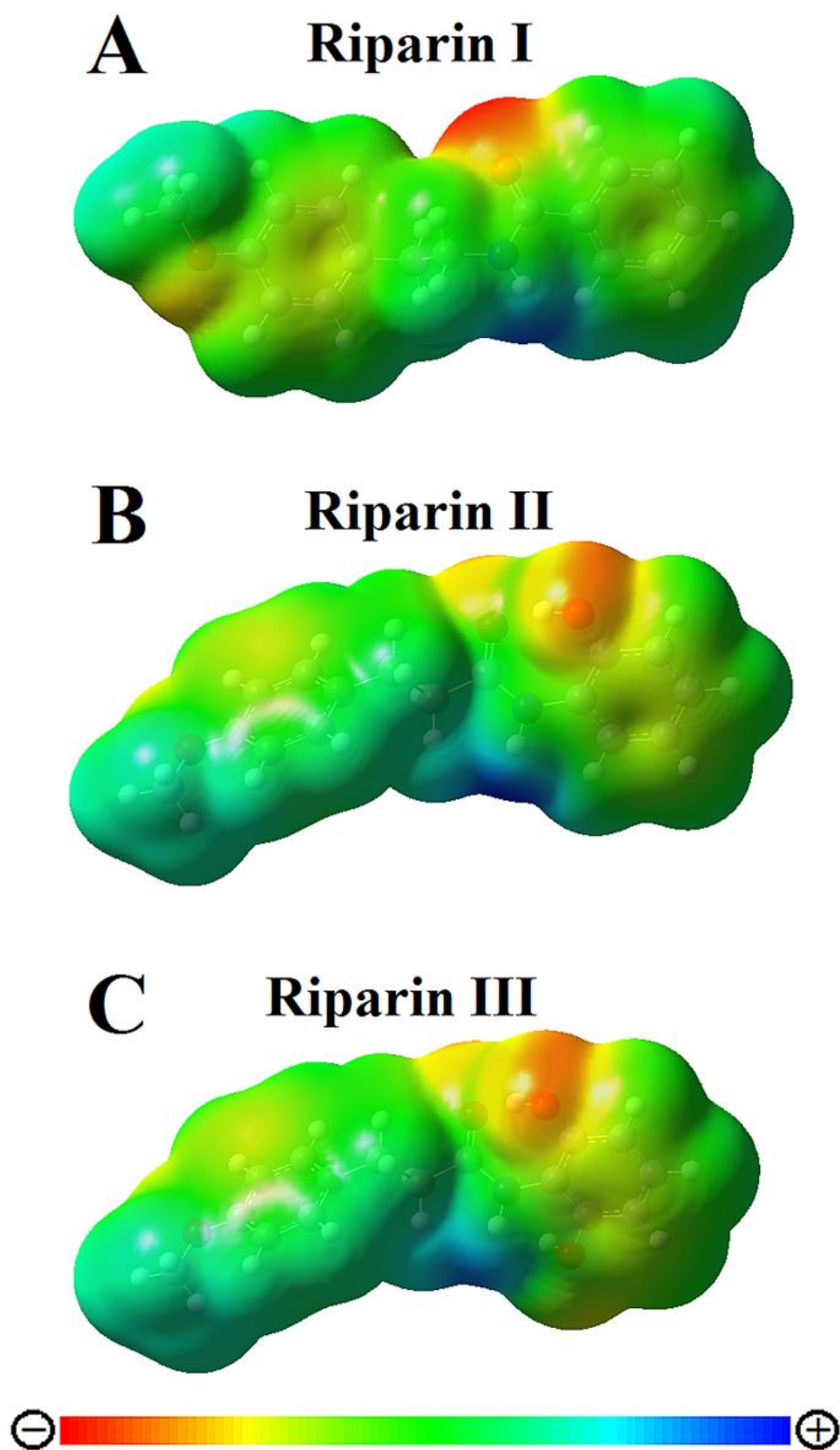
APÊNDICE B - Detalhes estruturais da estrutura otimizada das riparinas e mapa do potencial eletrostático (MEP) das moléculas de riparina.

Tabela B1- Alguns detalhes estruturais da estrutura otimizada das riparinas no método DFT / B3LYP / 6-31G (d, p).

Distância de Ligação (Å)	riparina I	Riparina II	Riparina III
N – C3	1.367	1.361	1.379
C3 – O3	1.230	1.233	1.245
C3 – C21	1.505	1.513	1.480
C1 – C2	1.544	1.545	1.543
C14–O14	1.367	1.368	1.366
O14 – C141	1.418	1.417	1.418
Ângulos de Ligação (°)			
C1 – C2 – N	113.005	113.312	113.791
C2 – N – C3	121.273	120.963	120.057
C14 – O14 – C141	118.138	118.076	118.186
C21 – C22 – C23	120.429	122.210	120.237
Ângulos diedros (°)			
C141 – O14 – C14 – C15	– 179.897	179.995	179.754
C11 – C1 – C2 – N	– 178.267	– 177.533	– 178.864
C2 – N – C3 – O3	0.243	1.766	5.947
O3 – C3 – C21 – O22	21.633	1.391	– 18.516

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Figura B1 - Mapa do potencial eletrostático (MEP) das moléculas de riparina calculado usando o método DFT / B3LYP / 6-31G (d, p).



Fonte: Imagem cedida pela autora, 2017.

APÊNDICE C - Artigo Publicado na *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*.

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 190 (2018) 81–88



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa



Spectral and computational features of the binding between riparins and human serum albumin



Cintia Ramos Camargo^a, Ícaro Putinhon Caruso^b, Stanley Juan Chavez Gutierrez^c, Marcelo Andres Fossey^{a,b}, José Maria Barbosa Filho^d, Marinônio Lopes Cornélio^{a,b,*}

^a Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2255, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil

^b Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2255, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil

^c Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí (UFPI), CEP 64049-550 Teresina, PI, Brazil

^d Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Cidade Universitária, CEP 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2017

Received in revised form 15 August 2017

Accepted 31 August 2017

Available online 08 September 2017

Keywords:

Riparin

Human serum albumin

Fluorescence

Binding density function

Drug displacement

Computational methods

ABSTRACT

The green Brazilian bay leaf, a spice much prized in local cuisine (*Aniba riparia*, Lauraceae), contains chemical compounds presenting benzoyl-derivatives named riparins, which have anti-inflammatory, antimicrobial and anxiolytic properties. However, it is unclear what kind of interaction riparins perform with any molecular target. As a profitable target, human serum albumin (HSA) is one of the principal extracellular proteins, with an exceptional capacity to interact with several molecules, and it also plays a crucial role in the transport, distribution, and metabolism of a wide variety of endogenous and exogenous ligands. To outline the HSA–riparin interaction mechanism, spectroscopy and computational methods were synergistically applied. An evaluation through fluorescence spectroscopy showed that the emission, attributed to Trp 214, at 346 nm decreased with titrations of riparins. A static quenching mechanism was observed in the binding of riparins to HSA. Fluorescence experiments performed at 298, 308 and 318 K made it possible to conduct thermodynamic analysis indicating a spontaneous reaction in the complex formation ($\Delta G < 0$). The enthalpy–entropy balance experiment with a molecular modeling calculation revealed that hydrophobic, hydrogen bond and non-specific interactions are present for riparin I–III with HSA. The set of results from fractional fluorescence changes obtained through Schatchard was inconclusive in establishing what kind of cooperativity is present in the interaction. To shed light upon the HSA–riparins complex, Hill's approach was utilized to distinguish the index of affinity and the binding constant. A correspondence between the molecular structures of riparins, due to the presence of the hydroxyl group in the B-ring, with thermodynamic parameters and index of affinity were observed. Riparin III performs an intramolecular hydrogen bond, which affects the Hill coefficient and the binding constant. Therefore, the presence of hydroxyl groups is capable of modulating the interaction between riparins and HSA. Site marker competitive experiments indicated Site I as being the most suitable, and the molecular modeling tools reinforced the experimental results detailing the participation of residues.

© 2017 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The Lauraceae family is considered to be one of the most fundamental families belonging to the Magnoliophyta division, having become widely distributed throughout tropical and subtropical regions, being composed at approximately 52 genera and 3000 species [1]. Lauraceae are utilized in papermaking, carpentry, construction, perfumery (essential oil), chemicals and folk medicine [2]. Different species of this family

are also known worldwide mainly for their use in cooking, such as bay leaf (*Laurus nobilis*) avocado (*Persea americana*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicu*) [3].

Aniba riparia (Ness) Mez, popularly known in Brazil as *louro*, is a typical plant of the Amazon region [4], commonly used as a spice. Its fruits contain many different chemical components, such as flavonoids, neolignans, stilipironas and alkamides [5]. Methyl ether of *N*-benzoyl-tyramine (riparin I, insert in Fig. 1a), methyl ether of *N*-2-hydroxy-benzoyl-tyramine (riparin II, insert in Fig. 1b) and methyl ether of *N*-2,6-dihydroxy-benzoyl-tyramine (riparin III, insert in Fig. 1c) have been isolated from the green fruit of this plant [6]. These molecules have important anti-inflammatory, antimicrobial and anxiolytic pharmacological effects, and great therapeutic potential [6,7].

* Corresponding author at: Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2255, CEP 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil.

E-mail address: mario@ibilce.unesp.br (M.L. Cornélio).

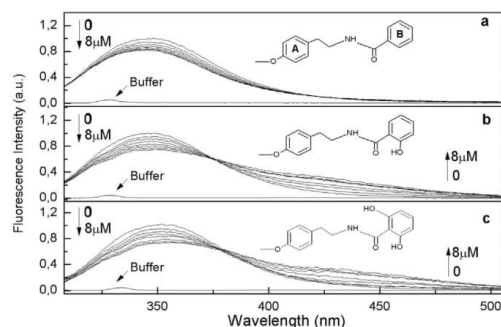


Fig. 1. Fluorescence emission spectra of HSA (4 μ M) at different concentrations (0 to 8 μ M) of (a) riparin I (b) riparin II and (c) riparin III at 298 K. Inserts shows the correspondent molecular structure.

Riparin I, for example, demonstrated antinociceptive activity [8] and anti-anxiety effects in animal models [9]. Studies with riparin II revealed that it may inhibit directly or indirectly the activity, production or release of pro-inflammatory mediators involved in the generation of pain associated with inflammation [7], and produces significant antidepressant activity [10]. Riparin III, administered intraperitoneally or orally, also showed anxiolytic and antidepressant activity in rodents [10–12]. Moreover, natural riparins showed antimicrobial activity in multi-drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* [13]. However, the interactions of these benzoyl derivatives with specific molecular targets have not been fully understood.

As a profitable target, human serum albumin (HSA) is one of the most important and abundant proteins in the circulatory system. It is a 585-residue monomer and consists of three homologous domains (denoted I, II and III), each of which has two sub-domains, A and B, possessing common structural motifs [14]. HSA has an exceptional capacity to interact with many molecules, playing a crucial role in the transport, distribution, and metabolism of a wide variety of endogenous and exogenous ligands [15]. Site I and site II, located respectively in subdomains IIA and IIIA are two major ligand binding sites for small organic molecules. Recently, subdomain IB (site III) has been identified as the primary or secondary binding site for some compounds [16]. Structural features of compounds, specifically the number and configuration of hydroxyl radical on polyphenols, influence binding characteristics with this transport protein. The —OH moiety is also associated with the reactivity of aromatic molecules and is important for their biological activities [17–19].

In that sense, an investigation of the interaction between riparin I, II and III and HSA contributes to an understanding of the riparin-protein affinity, disposition, transportation and metabolism of these benzoyl-tyramines at molecular level. In the present study, fluorescence quenching was employed to probe the affinity of riparins to HSA under simulative physiological conditions. Particularly, the influence of the hydroxylation pattern, present in riparin II and III, on binding characteristics with HSA was analyzed, as was the specific binding site for each riparin on HSA. As part of the strategy to tackle the problem computational methods were applied with experimental parameters as references to perform the docking.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Riparins were isolated by one of our collaborators in pure form for the study. Human serum albumin, warfarin, ibuprofen, methyl orange, dibasic sodium phosphate, methanol and sodium chloride (NaCl) were

purchased from Sigma Aldrich Chemical Company (USA). All other chemicals were analytical grade and Milli-Q ultrapure water was used throughout the experiment. HSA was dissolved in a phosphate buffer solution of 50 mM containing NaCl (150 mM, pH 7.0). The protein concentration was determined spectrophotometrically using the molar extinction coefficient of $36,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 280 nm. Riparin I, riparin II and riparin III stock solutions were prepared in methanol with 23.8, 5.42 and 1.23 mM, respectively.

2.2. Fluorescence Spectroscopy

Fluorescence measurements were performed on a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer equipped with 1.0 cm quartz cells and Carry Eclipse thermostat bath. Both excitation and emission slits were set at 5.0 nm. The fluorescence spectra were recorded in the range of 300–505 nm and the excitation wavelength of 295 nm was chosen, since it provides excitation of the single tryptophan residue (Trp 214) and avoids absorption of tyrosine residues. All fluorescence intensities were corrected for the buffer and inner filter effects (Eq. (1)) [20–22].

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times e^{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})/2} \quad (1)$$

F_{corr} and F_{obs} are the fluorescence intensity corrected and observed and A_{ex} and A_{em} are the absorbance of the system at the excitation and emission wavelengths, respectively.

In fluorescence quenching experiments, titration was performed by adding appropriate quantities of riparin I–III stock solution to the HSA solution (2.0 mL) at constant concentrations of 2.0, 4.0 and 8.0 μ M. In experiments to determine the Stern-Volmer constant and Binding Data Analysis the HSA concentration remained constant at 4.0 μ M, and the riparin concentrations varied from 0 to 8 μ M with increments of 1.0 μ M at 298, 308 and 318 K. For the binding density function (BDF) method, titration was performed at HSA concentrations of 2.0 and 8.0 μ M and the range of riparin concentrations were 0–12 μ M, with increments of 1.0 μ M, at 298 K. The effect of methanol as a co-solvent was verified by adding aliquots to the HSA solution (2.0, 4.0 and 8.0 μ M, at 298 K) within the volume variation of previous titrations. The final volume of methanol in the buffer was <1%, in all experiments.

2.3. Site Marker Competitive Experiments

Competitive experiments were carried out by the use of warfarin, ibuprofen and methyl orange which bind to site I, site II, and site III, respectively [16,23]. The ratio of site marker to HSA solution was 1:1 (4.0 μ M each). After 1 h incubation of the mixtures, amounts of riparin I, II and III solution, varying from 0 to 10 μ M with increments of 1.0 μ M, were added to each of HSA-marker solutions as previously. The fluorescence spectra were recorded at 298 K under the same experimental conditions described above.

2.4. Ab Initio Calculation

The Gaussian 09 program [24] provided by Núcleo de Computação Científica da Universidade Estadual Paulista (NCC/GridUNESP) was applied to the calculation of riparin structures. The optimized geometry was calculated in the gas phase with riparin molecules isolated by using DFT/B3LYP/6-31G(d,p) method. The next step, the vibrational frequency calculation, was performed to check the optimized riparin molecules. The molecular electrostatic potential (MEP) map was calculated to investigate the distribution of charge density on the molecular surface of riparin I, II and III.

2.5. Molecular Modeling Calculation

The crystal structure of HSA (PDB ID: 1A06) [25] was obtained from the Protein Data Bank. The three-dimensional structure of riparin molecules was obtained from Gaussian 09 program [24]. AutoDockTools (ADT) [26] was used to prepare the HSA and riparins by merging non-polar hydrogen atoms, adding partial charges and atom types. The ligand rigid root was generated automatically, defining all possible rotatable bonds and torsions them as active for riparins, except for riparin III, whose C3-C21 bond was set as non-rotatable, keeping the intramolecular hydrogen bond between the hydrogen atom H22 from hydroxyl and the oxygen O3 from carbonyl group. Grid maps were generated with 0.375 Å spacing and dimensions of $60 \times 60 \times 60$ points by the AutoGrid 4.2 program [27], centered on site 1 of the HSA structure. The AutoDock 4.2 program [27] was employed to study the binding site between riparins and HSA by applying the Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) for minimization using a number of energy evaluations of 2.5 million, a population size of 150 and root-square-mean deviation (RMSD) tolerance for cluster analysis of 2.0 Å. Random starting positions on the entire protein surface and random orientations were used for the ligands. For each docking simulation, 100 different conformers were generated. The structural representation was prepared using PyMOL [28], and the map of interaction was calculated using LigPlot [29].

3. Results and Discussion

3.1. Fluorescence Quenching of HSA Upon Addition of Riparins

Intrinsic fluorescence spectra of HSA at different concentrations of riparin I, II and III are shown in Fig. 1a, b, and c, respectively. It can be seen that, upon excitation at 295 nm, HSA exhibits a maximum emission peak at 346 nm, solely contributed by tryptophan (Trp 214) residue in HSA. The HSA emission decreased with the increment of riparin concentration, indicating that the interaction of benzoyl-tyramines quenched the intrinsic fluorescence of HSA. Further, upon the addition of riparin II and III, two isosbestic point formations were noted at 364 and 369 nm, respectively. This phenomenon indicates the existence of benzoyl-tyramine derivatives bound to HSA at equilibrium [30]. Also, riparins II and III showed a clear second peak, which increases with titration, and corresponds to the riparin signals at 413 and 422 nm, respectively [31]; these contributions were subtracted from the HSA fluorescence signal.

3.2. Fluorescence Quenching Mechanisms

Fluorescence quenching mechanisms are classified as being either dynamic or static. The former is due to collision between the quencher and fluorophore and the latter, to the formation of a non-fluorescent ground state complex. These two mechanisms may be discriminated in response to temperature. The bound complexes, for static quenching, become more unstable as temperature increases and quenching constants decrease; the opposite behavior is observed for dynamic quenching. The quenching mechanism is currently analyzed by the Stern-Volmer model [21]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2)$$

F_0 and F represent the fluorescence intensity before and after quencher addition, respectively; K_q is the biomolecular quenching constant; τ_0 is the average fluorescence lifetime of the molecule without a quencher; generally 10^{-8} s [21]; $[Q]$ is the quencher concentration, and K_{SV} is the Stern-Volmer constant, which can be determined by linear regression of a plot of F_0/F against $[Q]$. Stern-Volmer plots for the fluorescence quenching of HSA (4 μ M) in the presence of riparin I–III at 298, 308 and 318 K are shown in Fig. 2. According to the linear

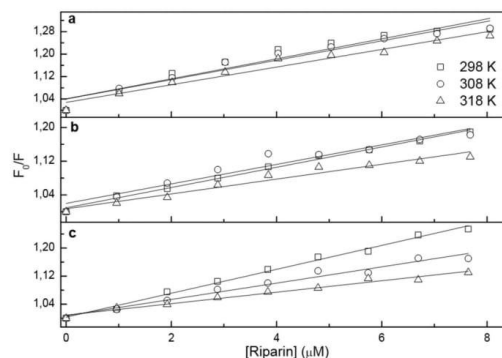


Fig. 2. Stern-Volmer plots for the fluorescence quenching of HSA (4 μ M) in the presence of (a) riparin I (b) riparin II and (c) riparin III at 298, 308 and 318 K.

adjustment for the experimental data the slope of the curves indicates a decrement as temperature rises. Such a response to temperature corresponds to a static quenching mechanism.

3.3. Binding Constants

The binding constants (K_a) and the number of binding sites (n) per protein can be obtained by Double-logarithm plot [32]:

$$\log \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = n \log K_a - n \log \left(\frac{1}{[Q] - \frac{(F_0 - F)}{F_0} [P]} \right) \quad (3)$$

where $[P]$ is the protein concentration. Double plots are shown in Fig. 3 and the values of K_b and n are listed in Table 1. The constants represent phenomenological parameters, with n indicating the quantity of binding sites and K_a their binding affinity [33]. The values of n are approximately 1.0 and K_a the order of 10^4 M^{-1} , which is a mild constant. The K_b magnitude contains important features about the complex formation. It responds to temperature variation, assisting in the search for the forces that stabilize the complex [30]. Table 1 summarizes the K_{SV} , K_q and K_a constants.

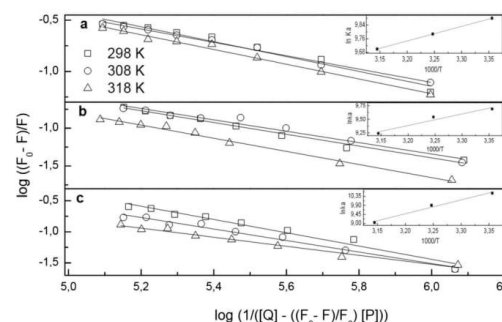


Fig. 3. Double-log plots for the fluorescence quenching of HSA (4 μ M) in the presence of (a) riparin I (b) riparin II and (c) riparin III at 298, 308 and 318 K. The inserts show the Van't Hoff plot.

Table 1

Values of the Stern–Volmer constant (K_{SV}) for tryptophan fluorescence quenching of HSA, biomolecular quenching constant (K_q) binding constants (K_a) and binding site numbers (n) of the interaction between HSA and riparin I, II or III at 298, 308 and 318 K.

Quencher	T(K)	$K_{SV} (\times 10^4 \text{ M}^{-1})$	$K_q (\times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$K_a (\times 10^4 \text{ M}^{-1})$	n
Riparin I	298	3,56	3,56	1,95	0,62
	308	3,45	3,45	1,78	0,62
	318	3,14	3,14	1,63	0,66
Riparin II	298	2,41	2,41	1,75	0,78
	308	2,31	2,31	1,64	0,75
	318	1,76	1,76	1,24	0,88
Riparin III	298	3,41	3,41	4,28	1,04
	308	2,32	2,32	2,15	0,91
	318	1,63	1,63	0,77	0,72

The correlation coefficient is $\geq 0,98$.

3.4. Thermodynamic Parameters and Driven Forces

In general, the driven forces between a small molecule and a protein include Van der Waals force, hydrogen bonding, electrostatic and hydrophobic interactions. The signs and magnitude of the thermodynamic parameters, enthalpy (ΔH), entropy (ΔS) changes and free energy (ΔG), of the binding reaction may indicate the types of binding along with the interaction [34]. According to the Van't Hoff analysis, if the enthalpy does not change significantly with the range of temperature experimentally applied, then the entropy value can be reached:

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

K_a is the binding constant at the corresponding temperature and R is the gas constant. The Gibbs free energy is estimated according to the following relationship:

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

The Van't Hoff plots for the binding of HSA to riparin I–III are shown as inserts in Fig. 3, which correspond to the thermodynamic parameters that are summarized in Table 2. The negative Gibbs free energy values calculated for all riparins mean that the interaction is a spontaneous process. The negative value for ΔH and positive for ΔS are determined for the riparin I and riparin II–HSA complexes, suggesting that the driving forces between these riparins with HSA are composed by non-specific interactions; while both negative values of ΔH and ΔS for the riparin III–HSA indicate that the van der Waals interactions and hydrogen bonds have an important contribution during the interaction process of riparin III with HSA [35].

3.5. Site-selective Identification of Riparins on HSA

HSA interacts reversibly with drugs which bind to one or more high-affinity sites with typical association constants in the range of 10^4 – 10^6 M^{-1} . Pioneering studies by Sudlow and contributors [36]

Table 2

Thermodynamic parameters of HSA–ligand complex at 298, 308 and 318 K.

Quencher	T(K)	$\Delta H (\text{kJ mol}^{-1})$	$\Delta S (\text{J mol}^{-1})$	$\Delta G (\text{kJ mol}^{-1})$
Riparin I	298	−7,14	58,15	−24,47
	308			−25,05
	318			−25,63
Riparin II	298	−14,91	31,16	−24,19
	308			−24,51
	318			−24,82
Riparin III	298	−66,97	−135,60	−26,56
	308			−25,20
	318			−23,85

The correlation coefficient is $\geq 0,99$.

applying the fluorescent probe displacement method showed that most drugs bind with high affinity to two specific drug binding sites, namely, site I (subdomains IIA, also called the warfarin binding site) and site II (subdomains IIIA, the ibuprofen binding site) [37]. However, some drug binding sites differ from sites I and II, identified as subdomains that are neither IIA nor IIIA [38,39]; methyl orange binds in site III (subdomain IB) [30]. The binding locations are commonly identified applying standard ligands, such as warfarin, ibuprofen and methyl orange, which probe sites I, II and III, respectively.

Thus, the competition of riparins with warfarin, ibuprofen and methyl orange was investigated. The fluorescence quenching rate (F/F_0) in the presence and absence of markers was compared and is presented in Fig. 4. The difference in the quenching rate in the presence of the warfarin, when compared with the quenching rate with no marker, is remarkable. This is a strong indication that the riparins compete for the same site of warfarin and bind to HSA chiefly in site I.

3.6. Binding Density Function Method

In order to ensure a more realistic approach regarding the complex formation and stability a second experimental method was applied. Equilibrium binding isotherms, for a ligand binding to a macromolecule (protein), represent the relationship between total average binding density Σv_i and the free ligand concentration $[L]_{\text{free}}$ [40].

The fractional fluorescence change (ΔF_{obs}) is the fluorescence signal normalized to the initial fluorescence of the free macromolecule:

$$\Delta F_{\text{obs}} = \frac{F_{\text{obs}} - F_{\text{free}}[M]_T}{F_{\text{free}}[M]_T} \quad (6)$$

F_{obs} is the observed spectroscopic signal, $F_{\text{free}}[M]_T$ the observed spectroscopic signal for a free macromolecule in the absence of a ligand and the total concentration of macromolecules. The values of ΔF_{obs} were plotted as a function of the logarithm of the total ligand concentration $[L]_T$ (see Fig. 5). At two different total concentrations of macromolecule ($[M]_{T1}$ and $[M]_{T2}$) the observed value of ΔF_{obs} is equal, so that Σv_i and $[L]_{\text{free}}$ must be the same for both titration curves.

In order to find the same value of ΔF_{obs} an interpolation procedure was performed using a sigmoid adjustment for both macromolecule concentrations. According to the mass conservation equation, (Eq. (7)), for the total concentration protein, $[L]_{\text{free}}$ and Σv_i can be determined by the linear regression of a plot of $[L]_T$ against $[M]_T$ (see insert in Fig. 5) [41].

$$[L]_T = [L]_{\text{free}} + \Sigma v_i [M]_T \quad (7)$$

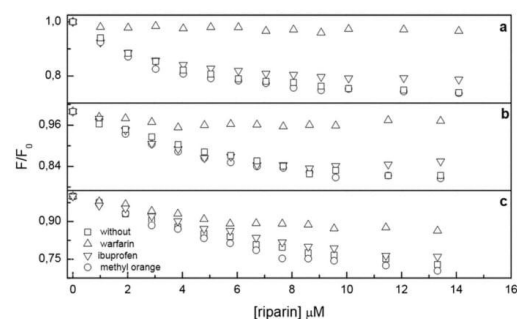


Fig. 4. Fluorescence quenching rate of HSA at different concentrations (0–10 μM) of (a) riparin I, (b) riparin II and (c) riparin III in the absence and presence of site markers (warfarin, methyl orange or ibuprofen). $[HSA] = [\text{marker}] = 4 \mu\text{M}$, pH 7 and 298 K.

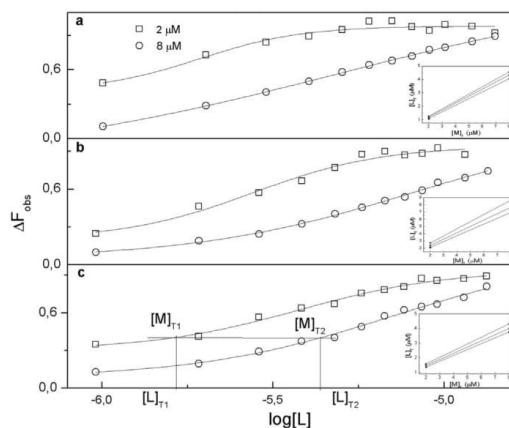


Fig. 5. Semilogarithmic plots of fluorescence titration of (a) riparin I (b) riparin II and (c) riparin III with HSA at two different protein concentrations at 298 K. The vertical lines indicate the total ligand concentrations $[L]_{T1}$ and $[L]_{T2}$ at the same selected value of the observed fluorescence change, marked by the horizontal line, ΔF_{obs} , at which the total average of ligand binding is the same for both titration curves. Inserts correspond to only three sets of concentration pairs (L_T ; M_T) to exemplify the utilization of Eq. (6) obtaining Σv_i and $[L]_{free}$ values.

Once $\Sigma v_i [L]_{free}$ and $[L]_{free}$ were obtained the Scatchard plot ($\Sigma v_i / [L]_{free}$ versus Σv_i) was constructed and is presented in Fig. 6.

The Scatchard plots show a concave shape with a 'tail' near the saturation for riparin I and II, Fig. 6a and Fig. 6b, respectively. The concavity shape in these cases indicates that the process of ligand binding may have a mix of negative and positive cooperativity. For riparin III, Fig. 6c shows that the elongation on the concavity is shorter which may be considered a negative cooperativity. The response profiles of the Scatchard plots are inconclusive so it is necessary to resort to Hill's formalism to elucidate the interaction mechanism. Hill relationship was

used according to Eq. (8) [42–44].

$$\Sigma v_i = \frac{n_H (K [L]_{free})^{n_H}}{1 + (K [L]_{free})^{n_H}} \quad (8)$$

The results obtained according to Eq. (8) are summarized in the Table 3. The Hill coefficient (n_H) may be interpreted as the index of affinity between the ligand and the macromolecule, and K the binding constant. The values of n_H obtained to Riparin I, free of OH group at B-ring, is close to Riparin II, which has the first OH group positioned at C2 carbon atom, both presented a mild association constant. From the thermodynamic evaluation Riparins I and II while interacting with HSA performed a spontaneous reaction ($\Delta G < 0$), presented an enthalpic-entropic balance revealing resemblance between hydrophobic and non-specific interactions. The results presented for Riparin III, which has the second OH group positioned at C6 carbon atoms, deviated from the previous results. It was found that the index of affinity was the lowest of all. The association constant drops by a factor of two in comparison with riparin II, and the energetic balance, although favorable ($\Delta G < 0$), the enthalpy-entropic balance showed an important changes in signal and magnitude of the entropic contribution, which becomes negative, perhaps an indication of non-specific interaction enhancement not detected previously. The capacity of performing hydrogen bonds is expected for the ligand while interacting with protein [18], unless such an interaction preferentially occurs as intramolecular mode, which affects the binding constant. According to the literature [45], riparin III is able to perform intramolecular hydrogen bounds between one of the H atom of the OH groups with the O atom of the C=O group.

3.7. Ab Initio Calculation

The optimization and vibrational calculation performed for the riparins using the DFT/B3LYP/6-31G(d,p) method showed that the optimized structure is stable (global minimum on the potential energy surface), since no imaginary frequency is obtained. Some calculated bond distances, bond angles, and dihedral angles are presented in Table S1 of Supplementary material. From the MEP of riparins (Supplementary

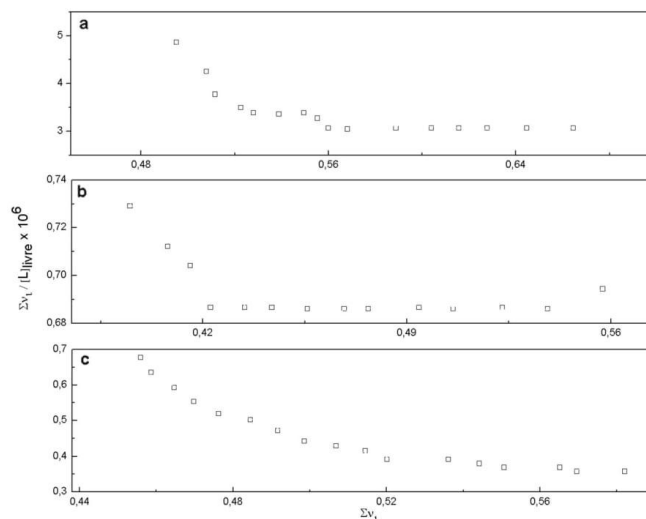


Fig. 6. Scatchard plots of (a) riparin I, (b) riparin II and (c) riparin III with HSA.

Table 3

Affinity index (n_H) and binding constant (K) obtained using Hill function for HSA-riparin I–III systems.

Quencher	n_H	K (M^{-1})
Riparin I	5,9	$4,03 \times 10^6$
Riparin II	6,1	$1,25 \times 10^6$
Riparin III	3,4	$5,57 \times 10^5$

material, Fig. S1) it is possible to note the existence of a neutral charge distribution on the planar faces of the rings of the molecule. A dense distribution of negative partial charges can also be seen near the O3 oxygen atom for riparin I, O22 atom for riparin II and III. On the other hand, a positive electrostatic potential is localized near the H^N hydrogen atom in the riparins, and other regions of the molecules comparatively less dense near the hydrogen of C141 carbon atoms.

3.8. Molecular Modeling Calculation

The fluorescent probe displacement results were used to perform the molecular modeling calculations, positioning the riparin molecules at site I of HSA. The best theoretical binding energies (ΔG_b) for riparin I, II and III are -29.8 , -30.7 and -28.3 kJ mol⁻¹, with corresponding

theoretical binding constants of 1.7×10^5 , 2.4×10^5 and 9.0×10^4 M⁻¹ at 298 K, respectively, which is very close to the trend found experimentally.

Fig. 7 summarizes the interaction between HSA and riparins from three different perspectives. At the top, Fig. 7A shows the tertiary structure of HSA with the location of the riparin molecules in its subdomain IIA (site I), as well as the position of its single Trp214 residue. In the middle, Fig. 7B–D present in more detail the three-dimensional binding environment of riparin I, II and III at site I of HSA, respectively, showing the amino acid residues of the protein involved in the interaction with the riparins. At the bottom, Fig. 7E–G show the analysis of the non-covalent interactions at site I for riparin I, II and III, respectively, performed using LigPlot program [29].

On the left branch (Fig. 7E), Ser192, Lys 195, Lys199, Leu238, His242, Leu260, Ala261, Ser287, Ile290, and Ala291 residues Leu198Trp214 Leu238Val344Pro447Val455 are involved in hydrophobic interactions with the riparin I. The Tyr150, Gln196 and Arg257 residues form hydrogen bonds with the ligand. The OH and NH group of Tyr150 and Arg257 side chain make up two hydrogen bonds with the O3 oxygen atom of riparin I, presenting formation distances of 2.47 and 3.04 Å, respectively. Such an oxygen atom presents the densest distribution of negative partial charge as can be seen in MEP of the molecule (Fig. S1A). The NH₂ group of the Gln196 side chain forms a hydrogen bond with the oxygen

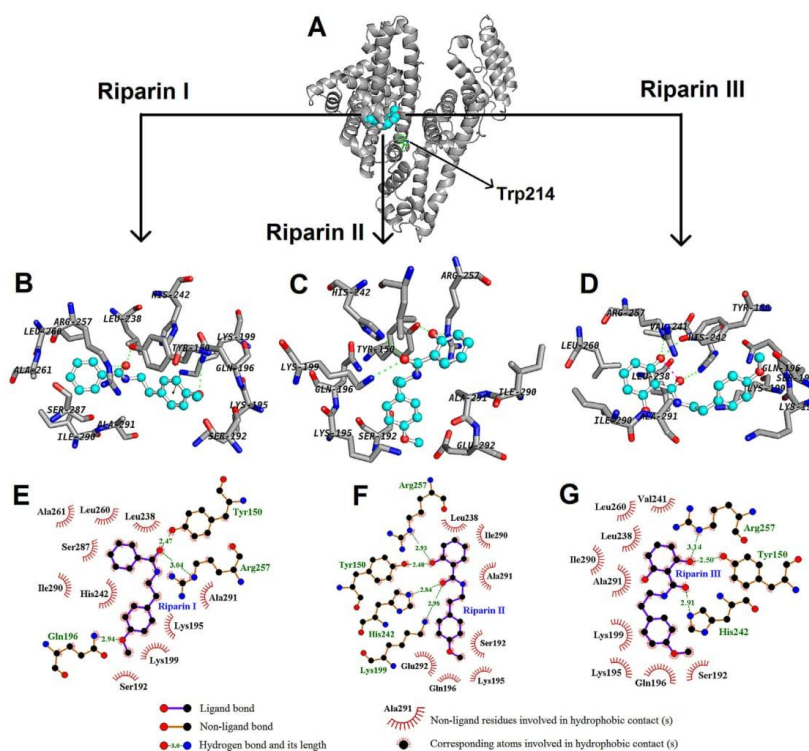


Fig. 7. (a) Location of the riparin molecules in the subdomain IIA (site I) of HSA, close to the single tryptophan residue (Trp214). The protein is shown as cartoon and riparin molecules as spheres. Three-dimensional structural detail of the microenvironment interaction of riparin I (b), II (c) and III (d) with the site I of HSA obtained by molecular modeling calculations. Riparin molecules are shown as sticks and balls model, the amino acid residues are denoted as sticks (C, gray; O, red; N, blue; H, white), and inter and intramolecular hydrogen bonds depicted by green and magenta dotted line, respectively. The cation- π interaction (Lys199/A-ring) is indicated by dashed white line identified by AutoDockTools. Two-dimensional representation of the interaction maps between riparin I (e), II (f) and III (g) and residues of site I of HSA. The structural representation was prepared using PyMOL [28] and the map of interactions was calculated using LigPlot [29]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

atom O14 of riparin I, having a formation distance of 2.94 Å. A special case occurs with Lys199 residue, it performs electrostatic interaction of the cation- π type with the A-ring (insert at Fig. 1) of riparin I (Fig. 7b).

On the central branch (Fig. 7F), Ser192, Lys195, Gln196, Leu238, Ile290, Ala291, and Glu292 residues Leu198Trp214Leu238Val344Pro447Val455 are taking part in hydrophobic contributions of the interaction with riparin II. The Tyr150, Lys199, His242, and Arg257 residues make up hydrogen bonds with the molecule. The OH and NH group of the Tyr150 and Arg257 side chain form two hydrogen bonds with the O22 oxygen atom of riparin II, showing formation distances of 2.40 and 2.93 Å, respectively. This O22 atom presents the densest distribution of negative charge as can be seen in MEP of the molecule (Fig. S1B). The NH_2^+ and NH (position E1) group of Lys199 and His242 side chain make up two hydrogen bonds with the O3 oxygen atom of riparin II, having a formation distance of 2.98 and 2.84 Å, respectively.

On the right branch (Fig. 7G), Ser192, Lys195, Gln196, Lys199, Leu238, Val241, Leu260, Ile290, and Ala291 residues Leu198Trp214Leu238Val344Pro447Val455 are participating in hydrophobic interactions with the riparin III molecule. The Tyr150, His242 and Arg257 residues form hydrogen bonds with the ligand. The OH and NH group of the Tyr150 and Arg257 side chain makes up two hydrogen bonds with the O22 oxygen atom of ligand, presenting formation distances of 2.49 and 3.05 Å, respectively. The $\text{NH}(\epsilon_2)$ group of His242 side chain forms a hydrogen bond with the O3 oxygen atom of riparin III, having a formation distance of 2.91 Å.

From the LigPlot results, it is possible to see that hydrophobic interactions are the largest contribution in binding riparins to site I of HSA, with the following sequence: riparin I (ten residues), riparin III (eight residues) and riparin II (seven residues). However, the electrostatic interactions present a significant contribution to complex stabilization in the formation of hydrogen bonds. The HSA-riparin II complex has four hydrogen bonds while the interaction of the riparin I and III with HSA presents three. It is important to note that the amino acid residues of HSA involved in the binding with riparins are highly preserved, and Tyr150 and Arg257 residues are always present in the formation of hydrogen bonds with riparins, playing a key role in the ligands binding at site I of the protein.

4. Conclusion

The molecular mechanism of interactions between riparins and human serum albumin were exploited through fluorescence spectroscopy and computational methods. The endogenous fluorescence intensity of Trp 214 was the key to monitor the interaction as a whole, making it possible to search for the quenching mechanism, binding sites, affinity index, and thermodynamic parameters. The results of the binding data analysis showed that all riparins accessed the same binding site (site I), however with differences in the affinity index, indicating that some specific feature may be related with the frame of riparin. Riparin I and II presented a slight difference in the value of the binding constant, which may be due to the presence of the first OH chemical group in the riparin II molecule. In the case of riparin III, the decrease in the binding constant was more pronounced when compared to riparin I and II, which again may be pointing to the addition of the second OH chemical group to the riparin structure. All these results have a direct relationship with the thermodynamic assays. For riparin I and II, the signals for ΔG , ΔH are negative, while ΔS positive. In terms of magnitude, the enthalpy contribution for riparin II, compared to riparin I, almost doubled in value being more likely to form hydrogen bonds. On the other hand, the value of entropy dropped almost half, which means that the contribution of non-specific interaction became less effective. The signal and magnitude changes of the entropic contribution for riparin III are related to its own molecular frame, more precisely at the B-ring (insert Fig. 1) which is the structure where the hydroxyl group hangs. The addition of the second OH group to riparin III shows

how important is during the formation of the complex, therefore interfering in the affinity index. This may be linked to the capacity of riparin III to perform an intramolecular hydrogen bond, perceptible through the experimental bias responses and detailed by computational tools. In conclusion we suggest that the hydroxyl group modulated the interaction between riparin and human serum albumin. The next steps for future work are based on the synergistic approach using physical and computational tools. Molecular targets with a more specific profile than human albumin are of great importance from the point of view of human health and well-being.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2017.08.068>.

Acknowledgment

The author CRC gratefully acknowledges a CAPES scholarship and professor Altair Benedito Moreira by the use of the fluorimetry equipment supported by Fapesp (Process 2014/22400-3).

References

- [1] S.G. Dos Santos, K.F. Queiroga, A.M.F. De Oliveira, J.F. Tavares, S.J.C. Gutierrez, M.D.F.F.M. Diniz, J.M. Barbosa-Filho, M.S. Da Silva, Blood matrix effects for male and female Wistar rats, in simultaneous HPLC-UV determination of riparin I and III from *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae), *Talanta* 86 (2011) 233–240, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.09.008>.
- [2] A. Quinet, R.H. Potsch Andreata, Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, 53, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil, Rodriguésia, 2002 59–121.
- [3] C. Marques, Importância econômica da família Lauraceae Lindl, *Flora E Ambient.* 8 (2001) 195–206.
- [4] R.O. Silva, S.R.B. Damasceno, I.S. Silva, V.G. Silva, C.F.C. Brito, A. Eder, A. Teixeira, G.B.L. Nunes, C.A. Camara, J.M.B. Filho, S.J.C. Gutierrez, R.A. Ribeiro, M.H.L.P. Souza, A.L.R. Barbosa, R.M. Freitas, J.V.R. Medeiros, Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration, *Chem. Biol. Interact.* 229 (2015) 55–63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.029>.
- [5] J.M. Barbosa-Filho, M. Yoshida, O.R. Gottlieb, R. de C.S.B.C. Barbosa, A.M. Giesbrecht, M. Claudia M. Young, Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*, *Phytochemistry* 26 (1987) 2615–2617, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83890-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83890-X).
- [6] U.V. Castelo-Branco, U.J.V. Castelo-Branco, G. Thomas, C.C. De Araújo, J.M. Barbosa-Filho, Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Nees) mez (Lauraceae), *Acta Farm. Bonaer.* 19 (2000) 197–202.
- [7] A.M.R. de Carvalho, N.F.M. Rocha, L.F. Vasconcelos, E.R.V. Rios, M.L. Dias, M.J.C. Silva, M.M. De França Fonteles, J.M.B. Filho, S.J.C. Gutierrez, F.C.F. De Sousa, Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models, *Chem. Biol. Interact.* 205 (2013) 165–172, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.07.007>.
- [8] F.L.O. Araújo, C.T.V. Melo, N.F.M. Rocha, B.A. Moura, C.P. Leite, J.F. Amaral, J.M. Barbosa-Filho, S.J.C. Gutierrez, S.M.M. Vasconcelos, G.S.B. Viana, F.C.F. De Sousa, Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 380 (2009) 337–344, <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-009-0433-9>.
- [9] F.C.F. de Sousa, A.P. Monteiro, C.T.V. de Melo, G.R. de Oliveira, S.M.M. Vasconcelos, M.M. de França Fonteles, S.J.C. Gutierrez, J.M. Barbosa-Filho, G.S.B. Viana, Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice, *Phytother. Res.* 19 (2005) 1005–1008, <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1771>.
- [10] C.P.L. Teixeira, C.T.V. De Melo, F.L.O. De Araújo, A.M.R. De Carvalho, M.J.C. Silva, J.M. Barbosa-Filho, D.S. Macêdo, G.S. De Barros Viana, F.C.F. De Sousa, Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 27 (2013) 129–137, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-8206.2011.00973.x>.
- [11] C.T.V. de Melo, A.P. Monteiro, C.P. Leite, F.L.O. de Araújo, V.T.M. Lima, J.M. Barbosa-Filho, M.M. de França Fonteles, S.M.M. de Vasconcelos, G.S. de Barros Viana, F.C.F. de Sousa, Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 451–454, <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.29.451>.
- [12] F.C.F. Sousa, C.T.V. Melo, A.P. Monteiro, V.T.M. Lima, S.J.C. Gutierrez, B.A. Pereira, J.M. Barbosa-Filho, S.M.M. Vasconcelos, M.F. Fonteles, G.S.B. Viana, Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78 (2004) 27–33, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2004.01.019>.
- [13] R.M.R. Catão, J.M. Barbosa-Filho, E.D.O. Lima, M. do S.V. Pereira, T.A. Arruda, R.P.A. Miranda, Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*, *Rev. Bras. Anal. Clin.* 42 (2010) 9–14.
- [14] M. Dockal, D.C. Cater, F. Rüker, The three recombinant domains of human serum albumin, *October* 274 (1999) 29303–29310.

- [15] E.L. Gelamo, M. Tabak, Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 56 (2000) 2255–2271.
- [16] F. Zsila, Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 1668–1682, <http://dx.doi.org/10.1021/mp400027q>.
- [17] C.G.M. Heijnen, G.R.M.M. Haenen, F.A.A. van Acker, W.J.F. van der Vijgh, A. Bast, Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups, *Toxicol. in Vitro* 15 (2001) 3–6, [http://dx.doi.org/10.1016/S0887-2333\(00\)00053-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0887-2333(00)00053-9).
- [18] J. Xiao, M. Suzuki, X. Jiang, K. Yamamoto, F. Ren, M. Xu, Influence of B-ring hydroxylation on interactions of flavonols with bovine serum albumin influence of B-ring hydroxylation on interactions of flavonols with bovine serum albumin, *Society* (2008) 2–9, <http://dx.doi.org/10.1021/jf7037295>.
- [19] O.L. Woodman, W.F. Meeker, M. Boujaoude, Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones: structure-activity relationships, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 46 (2005) 302–309, <http://dx.doi.org/10.1097/01.fjc.0000175431.62626.07>.
- [20] Í.P. Caruso, J.M.B. Filho, A.S. De Araújo, F.P. De Souza, M.A. Fossey, M.L. Cornélio, An integrated approach with experimental and computational tools outlining the cooperative binding between 2-phenylchromone and human serum albumin, *Food Chem.* 196 (2016) 935–942, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.027>.
- [21] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed. Kluwer Academic Publisher/Plenum Press, New York, 1999.
- [22] D. Wu, J. Yan, J. Wang, Q. Wang, H. Li, Characterisation of interaction between food colourant allura red AC and human serum albumin: multispectroscopic analyses and docking simulations, *Food Chem.* 170 (2015) 423–429, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.088>.
- [23] T. Wybranowski, M. Cyraniewicz, B. Ziolkowska, S. Kruszewski, The HSA affinity of warfarin and flurbiprofen determined by fluorescence anisotropy measurements of camptothecin, *Biosystems* 94 (2008) 258–262, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystems.2008.05.034>.
- [24] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, J.E.P. Jr., F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, *Gaussian 09, Revision A.02*, 2009.
- [25] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution, *Protein Eng.* 12 (1999) 439–446, <http://dx.doi.org/10.1093/protein/12.6.439>.
- [26] M.F. Sanner, Python: a programming language for software integration and development, *J. Mol. Graph. Model.* 17 (1999) 57–61.
- [27] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 1639–1662, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B).
- [28] W.L. Delano, The PyMOL Molecular Graphics System, San Carlos, CA, USA, 2002.
- [29] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions, *Protein Eng.* 8 (1995) 127–134, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.24.4940>.
- [30] Y. Yue, Q. Dong, Y. Zhang, X. Li, X. Yan, Y. Sun, J. Liu, Synthesis of imidazole derivatives and the spectral characterization of the binding properties towards human serum albumin, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 153 (2016) 688–703, <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2015.09.023>.
- [31] Y. Ni, R. Zhu, S. Kokot, Competitive binding of small molecules with biopolymers: a fluorescence spectroscopy and chemometrics study of the interaction of aspirin and ibuprofen with BSA, *Analyst* 136 (2011) 4794, <http://dx.doi.org/10.1039/c1an15550d>.
- [32] S. Bi, L. Ding, Y. Tian, D. Song, X. Zhou, X. Liu, H. Zhang, Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin, *J. Mol. Struct.* 703 (2004) 37–45, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.05.026>.
- [33] M. Van De Weert, L. Stella, Fluorescence quenching and ligand binding: a critical discussion of a popular methodology, *J. Mol. Struct.* 998 (2011) 145–150, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.05.023>.
- [34] P.D. Ross, S. Subramanian, Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability, *Biochemistry* 20 (1981) 3096–3102, <http://dx.doi.org/10.1021/bi00514a017>.
- [35] Í.P. Caruso, W. Vilegas, M.A. Fossey, M.L. Cornélio, Exploring the binding mechanism of Guaijaverin to human serum albumin: fluorescence spectroscopy and computational approach, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 97 (2012) 449–455, <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.06.043>.
- [36] G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade, The characterization of two specific drug binding sites on human serum, *Mol. Pharmacol.* 11 (1975) 824–832.
- [37] G. Zhang, Y. Ma, Mechanistic and conformational studies on the interaction of food dye amaranth with human serum albumin by multispectroscopic methods, *Food Chem.* 136 (2013) 442–448, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.026>.
- [38] U. Kragh-Hansen, V.T.G. Chuang, M. Otagiri, Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 695–704, <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.25.695>.
- [39] K. Yamasaki, V.T.G. Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri, Albumin-drug interaction and its clinical implication, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1830 (2013) 5435–5443, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.005>.
- [40] D. Beckett, *Measurement and Analysis of Equilibrium Binding Titrations: A Beginner's Guide*, 1st ed. Elsevier Inc., 2011 (doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381268-1.00001-X>).
- [41] W. Bujalowski, M.J. Jezewska, Accessing thermodynamics of the unmodified macromolecule-ligand interactions through spectroscopic titrations of fluorescent analogs, *Macromolecular Competition Titration Method*, 1st ed. Elsevier Inc., 2011 (doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381268-1.00002-1>).
- [42] A.K. Bordbar, A.A. Saboury, A.A. Moosavi-Movahedi, The shapes of scatchard plots for systems with two sets of binding sites, *Biochem. Educ.* 24 (1996) 172–175, [http://dx.doi.org/10.1016/0307-4412\(95\)00122-0](http://dx.doi.org/10.1016/0307-4412(95)00122-0).
- [43] M. Daune, *Structures in motion, Molecular Biophysics*, Oxford University Press, New York, 1999.
- [44] K.E. van Holde, W.C. Johnson, P.S. Ho, *Principles of physical biochemistry*, Libr. Congr. Cat. Data. 36 (1998) 657, <http://dx.doi.org/10.1021/ed076p474.1>.
- [45] A.D.S. Marques, C. Zheng, C.T. Lin, Y. Takahata, M. Barbosa-Filho, S.J.C. Gutierrez, Electronic and structural effects in muscular relaxants: riparin I and riparin III, *J. Mol. Struct.* 753 (2005) 13–21, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2005.06.018>.