


Estudio espectroscópico e *in silico* del acoplamiento molecular de clorina e6 con albumina de suero bovino

Vicente Escobar Jonathan Osiris¹, González F. ², García Sánchez Miguel Ángel^{1*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Química. Avenida San Rafael Atlixco No. 186. Colonia Vicentina, Ciudad de México. C.P. 09340. México.

²Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Física. Avenida San Rafael Atlixco No. 186. Colonia Vicentina, Ciudad de México. C.P. 09340. México.

*Autor para correspondencia: mags@xanum.uam.mx

ORCID : 0000-0002-8352-2423

Recibido:

12/junio/2022

Aceptado:

30/diciembre/2022

Palabras clave:

BSA,
clorina e6,
interacción

Keywords:

BSA,
chlorin e6,
binding

RESUMEN

Con el fin de utilizar especies macrocíclicas tetrapirrólicas en aplicaciones médicas, se investigó la interacción de la albúmina de suero bovino (BSA) con clorina e6 (Ce6), un derivado de clorofila a, a diferentes condiciones de temperatura mediante espectroscopia de fluorescencia y de absorción UV-VIS. Estos resultados se complementaron con estudios *in silico* de acoplamiento molecular (docking) con el fin de establecer el posible sitio de fijación de Ce6 en BSA. Los resultados de fluorescencia demuestran que el apagamiento estático observado es consecuencia de la formación del complejo BSA-Ce6. El análisis termodinámico indicó que los puentes de hidrógeno y las interacciones de van der Waals son las fuerzas intermoleculares predominantes en el proceso de unión para la estabilización del complejo BSA-Ce6. La simulación *in silico* del acoplamiento molecular sugiere que el posible sitio de unión de Ce6 se establece en el sitio de unión III de BSA, en la vecindad del residuo de *Trp 134*.

ABSTRACT

In order to use tetrapyrrolic macrocyclic species in medical applications, the interactions of bovine serum albumin (BSA) with chlorin e6 (Ce6), a chlorophyll a derivative, under different conditions of temperature was investigated by fluorescence and UV-VIS absorption spectroscopies. These results are complemented by *in silico* molecular docking (docking) studies in order to establish the possible Ce6 binding site on BSA. The binding constants (K_b) values at three different temperatures were calculated using the modified Stern-Volmer equation. The results of fluorescence suggest that the static quenching is the dominant process as a result of the formation of the BSA-Ce6 complex. Thermodynamic analysis shown that hydrogen bonds and van der Waals interactions were the predominant intermolecular forces in the binding process to stabilize the BSA-Ce6 complex. Molecular docking suggests the probable binding site of the macrocyclic species at BSA occurs in the vicinity of the residue of *Trp 134*.

Introducción

El estudio de las interacciones no covalentes entre proteínas y ligandos es de enorme relevancia en el proceso de selección y formulación de nuevos agentes terapéuticos. El proceso de acoplamiento es gobernado por la termodinámica, por lo que es posible determinar el tipo de interacción involucrado que intervienen en el proceso, es decir: puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, electrostáticas y contactos hidrofóbicos principalmente (Quiocho A. y Hodel F. 2012, Murphy P. 1999) Estas interacciones intermoleculares pueden cuantificarse experimentalmente por métodos espectroscópicos o por calorimetría de titulación isotérmica (Klebe G. 2015) y computacionalmente por cálculos de energía libre o por simulación por acoplamiento molecular.

Una de las técnicas experimentales más utilizadas para el estudio de interacciones en sistemas bioquímicos se base en el apagamiento de fluorescencia que es cualquier proceso que disminuye o anula la emisión de fluorescencia de una sustancia. (Gabor M. y Justin A. 2013). Los datos obtenidos por este método pueden procesarse con diferentes modelos experimentales; como el de Stern-Volmer o el de Scatchard, etc. (Joseph R. 2006).

Muchos fármacos son transportados al sitio diana (blanco), ya sea por albúmina de suero humano (ASH) o lipoproteínas de baja densidad. La ASH es una proteína multifuncional con extraordinaria capacidad para la unión reversible de una vasta cantidad de ligandos (Karolina A. et al 2012, Ali J. Ryan et al. 2011). Generalmente, las interacciones débiles originan un tiempo corto de vida o una pobre distribución, mientras que a mayor fuerza de unión decrece la concentración del fármaco libre en plasma (Fayezeh S. et al. 2012). Debido a esto, diversos estudios pueden proporcionar información relevante sobre las características estructurales que determinan la efectividad terapéutica de los fármacos, así como, su estandarización en los procesos de escaneo y el establecimiento de dosis adecuadas (Douglas B. et al. 2004).

En investigación médica especialmente en terapia fotodinámica (TFD), el uso de porfirinas se ha enfocado principalmente en el desarrollo de agentes fotosensibilizadores (FSs). En ese sentido, se han propuesto diversos sistemas porfirinicos; por ejemplo, porfirinas catiónicas (Fabiano S. et al. 2020), metaloporfirinas (Fengshou W. et al. 2018), porfirinas halogenadas (Bamidele M. et al 2019) para su implementación en TFD.

En este trabajo se realizó un estudio espectroscópico y de simulación del acoplamiento molecular de la interacción de un derivado de clorofila *a*, la clorina e6, con albúmina de suero bovino BSA. Así mismo se determinaron los distintos parámetros termodinámicos de unión, como el ΔH_u y ΔS_u , los cuales son un requisito fundamental para analizar su viabilidad en el acarreo o liberación controlada para posibles fines médicos.

Metodología

Reactivos

Todos los reactivos para la extracción de clorofila *a* y preparación de clorina e6 fueron de grado reactivo. Todos los disolventes y todos los reactivos sólidos empleados en este trabajo se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos) o J. Baker. La Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) se preparó a partir de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 . Todas las pruebas se llevaron a cabo usando agua desionizada.

Extracción de clorofila *a* y preparación de clorina e6

La extracción de clorofila *a* se realiza por el método reportado de Keiji Iriyama (Keiji Iriyama Ogura, Atusi Takamiya 1974). La clorina e6 se obtiene de la clorofilina *a*, que a su vez se obtiene de clorofila *a* vía saponificación con KOH en metanol de clorofila *a*. Posteriormente, la clorofilina *a* se hidroliza con HCl (Figura 1).

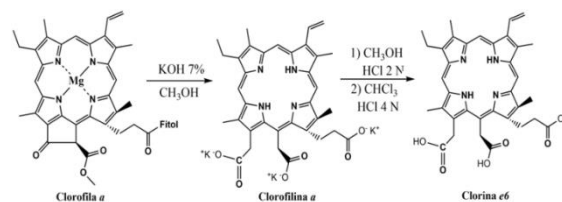


Figura 1. Esquema de reacción para la obtención de Ce6

Caracterización espectroscópica

La caracterización de la clorofila y sus derivados se llevó a cabo por espectroscopía UV-Vis en un espectrofotómetro Cary Varian modelo 500E. Las mediciones de espectroscopía de fluorescencia en un espectrófluorómetro Edinburgh Instruments FLS920 equipado con baño para el control de temperatura. En ambos casos se utilizó una celda de cuarzo de recorrido óptico de 1 cm. Los análisis de espectroscopía infrarroja se llevaron a cabo en un espectrofotómetro IR Perkin Elmer con transformada de Fourier FTIR. La clorofila *a* también se caracterizó por RMN utilizando un equipo Bruker AMX (Avance III) de 500 MHz utilizado CCl_3-d_1 como disolvente y TMS (tetrametilsilano) como referencia interna (resultados no mostrados).

Estudios de interacción por espectroscopia UV-Vis y de fluorescencia

El análisis de la interacción BSA-Ce6 por espectroscopia UV- vis y fluorescencia, se llevó a cabo titulando una solución 3.2×10^{-6} M de BSA y soluciones 4.4×10^{-6} M a 6.7×10^{-5} M de Ce6. Los estudios de fluorescencia se realizaron por duplicado a tres temperaturas (25, 35 y 41 °C). El seguimiento de la interacción se realizó con luz de excitación de 295 nm y en el intervalo de 300–550 nm.

Para el análisis de los datos de fluorescencia se empleó el modelo de Stern-Volmer (Joseph R. 2006):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[L] : K_{SV} = K_q\tau_0$$

Donde F_0 y F son la emisión de fluorescencia de BSA libre y en presencia de ligando (Ce6) en cada punto de la titulación, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer y $[L]$ es la concentración de la Ce6 libre.

Acoplamiento molecular: rígido y flexible

Para entender las posibles interacciones intermoleculares en los sistemas BSA-macrosciclos tetrapirrólicos, se realizaron estudios *in silico* del acoplamiento molecular o docking rígido usando el software *Autodock Vina* (Oleg T. y Arthur J. 2010) y partiendo de la estructura cristalográfica de la BSA ID 3VO3.pdb, obtenida del Protein Data Bank (se eliminaron todas las moléculas de agua y ligandos cocristalizados y se agregaron átomos de hidrógeno polares seguido del cálculo de las cargas de Gasteiger según fuera necesario,) con el software *Autodock tools*. La estructura tridimensional optimizada de clorina e6, se obtuvo con el programa *Gaussian 9.0* (Frisch et al. 2016) usando funcionales de la densidad a nivel 6-31G(d) con funcionales híbridos B3LYP

Para analizar toda la superficie de BSA se generó una caja 3D de $84 \times 76 \times 81$ Å en las direcciones x, y y z con espaciado cuadrícula de 1 Å. El sitio de unión III de la BSA se monitoreo utilizando una caja de $35 \times 23 \times 30$ Å, centrado en las coordenadas 37,9, 36,4 y 42,5 y con cuadrícula de espaciado de 0.4 Å. Todas las rotaciones de enlace de los macrosciclos se consideraron libres.

Para cada sistema propuesto, se realizaron cincuenta análisis de acoplamiento rígido con una población de 100 poses cada una. Se eligió la pose de menor afinidad arrojada por el programa *Autodock Vina*. El acoplamiento molecular flexible se realizó considerando el sitio de unión más afín encontrado por los estudios de acoplamiento molecular rígido. Dicha zona correspondió al sitio III de BSA. Para la realización de estos estudios se consideró la pose de menor afinidad para cada sistema y

además se consideraron una serie de residuos de BSA con los que cada especie interactuara a una distancia máxima de 5 Å, a excepción de *Trp 134*.

Resultados y discusión

Caracterización espectroscopica de Ce6

La *Ce6* se prepara por medio de la hidrólisis ácida de clorofilina *a*. Este derivado posee tres grupos carboxílicos en la periferia del macrocíclico. Aunque la *Ce6* es poco soluble en agua en comparación a la clorofilina *a*, esta es muy soluble en alcoholes y por tanto en disoluciones acuosas. La gran importancia de este derivado radica en la presencia estructural de 3 grupos carboxílicos libres que, además de mejorar la solubilidad, puede propiciar interacciones tipo Vander Waals (dipolo-dipolo, ion-dipolo), además de las de tipo puentes de hidrógeno que son de gran interés en estudios de interacción proteína-ligando.

El espectro UV-Vis (Figura 2a) de *Ce6* en etanol es muy similar al de la clorofilina *a*. La banda de Soret se desplaza ligeramente a los 402 nm y la banda Q_1 presenta un desplazamiento hipsocrómico hacia los 664 nm y su espectro de absorción en solución amortiguadora de etanol-fosfatos 20:80 V/V pH 7.0 se observa inalterado, lo cual nos indica que no ocurre el fenómeno de agregación en dicho medio de disolución.

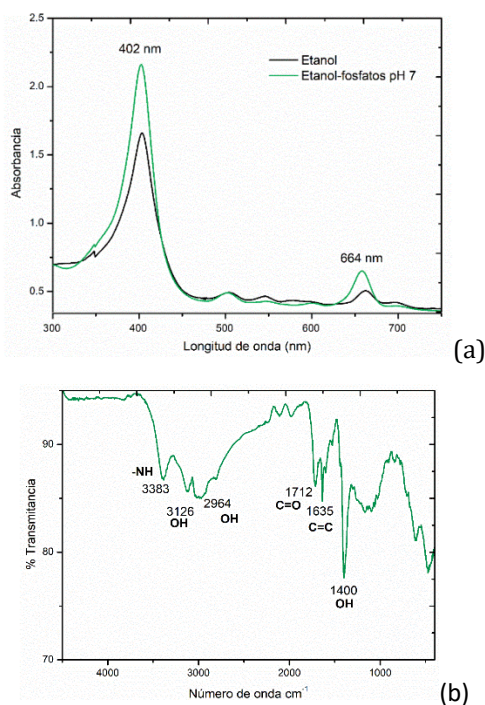


Figura 2. a) Espectro UV-Vis de *Ce6-a* en solución etanol-fosfatos 20:80 V/V. b) espectro ir de *Ce6*.

La identificación de los grupos ácido carboxílicos libres en el espectro IR de clorina e6 (Figura 2b), son importantes para diferenciarlos de los grupos carboxilatos de la clorofilina a. En este caso las vibraciones de estiramiento de aminas secundarias N-H se observan a los 3384 cm⁻¹, los puentes de hidrógeno O-H intermoleculares característicos de ácidos carboxílicos se observan a los 3126 cm⁻¹, mientras la banda amplia a los 2964 cm⁻¹ y la banda a los 1400 cm⁻¹ se atribuyen vibraciones de estiramiento y flexión de enlaces O-H, respectivamente. La banda a 1712 cm⁻¹ es referente a vibraciones de estiramiento de carbonilos de tipo ácidos carboxílicos, y la banda a 1635 cm⁻¹ se asocia a vibraciones de enlaces conjugados de alquenos C=C.

Análisis del sistema BSA-Ce6 por espectroscopia UV-Vis y fluorescencia

Los estudios espectrofotométricos mostraron una tendencia generalizada en el aumento de la absorción a 280 nm (Figura 3a), indicando un posible cambio en el microambiente de los residuos aromáticos de BSA (que son los responsables de la absorción característica de proteínas en el UV-Vis) o la exposición a ambientes más polares de los residuos aromáticos provocado por el acercamiento de Ce6.

Se asume, en primera instancia que podría haber un acercamiento con el residuo de *Trp 134*. Otro aspecto interesante es el aumento y desplazamiento concomitante de la absorción de 422 a 418 nm, es decir, se observó un desplazamiento hipsócronico con el aumento de la concentración de Ce6. Este fenómeno posiblemente se deba a la concentración de Ce6 libre, es decir, la población de moléculas de Ce6 que no interactúan con BSA; tanto la absorción de la banda de Soret se observa en los últimos puntos de la titulación a 416 nm, como se puede ver en el espectro UV-Vis de la especie libre (Figura 3a)

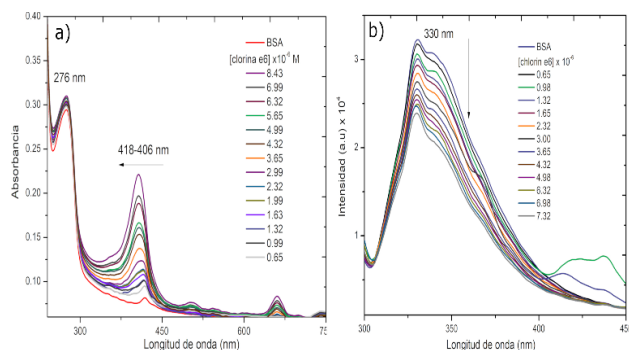


Figura 3. a) Espectro UV-Vis de la titulación y b) Espectro de la titulación espectrofluorotométrica de BSA-Ce6 en solución amortiguadora de etanol-fosfatos 20:80 V/V 50 mM pH 7.0

La técnica de apagamiento de fluorescencia, se utilizó para investigar el posible mecanismo de unión de Ce6 a BSA vía la determinación de la constante de unión a diferentes temperaturas y de los correspondientes parámetros termodinámicos de unión: ΔH_u , ΔS_u , ΔG_u . Mediante los estudios de fluorescencia del sistema BSA-Ce6 se observó un decremento progresivo de la emisión de la BSA a los 330 nm al aumentar la concentración de Ce6 (Figura 3b). Además, en ningún punto de la titulación se observó un desplazamiento del máximo de emisión de BSA, lo cual sugiere que no se presenta cambio en la estructura tridimensional de BSA durante el proceso de interacción.

El apagamiento de fluorescencia también demostró la posibilidad de que la interacción se lleve a cabo en la cercanía de alguno de los dos residuos de *Trp* presentes en la BSA (Figura 4).

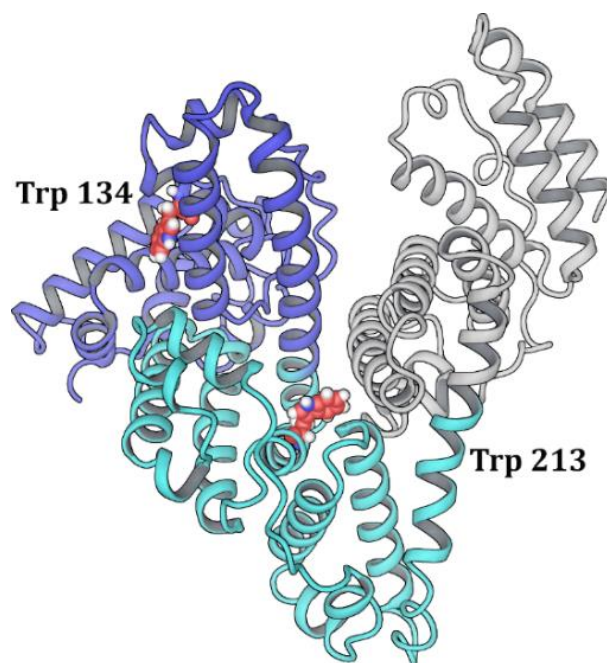


Figura 4. Estructura de BSA y la localización de los dos residuos de *Trp*.

El apagamiento de fluorescencia es un decremento en el rendimiento cuántico (intensidad de fluorescencia) del fluoróforo (BSA) que puede ser inducido por una variedad de interacciones moleculares con el desactivante (Ce6). Para distinguir si el fenómeno de apagamiento en el sistema BSA-Ce6 es dinámico (choques intermoleculares entre la proteína y el desactivante) o estático (formación de un complejo), se realizaron los experimentos de titulación fluorométrica a las temperaturas de: 25, 31 y 42 °C (Figura 5).

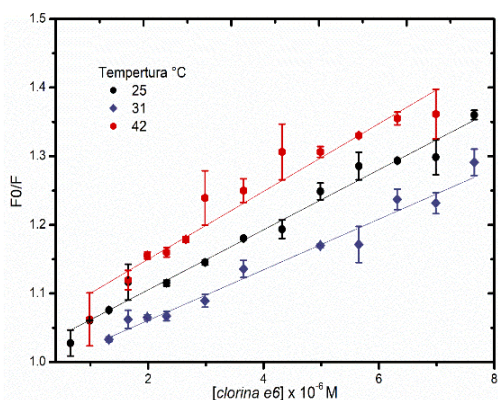


Figura 5. Gráfico de Stern-Volmer de las titulaciones BSA-clorina a pH 7.0. Se observa la linealidad del modelo en el intervalo de concentraciones mostrado

El valor numérico de la constante de Stern-Volmer (tabla 1) en estudios de interacciones proteína-ligando, indica la efectividad del apagamiento de un ligando en un receptor específico. Además, el análisis a diferentes temperaturas nos provee información confiable del mecanismo de apagamiento en el sistema de estudio (estático o dinámico). En el presente caso, al ajustar los datos de las titulaciones a las diferentes temperaturas se observó la linealidad del gráfico de Stern-Volmer en todo el intervalo de concentraciones. De esta manera se establece que solo se presenta un solo tipo de apagamiento (Figura 5). El apagamiento de fluorescencia de BSA disminuye conforme aumenta la temperatura, por lo que las constantes de Stern-Volmer también decrecen con el mismo patrón de respuesta e indicando un apagamiento estático, atribuible a la formación de un complejo BSA-Ce6 fluorescente (tabla 1).

Tabla 1. Valores de K_{SV} del sistema BSA-Ce6 a pH 7.0.

Sistema	T °C	$K_{SV} \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	R^2
BSA- Ce6	25	4.38 ± 0.18	0.9893
	31	3.71 ± 0.21	0.9895
	42	3.21 ± 0.40	0.9818

Determinación de la contante y estequiometria de la unión del sistema BSA-Ce6.

En el caso de interacciones de apagamiento estático y asumiendo que todos los sitios de unión son iguales e independientes en BSA, los datos de intensidad de fluorescencia pueden ser usados para obtener el número de sitios y la constante de unión utilizando la siguiente ecuación.

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_u + n \log [L]$$

Para ello se graficó el logaritmo de $(F_0 - F)/F$ en función del logaritmo de la concentración de Ce6 (Figura 6).

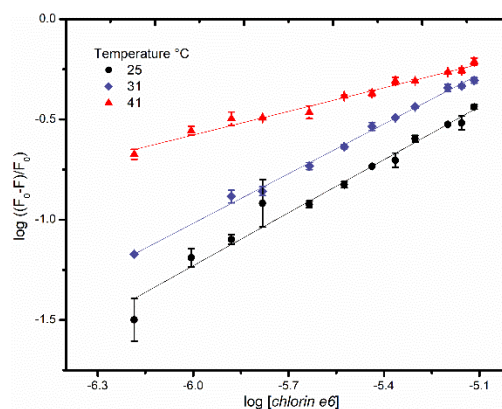


Figura 6. Gráfico de $\log (F_0 - F)/F$ en función del logaritmo $[Ce6]$ para la determinación de la estequiometria y la constante de unión del sistema BSA- Ce6 a de pH 7.0. Las líneas rectas fueron ajustadas por mínimos cuadrados.

Los valores obtenidos de n y K_u a partir de la pendiente y la ordenada al origen de la ecuación, se muestran en la tabla 2. En base a estos datos se establece que la estequiometria de unión entre BSA- Ce6 es 1:1. Así mismo, el número de sitios de unión fluctuó ligeramente por encima de 1 a las temperaturas de 25 y 31 °C. En el caso de la titulación a 42 °C se observó que el número de sitios de unión y la constante se redujeron considerablemente, sugiriendo una ligera pérdida de la estructura terciaria o probable desplegamiento de BSA que imposibilite la unión con Ce6.

Tabla 2. Parámetros de unión para el sistema BSA- Ce6 a diferentes a pH 7.0.

pH	T °C	n	$K_u \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$	R^2
7.0	25	0.94 ± 0.01	2.89 ± 0.02	0.9917
	31	0.81 ± 0.01	2.81 ± 0.02	0.9803
	41	0.77 ± 0.09	0.42 ± 0.03	0.9831

Shampa y Srivastava (Shampa C. y Srivastava T. 2000) demostraron que por medio de la desnaturalización de BSA por la adición de hidrocloreuro de guanidina y titulación con tetrafenilporfirinas (estructuras estructuralmente relacionadas a Ce6), a pH altamente básicos, no se establece la unión, lo que indica la importancia de la conservación de la estructura terciaria de BSA para que ocurra la unión. Los valores de K_u (tabla 2) principalmente a 25 °C indican que el complejo formado es termodinámicamente estable, y su orden de magnitud, especialmente a pH 7.0, está en el intervalo de interacciones moderadas (Igor S. et al 2020). El valor de K_u a estas condiciones de temperatura y pH, se considera en un intervalo apropiado para que, aun ocurriendo la

disociación del complejo durante el transporte en el torrente sanguíneo, se mantenga una concentración de ligando libre que pueda llegar al sitio diana.

Generalmente las moléculas pequeñas o ligandos se unen a proteínas por medio de cuatro modos de unión: vía puentes de hidrógeno, vía interacciones de van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. El signo y la magnitud de los parámetros termodinámicos ΔH y ΔS en interacciones proteína-ligando determinan la formación y estabilidad del complejo. Ross y Subramanian (Ross P., Subramanian S. 1981) han relacionado el signo y la magnitud de estos parámetros a procesos que involucran asociaciones proteína-ligando, es decir se presentan tres tipos de relaciones termodinámicas: (1) valores positivos de ΔH y ΔS , se consideran frecuentemente como evidencia de interacciones de tipo hidrofóbico, 2) valores negativos de ΔS y de ΔH , son indicativo de una interacción gobernada por interacciones de Van der Waals o puentes de hidrógeno, 3) Valores negativos de ΔH y valores positivos de ΔS se presentan mayormente cuando ocurren interacciones electrostáticas. Los parámetros termodinámicos ΔH y ΔS de unión se obtuvieron a partir de la pendiente y ordenada al origen del gráfico de van't Hoff, respectivamente (Figura 7).

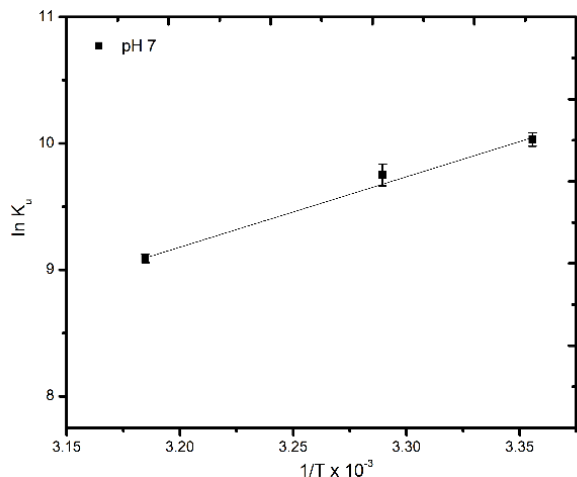


Figura 7. Gráfico de van't Hoff para la interacción BSA-Ce6

De acuerdo a los valores negativos de ΔH_u y ΔS_u (tabla 3), para el sistema BSA-Ce6 y, se puede establecer que la estabilidad se da por una combinación de interacciones de van der Waals y puentes de hidrógeno. Valores negativos de ΔS también sugieren que existe una desolvatación de superficies polares durante el proceso de interacción. Es decir, que la interacción Ce6 se debería establecer sobre regiones polares de BSA.

Sí se asume que la interacción se establece en el sitio III, en donde se encuentran residuos de *Lys* y *Asp*, es muy probable que la contribución del ΔS sea relevante para el proceso de unión.

Sin embargo, en este trabajo el valor de ΔG proviene principalmente de contribuciones entálpicas ΔH , sugiriendo que las principales interacciones establecidas son de tipo puentes de hidrógeno y de van der Waals. Los valores de energía libre de unión ΔG_u demuestran que la interacción puede ocurrir espontáneamente.

Tabla 3. Parámetros termodinámicos de unión del sistema.

Sistema	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol K)	ΔG (kJ/mol)
BSA-Ce6	-98.84	-242.7	-25.45
			-25.89
			-23.51

Estudios de acoplamiento molecular: rígido y flexible del sistema BSA-Ce6

Arpana P. *et al* (Arpana P. *et al* 2020), analizaron la interacción de BSA con Ce6 por simulación de acoplamiento molecular, encontrando que el sitio de unión de la especie Ce6 en BSA se encuentra sobre la superficie de los subdominios IIA y IIIA.

Sin embargo, estos resultados no explican el fenómeno de apagamiento de fluorescencia que se presenta durante la interacción de ambas especies.

Por medio de ensayos de competencia Liqin Z. *et al* (Liqin Z. *et al*. 2017) demostraron que los sitios de unión primarios de moléculas análogas a las porfirinas, como las ftalocianinas, se encuentran en el dominio I (dominio donde se encuentra el sitio III de unión en BSA) y III.

Por ello, aunado al apagamiento de fluorescencia y los datos experimentales reportados en la literatura se decidió enfocar el análisis de acoplamiento molecular sobre el sitio III de BSA.

Esto, debido también a que es el sitio de unión a ligandos endógenos estructuralmente relacionados a núcleos porfirínicos como hemina o bilirrubina.

Sin embargo, los estudios también se realizaron considerando toda la superficie de la proteína. En este caso en particular, se eligieron las dos poses de menor energía arrojadas por el programa *Autodock Vina*, las cuales se localizaron en la zona cercana al *triptófano 134* (Figura 8a).

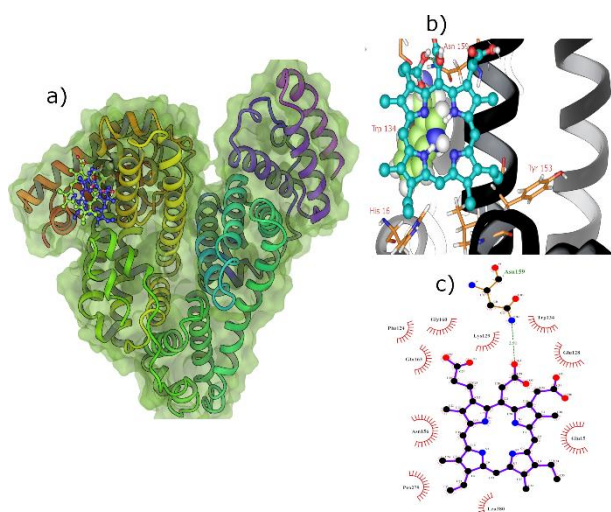


Figura 8. a) Poses de menor energía en las cercanías del residuo *Trp-134*, obtenido con el programa *Autodock Vina*, b) mapa de interacción entre BSA y Ce6, el enlace de hidrógeno fue agregado con el programa *Maestro*, (Schrödinger 2020-2), c) determinación de distancias y tipos de interacción en el sistema BSA-Ce6, utilizando el programa *Ligplot* (Amber and David 2014).

Las interacciones intermoleculares en BSA se favorecen principalmente en un ambiente hidrofóbico, seguido por puentes de hidrógeno y en menor medida por interacciones electrostáticas. Ahora bien, el núcleo porfirínico de Ce6 es predominantemente hidrofóbico, por lo que puede establecer interacciones no polares que posiblemente sean las de mayor importancia para estabilizar el complejo formado. Además, los 3 grupos carboxilo (-COOH) en la Ce6 son capaces de establecer puentes de hidrógeno e interacciones: dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, es decir, que el acoplamiento puede ser resultado de todas estas interacciones, pero sobre todo aquellas de tipo hidrofóbico y puentes de hidrógeno. La zona circunvecina al residuo de *Trp 134* es de carácter apolar, sin embargo, hay aminoácidos polares como la *lisina*, *glutamina* y *glicina* que pueden incrementar la energía de interacción, generando un ambiente polar que puede estabilizar el complejo formado.

La longitud de la cadena de los grupos carboxilo de la especie Ce6 parece tener acceso a la cavidad donde se encuentra el *Trp 134* (Figura 8a). El acercamiento a este residuo (Figura 8b), cuyo nitrógeno (en realidad el grupo N-H) del *indol* puede interactuar vía puentes de hidrógeno con los protones de los grupos pirrol del macrociclo de Ce6. Así mismo, es visible una menor interacción de los residuos polares en la interacción con BSA (Figura 8c). Aunado a esto se observan tres residuos hidrofóbicos, además de *Trp 134*, que forman parte del conjunto interactuante en el sistema BSA-Ce6, formado

por *Phe 124*, *Pro 279* y *Leu 280*, además de formar un puente de hidrógeno con el residuo *Asn 159*.

Los análisis *in silico* del acoplamiento molecular rígido sugieren la conformación adoptada de Ce6 en la zona cercana al residuo *Trp 134*, así como los diferentes residuos cercanos con los que se pueden establecer interacciones estables o en su caso desfavorables. Es factible que el residuo de *Trp 134* pueda tener rotaciones que le permitan adoptar una conformación aún más favorable para la interacción con esta especie. En ese sentido, se decidió realizar estudios *in silico* del acoplamiento molecular flexible (basado en que, durante el proceso de muestreo o acoplamiento, tanto el ligando, así como los residuos de interés de la proteína son flexibles). Para tal efecto se consideraron flexibles los siguientes ocho aminoácidos del sitio III de BSA: *Glu 15*, *His 116*, *Phe 124*, *Glu 128*, *Trp 134*, *Tyr 153* y *Lys 157*.

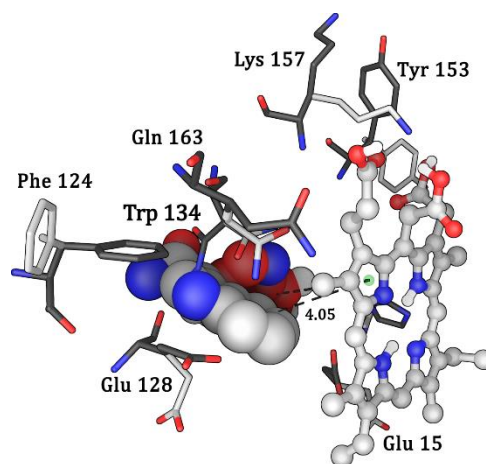


Figura 9. Diagrama de interacción de la simulación de acoplamiento molecular flexible para el sistema BSA-Ce6. Los residuos en color negro corresponden a residuos rígidos, mientras los residuos de color gris corresponden a aminoácidos considerados como flexibles durante los análisis *in silico*. Las líneas punteadas representan la distancia en Å.

Mediante los estudios de docking flexible se observó una libre rotación del residuo de *Trp 134*, el cual adoptó una conformación más próxima a Ce6 (Figura 9), lo cual favorece claramente la interacción π - π entre los anillos aromáticos del indol del *Trp 134* y un anillo de pirrol del núcleo porfirínico de la Ce6 a una distancia de 4.05 Å. Además, esta simulación revela que la aproximación de los grupos N-H en ambas especies es posible, lo cual podría ser crucial para estabilizar el complejo formado. Así mismo, se observa un mayor acercamiento del residuo de *Lys 157* a uno de los grupos carboxilo periféricos de la Ce6, lo que podría incrementar la energía de asociación no covalente por medio de interacciones de tipo polar.

Conclusiones

La interacción de BSA-Ce6 es termodinámicamente estable y se establece vía un modelo de sitios de unión independiente 1:1. Con base a los parámetros termodinámicos calculados, ΔG , ΔH y ΔS , inherentes al proceso de unión, se estableció que los principales tipos de interacción en el sistema de estudio son resultado de interacciones de van der Waals del tipo dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, así como de las de tipo no polar.

Los estudios *in silico*, proporcionaron información importante sobre el posible sitio de fijación y la geometría aproximada del acoplamiento, localiza en las proximidades del sitio III de BSA. La formación del complejo BSA-Ce6, puede consolidarse principalmente a través de interacciones de tipo puente de hidrógeno periféricas e hidrofóbicas al centro del macrociclo.

Al considerar como flexibles algunos residuos del sitio III de BSA (mediante la simulación de acoplamiento molecular flexible), se estableció una interacción directa con el residuo de *Trp 134*, lo cual concuerda satisfactoriamente con el apagamiento de BSA observado vía los análisis por espectroscopía de fluorescencia.

Todas las evidencias presentadas muestran que el tamaño y la estructura del macrociclo estudiado tiene un efecto importante en la formación y estabilidad del complejo. Los resultados obtenidos sugieren la importancia de la elección del macrociclo tetrapirrólico u otras especies activas, para la formulación de este tipo de sistemas para posibles aplicaciones médicas.

Agradecimientos

Jonathan Osiris Vicente Escobar agradece la beca de doctorado N. 439684 otorgada por el CONACyT en el periodo 2016-2020.

Referencias

Ali J., Patricia A., Chun-Wa Chung, Stephen C. (2011). Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids. *Journal of structural biology*, 174, 84-91.

Amber M. y David L. (2014). Distance mapping in proteins using fluorescence spectroscopy: tyrosine, like tryptophan, quenches bimane fluorescence in a distance-dependent manner. *Biochemistry*, 53, 6290-6301.

Arpana P., Rashmi S. and Alok D. (2020). Interaction of Cp6-his and Cp6 with bovine serum albumin and liver microsomes Spectroscopic and molecular docking studies. *J. of Photochemistry and Photobiology*, 5, 1-12.

Bamidele M, Sandile P y Oluwatobi S. (2019). Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Molecules*, 24(13), 2456-2484.

Douglas B., Hélène D., John R. y Jürgen B. (2004). Applications, docking and scoring in virtual screening for drug discovery. *Methods and nature reviews*, 3, 935-949.

Fabiano S. et al. (2020). Photophysical, photodynamical, redox properties and BSA-interactions of novel isomeric tetra-cationic peripheral palladium(II)-bipyridyl porphyrins. *Dalton Transactions*, 1-47.

Fayezeh S., Bahram H., Mojtaba S., Mehdi R. and Hamidreza S. (2012). Affinity of two novel five-coordinated anticancer pt(ii) complexes to human and bovine serum albumins: a spectroscopic approach. *Inorganic chemistry*, 51, 3454-3464.

Fengshou W., Mengqian Y., Juan Z., Sizhe Z., Mengge S., Kai W. (2019). Metalloporphyrin-indomethacin conjugates as new photosensitizers for photodynamic therapy. *JBIC*, 24, 53-60

Gabor M. y Justin A. (2013). Fluorescence techniques in analysis of protein-ligand interactions protein-ligand interactions. *Springer protocols*, 455-461.

Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch et al. 2016

Igor S., Alena N., Diliara K. (2020). Evaluation of the binding properties of drugs to albumin from dsc thermograms. *International journal of pharmaceutics*, 583, 1-9.

Joseph R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. Tercera edición, *springer science*.

Karolina A. et al. (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum. *Molecular immunology*, 52, 174-182.

Keiji I., Atusi T. (1974). A simple method for extraction and partial purification of chlorophyll from plant material, using dioxane. *The journal of biochemistry*, 76, 901-904.

Klebe G. (2015). Thermodynamics of protein-ligand interactions as a reference for computational analysis: how to assess accuracy, reliability and relevance of experimental data. *Journal of computer-aided molecular design*, 29, 867-883.

Liqin Z. et al. (2017). Spectroscopic analysis of the interaction between tetra-(psulfoazophenyl)-4-aminosulfonyl-substituted aluminum (III) phthalocyanines and serum albumin. *Journal of innovative optical health sciences*, 10, 1-8.

Murphy P. (1999). Predicting binding energetics from structure: looking beyond dg8. *John wiley & sons, inc*, 333-339.

Oleg T. and Arthur J. (2010). *Autodock Vina*: improving the speed and accuracy of docking with a new simulaci3n function, efficient optimization, and multithreading. *Comput chem.* 3, 455-461.

Quiocho A. E. , Hodel F. A. (2012). Protein-ligand interactions. *International tables for crystallography*, f, 755-765.

Ross, P. y Subramanian S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20, 3096-3102.

Shampa C. y Srivastava T. S. (2000). Spectral investigations of the interaction of some porphyrins with bovine serum albumin. *J. Porphyrins phthalocyanines*, 4, 147-157.

Schr3dinger Release 2020-2: Maestro, Schr3dinger, LLC, New York, NY.