

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA

KARLLY THAYANNY DE OLIVEIRA PEREIRA

**ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS: INTERAÇÃO COM DNA (*Calf thymus*),
PROTEÍNA DE SORO BOVINO (BSA), CORRELAÇÃO COM ATIVIDADE
BIOLÓGICA E *DOCKING* MOLECULAR**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

*Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970 - Maceió - AL*

KARLLY THAYANNY DE OLIVEIRA PEREIRA

**ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS: INTERAÇÃO COM DNA (*Calf thymus*),
PROTEÍNA DE SORO BOVINO (BSA), CORRELAÇÃO COM ATIVIDADE
BIOLÓGICA E *DOCKING* MOLECULAR**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a Dr^a Isis Martins Figueiredo

Coorientador: Prof. Dr. Josué C. Caldas Santos

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

P436a Pereira, Karly Thayanny de Oliveira.

Alcaloides β - carbolínicos : interação com DNA (*calf thymus*), proteína de soro bovino (BSA), correlação com atividade biológica e Docking molecular / Karly Thayanny de Oliveira Pereira. – 2018.

88 f. : il. color.

Orientadora: Isis Martins Figueiredo.

Co-orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.

Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 76-88.

1. Interação de moléculas. 2. Alcaloides β -carbolinas. 3. Espectroscopia. 4. Correlação bioanalítica. 5. *Docking* molecular. I. Título.

CDU: 547.947:543.423.3



PPGQB

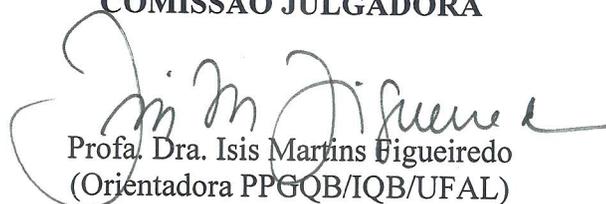
Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



FOLHA DE APROVAÇÃO

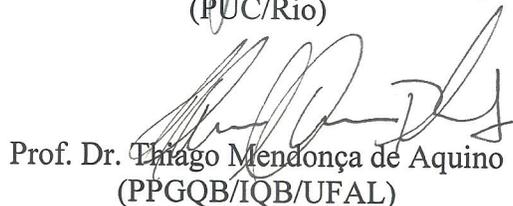
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **KARLLY THAYANNY DE OLIVEIRA PEREIRA**, intitulada: “**ALCALÓIDES β -CARBOLÍNICOS: INTERAÇÃO COM DNA (*Calf thymus*), PROTEÍNA DE SORO BOVINO (BSA), CORRELAÇÃO COM ATIVIDADE BIOLÓGICA E DOCKING MOLECULAR**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 5 de setembro de 2018, às 14h30, na sala de reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.ª. Dra. Isis Martins Figueiredo
(Orientadora PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos
(Coorientador PPGQB/IQB/UFAL)


Prof.ª. Dra. Camilla Djenne Buarque Müller
(PUC/Rio)


Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino
(PPGQB/IQB/UFAL)

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio Bastos e Maria José, pela total dedicação, amor e apoio durante toda a minha vida acadêmica, como também ao meu esposo, Bruno Pimentel, pela compreensão, apoio e força nessa caminhada. A eles, toda a minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS Pai, o Todo Poderoso, e a JESUS CRISTO, seu Filho Amado e meu Salvador! O meu muito obrigada por me guiar e mostrar que sou capaz quando eu mesma duvidava; por jamais me deixar desistir, por fortalecer-me, ajudar a superar todos os obstáculos e conceder mais uma vitória.

Aos meus pais Maria José e Antônio Bastos por jamais medir em esforços para me educar e me dar as condições necessárias para meus estudos, mesmo em meio às dificuldades. Muito obrigada pelas madrugadas que acordaram para me ajudar a pegar o ônibus escolar, pelo amor incondicional, apoio, carinho. A eles minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos Waldecy Kelly e Antônio Henrique, e ao meu cunhado Davi Soares pelo apoio e torcida.

Ao meu esposo Bruno Pimentel, por todo amor, apoio, força, compreensão, incentivo e torcida para que tudo desse certo. Obrigada por me motivar quando desanimei e, se alegrar com cada conquista nessa caminhada.

Aos meus amigos Luana e Rossiel pelas orações, apoio e torcida.

Aos meus orientadores Prof^a Dr^a Isis Martins Figueiredo e ao prof. Dr. Josué Carinhonha Caldas Santos pela oportunidade que me foi dada, pelos ensinamentos, compreensão e paciência.

A Prof^a Maria Helena Sarragiotto por ter cedido os compostos avaliados no presente trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de instrumentação e desenvolvimento em química analítica (LINQA), pela amizade, boa convivência, auxílio e apoio. Em especial a Marina, pela ajuda no meu trabalho inicial e colaboração quando necessário. Obrigada a Aryana e Janaína pela amizade, ajuda, apoio e torcida, como também ao Wood por me ajudar sempre que solicitei. A todos, meu muito obrigada e contem sempre comigo!

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – FAPEAL pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos os meus familiares, professores e todos aqueles que de alguma forma contribuíram e torceram para essa conquista.

“Lembre da minha ordem: Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque eu, o Senhor, seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde andares”.

Josué 1:9

RESUMO

Os alcaloides derivados das β -carbolinas possuem diversas atividades biológicas, sendo seu maior destaque atribuído às atividades anticâncers. Esta propriedade, portanto, tem despertado o interesse dos químicos sintéticos na busca de novos protótipos a fármacos anticancerígenos. Porém, o *design* de medicamentos mais promissores necessita de informações que podem ser obtidas a partir do estudo da interação destas pequenas moléculas com o DNA e a proteína BSA. Isso porque o DNA é o principal alvo de diversos fármacos, incluindo os anticancerígenos, enquanto que a BSA é a proteína carreadora de vários medicamentos o que influencia na eficácia dos mesmos. Por esse motivo, o estudo da interação de pequenas moléculas com estas macromoléculas vem avançando nas últimas décadas. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a interação de alcaloides β -carbolínicos com o ctDNA (*Calf thymus*) e, também, com a proteína albumina de soro bovino (BSA), por meio das técnicas de espectroscopia de absorção no UV-Visível e de fluorescência molecular. Os resultados mostraram que houve interação dos compostos derivados de alcaloides β -carbolínicos com as duas macromoléculas avaliadas, ctDNA e BSA, resultando em formação de complexos supramoleculares não fluorescentes através do mecanismo de *quenching* estático. No estudo com o ctDNA, pode-se observar que a interação dos compostos com a macromolécula foi significativa, com valores das constantes de ligação, K_b , variando na faixa de $2,45 \times 10^4$ a $1,18 \times 10^6$ L mol⁻¹, sendo a reação efetuada na proporção de 1:1 (composto:ctDNA). O maior valor de K_b foi exibido pelo composto **9c**, o qual possui um grupo *N,N*-dimetilnilina na posição C1 no anel β -carbolina, enquanto que para o composto **9e**, possuindo o substituinte em C1 *o*-cloro fenil, apresentou o menor valor de K_b . O principal modo da interação ocorre preferencialmente via intercalação, o qual foi estabelecido por meio dos ensaios com o iodeto de potássio (KI) e brometo de etídio (BE). A partir do estudo da correlação analítica entre os valores de K_b vs IG₅₀, foi possível observar que o modo intercalativo, para alguns compostos, é o principal mecanismo de ação anticâncer do mesmo. A correlação foi, portanto, encontrada para linhagens de cólon (HT-29), para os compostos **9e**, **10b**, **9c**; e de rim (786-0) para os compostos **9e**, **17** e **9c**. Para o estudo com a proteína BSA, os valores de K_b variaram de $3,2 \times 10^4$ a $4,1 \times 10^6$ L mol⁻¹, sendo o maior valor correspondente ao composto **9e**, demonstrando uma boa afinidade com a proteína e, apresentando relação estequiométrica de 1:1. Por fim, foi visualizado por meio do *docking* molecular que os compostos estudados possuem boa afinidade com a cavidade hidrofóbica contida no sítio I da proteína, localizado no subdomínio IIA onde é encontrado o resíduo de triptofano (Trp213). Dessa forma, é possível afirmar que os compostos bioativos avaliados, derivados das β -carbolinas, possuem afinidade tanto com o DNA, quanto com a proteína BSA.

Palavras-chave: interação, β -carbolínicos; ctDNA; BSA; técnicas espectroscópicas, correlação bioanalítica, *docking* molecular.

ABSTRACT

The alkaloids derived from the β -carbolines have several biological activity, being their greater prominence attributed the anticancer activities. This property, therefore, has aroused the interest of the synthetic chemists in the search of new prototypes to the anticancer drugs. However, the design of more promising drugs requires information that can be obtained from the study of the interaction of these small molecules with DNA and BSA protein. This is because DNA is the main target of several drugs, including anticancer drugs, while BSA is the multi-drug carrier protein, which influences their effectiveness. For this reason, the study of the interaction of small molecules with these macromolecules has been advancing in recent decades. In this context, the objective of the present study was to evaluate the interaction of β -carbolinic alkaloids with ctDNA (Calf thymus) and also with the bovine serum albumin (BSA) protein, by means of absorption spectroscopy techniques in UV-visible and molecular fluorescence. The results showed that there was interaction of the compounds derived from β -carbolinic alkaloids with the two macromolecules evaluated, ctDNA and BSA, resulting in the formation of non-fluorescent supramolecular complexes through the static quenching mechanism. In the study with ctDNA, it was observed that the interaction of the compounds with the macromolecule was significant, with values of the binding constants, K_b , ranging from 2.45×10^4 to 1.18×10^6 L mol⁻¹, reaction performed in the ratio of 1:1 (compound: ctDNA). The highest K_b value was exhibited by compound **9c**, which has an *N,N*-dimethylaniline group at the C1 position in the β -carboline ring, whereas for compound **9e**, having the substituent at C1 *o*-chlorophenyl, showed the lowest value of K_b . The main mode of interaction occurs preferentially via intercalation, which was established by potassium iodide (KI) and ethidium bromide (EB) assays. From the study of the analytical correlation between the values of K_b vs IG_{50} , it was possible to observe that the intercalation mode, for some compounds, is the main mechanism of anticancer action of the same. Correlation was therefore found for colon (HT-29) strains, for compounds **9e**, **10b**, **9c**; and kidney (786-0) for compounds **9e**, **17** and **9c**. For the study with the BSA protein, the K_b values ranged from 3.2×10^4 to 4.1×10^6 L mol⁻¹, the highest value corresponding to **9e**, shown a good affinity with the protein and, with a stoichiometric ratio of 1:1. Finally, it was observed by molecular docking that the compounds studied have good affinity with a hydrophobic cavity contained in the site I of the protein, located in subdomain IIA where the tryptophan (Trp213) residue is found. Thus, it is possible to state that the bioactive compounds evaluated, derived from β -carbolines, have an affinity with both DNA and BSA protein.

Keywords: interaction, β -carbolines; ctDNA; BSA; spectroscopic techniques; bioanalytical correlation; molecular *Docking*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelos de interação enzima-substratos propostos por (a) Emil Fischer e (b) Koshland	15
Figura 2 – Esquema baseado na teoria da química supramolecular	16
Figura 3 – Fármacos anticancerígenos que interagem com o DNA (modelo: <i>Calif thymus</i>)	18
Figura 4 – a) Etapas do processo de ação de fármacos tendo DNA como alvo biológico até a cura de diversas patologias; b) Mecanismo de resistência do DNA à fármacos em função de processos de mutação	19
Figura 5 – Estrutura dupla fita do DNA	21
Figura 6 – Isoformas do DNA: A-, B- e Z-DNA	21
Figura 7 – Esquema de possíveis modos de interação entre DNA-ligante	22
Figura 8 – Estruturas químicas de núcleos intercalantes ao DNA.....	23
Figura 9 – Estruturas químicas de ligantes que interagem com DNA via <i>groove</i>	25
Figura 10 – Fração atribuível dos principais fatores de risco de câncer	26
Figura 11 – Estimativa do número de casos novos no Brasil, 2018-2019	27
Figura 12 – Constantes de interação entre fármacos antitumorais e a BSA, obtidos por meio da técnica de fluorescência molecular (pH= 7,4)	30
Figura 13 – Estrutura da HSA e BSA, com resíduos de triptofano mostrados em cor verde	31
Figura 14 – Representação estrutural da BSA e seus domínios e subdomínios	32
Figura 15 – Estrutura do núcleo β -carbolina	33
Figura 16 – Exemplos de alcaloides β -carbolínicos naturais	33
Figura 17 – Estruturas dos derivados de β -carbolínicos, sintéticos, e as respectivas atividades antitumorais	34
Figura 18 – Estruturas de β -carbolínicos, sintetizados pelo grupo de pesquisa UEM, e suas respectivas atividades antitumorais	35
Figura 19 – Estruturas de compostos β -carbolínicos e seus respectivos valores de constantes de ligação (K_b) (pH = 7,4)	37
Figura 20 – β -carbolinas que interagem com BSA e/ou HSA.....	38
Figura 21 – Estruturas químicas dos derivados β -carbolínicos avaliados.....	52
Figura 22 – Representação do processo de a) <i>quenching</i> dinâmico e b) <i>quenching</i> estático	54
Figura 23 – Espectros obtidos para avaliação da interação ctDNA-ligante por fluorescência molecular para o composto 9c	55
Figura 24 – Planaridade dos compostos a) 9c ; b) 10b ; c) 17 ; d) 9e . Estruturas químicas com os seguintes grupos projetados para frente: I) núcleo β -carbolina; II) substituinte em C1; III) substituinte em C3.....	58
Figura 25 – Avaliação da interação ctDNA-ligante por absorção no UV-vis: Composto 9c (5 μ M) e ctDNA (10 μ M)	59
Figura 26 – Avaliação do modo de ligação DNA-ligante por meio de ensaios com KI.....	61

Figura 27 –	Espectros do sinal de fluorescência do brometo de etídio livre e na presença do ctDNA	63
Figura 28 –	a) Avaliação da intensidade de fluorescência do sistema BE-ctDNA na presença do composto 9c . b) Decréscimo percentual do sinal de fluorescência do sistema BE-ctDNA na presença dos composto β -carbolínicos	63
Figura 29 –	Correlação entre IG_{50} e K_b das linhagens de células tumorais cólon (HT-29) e rim (786-0), para os compostos β -carbolínicos avaliados	67
Figura 30 –	Espectros obtidos para avaliação da interação BSA-ligante por fluorescência molecular para o composto 9e	69
Figura 31 –	Estrutura tridimensional do complexo 9e-BSA.....	73
Figura 32 –	Docking molecular em diagrama 2D da interação β -carbolinas-BSA: 9c (A); 9e (B); 10b (C); 17 (D).....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Valores de IG ₅₀ (em μM) dos compostos β-carbolínicos avaliados frente a 7 linhagens de células tumorais humanas.....	53
Tabela 2	– Parâmetros de interação dos derivados de β-carbolinas com o ctDNA	56
Tabela 3	– Variação da máxima absorvância entre o complexo DNA-ligante e o somatório das absorvâncias do ligante e DNA livres	60
Tabela 4	– Parâmetros de interação dos derivados de β-carbolinas com o complexo BE-ctDNA, obtidos por estudo de competição	65
Tabela 5	– Parâmetros Termodinâmicos de interação dos derivados de β-carbolinas com o complexo BE-ctDNA, obtidos por estudo de competição	66
Tabela 6	– Parâmetros de interação dos derivados de β-carbolinas com a proteína BSA.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	Brometo de etídio
BSA	Albumina de soro bovino
ctDNA	DNA <i>Calf thymus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
IG ₅₀	Concentração mínima do fármaco capaz de gerar 50% de inibição do crescimento
HSA	Albumina de soro humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K _b	Constante de ligação
KI	Iodeto de potássio
K _{app}	Constante aparente
K _{SV}	Constante de <i>Stern Volmer</i>
K _q	Taxa de extinção biomolecular
mg	Miligramas
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
Trp	Triptofano
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UV	Ultravioleta
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Química supramolecular	15
2.2. Interação macromolécula-ligante	17
2.2.1. Sistema supramolecular: A importância da interação DNA-ligante	17
2.2.1.1. DNA e suas características gerais	20
2.2.1.2. Modos de ligação entre DNA e ligantes	21
2.2.1.3. DNA como alvo biológico: patologias associadas	25
2.2.2. Sistema supramolecular: A importância da interação proteína-ligante	28
2.2.2.1. Albumina de soro bovino (BSA) e suas características gerais	30
2.3. Alcaloides β-carbolínicos	32
2.3.1. Interação de alcaloides β -carbolinas com DNA	35
2.3.2. Interação entre β -carbolinas e BSA	38
2.4. Análise de correlação entre K_b e IG_{50}	39
2.5. Técnicas e métodos utilizados para avaliar as interações DNA/Proteína- Ligante	40
2.5.1. Espectroscopia de absorção no UV-visível	40
2.5.2. Espectroscopia de fluorescência molecular	41
2.5.2.1. Mecanismo de <i>quenching</i>	41
2.5.2.2. Constante de ligação (K_b)	43
2.5.2.3. Determinação do Modo de Ligação DNA-ligante	43
2.5.2.3.1. Ensaio de extinção com iodeto de potássio (KI)	43
2.5.2.3.2. Ensaio de competição com brometo de etídio (BE)	44
2.5.2.4. Parâmetros termodinâmicos	45
3. JUSTIFICATIVA GERAL DO ESTUDO PROPOSTO	46
4. OBJETIVO GERAL DO ESTUDO PROPOSTO	47
4.1. Objetivos Específicos	47
5. EXPERIMENTAL	48
5.1. Reagentes e preparo das soluções	48
5.2. Equipamentos utilizados	49

5.3. Procedimentos	49
5.3.1. Determinação da concentração do ctDNA (<i>Calf thymus</i>) e albumina de soro bovino (BSA)	49
5.3.2. Estudo da interação ctDNA-ligante por fluorescência molecular e UV-vis	49
5.3.3. Estudo da interação proteína-ligante por fluorescência molecular	50
5.3.4. Avaliação do modo de ligação com iodeto de potássio (KI)	50
5.3.5. Estudo de competição com brometo de etídio (BE)	50
5.3.6. Estudo Teórico: <i>Docking</i> molecular	50
5.3.7. Tratamento dos dados	51
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
6.1 Considerações iniciais	52
6.2. Avaliação da interação DNA-ligante	53
6.2.1. Estudos por espectroscopia fluorescência molecular	53
6.2.1.1. Determinação dos parâmetros de ligação com o DNA	54
6.2.2. Estudos por espectroscopia de absorção no UV-vis	59
6.2.3. Avaliação do modo de ligação	61
6.2.3.1. Estudo com iodeto de potássio (KI)	61
6.2.3.2. Estudo de competição com brometo de etídio (BE)	62
6.2.4. Análise de correlação	66
6.3. Avaliação da interação proteína-ligante	68
6.3.1. Estudos por espectroscopia de fluorescência molecular	68
6.3.1.1. Determinação dos parâmetros de ligação com BSA	68
6.4. Estudos de <i>Docking</i> molecular	72
6.4.1. <i>Docking</i> molecular com BSA	72
7. CONCLUSÃO	75
8. REFERÊNCIA	76

1. INTRODUÇÃO

O estudo de interações macromolécula-ligante é baseado na teoria da química supramolecular, sendo esta uma área multidisciplinar que estuda formação de complexos moleculares por meio de ligações fracas, não covalentes, como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, entre outras (VARSHNEY et al., 2012).

Estas interações podem ocorrer entre diversas biomoléculas e pequenas moléculas, incluindo DNA-fármaco e proteína-fármaco. O estudo da formação destes dois complexos tem se expandido nos últimos anos, devido a sua grande importância no desenvolvimento de fármacos, uma vez que o DNA é o principal alvo farmacológico de diversas doenças e, que proteínas carreadoras interferem na eficiência do medicamento. Portanto, compreender como pequenas moléculas interagem com o DNA e proteínas carreadoras, como, por exemplo, as albuminas de soro, ajuda no desenvolvimento de fármacos mais eficazes e menos tóxicos ao organismo (LI et al., 2016b; RAHMAN et al., 2017).

Nesse sentido, diversas classes de compostos químicos têm sido alvo destes estudos por apresentarem diversas atividades biológicas, incluindo atividades anticânceres, como alcaloides derivados de β -carbolinas (SILVA et al., 2016a), piperidinas (DAS et al., 2018), bases de Schiif (SILVA et al., 2016a), dentre outros. As β -carbolinas, por sua vez, vêm ganhando destaque por sua elevada atividade anticâncer, tendo assim estudos relatados por vários grupos de pesquisas (WU et al., 2010; SAVARIZ et al., 2014; SHANKARAIHAH et al., 2015; SHARMA et al 2016; SILVA et al., 2016b).

Dessa forma, a avaliação da interação macromolécula-ligante, pode ser efetuada por meio de diversas técnicas instrumentais, tais como: Espectroscopia de fluorescência molecular e absorção no UV-vis, eletroforese, espectrometria de massa, infravermelho, voltametria cíclica, dentre outras (SIRAJUDDIN, ALI; BADSHAH, 2013), sendo que, as mais utilizadas para este fim, são espectroscopia de fluorescência molecular e absorção no UV-vis (DESPAIGNE et al., 2014).

Portanto, o presente trabalho buscou avaliar, de modo quantitativo, a interação de quatro compostos bioativos da classe de alcaloides β -carbólicos, com DNA (*Calf thymus*, ctDNA) e a proteína albumina de soro bovino (BSA). Estes foram sintetizados pelo grupo de pesquisa da UEM (BARBOSA et al., 2016) e o estudo foi realizado por espectroscopia no UV-visível e fluorescência molecular.

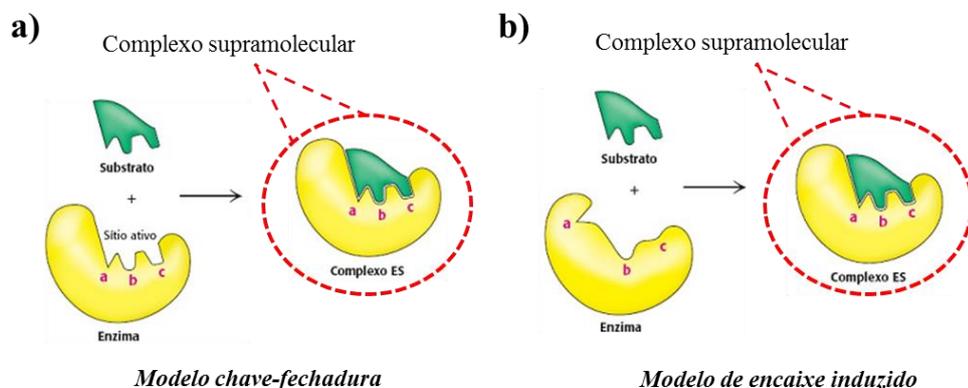
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Química supramolecular

A química supramolecular é uma área multidisciplinar, conhecida como a “química além da molécula”. Ela integra estruturas e funções de compostos pelo reconhecimento molecular, que resultam da associação de duas ou mais espécies químicas que se mantêm unidas através de forças intermoleculares (NAUE, 2006; LEHN, 2002). A sua origem se deu em 1969, quando Jean-Marie Lehn percebeu que alguns fenômenos biológicos importantes não envolviam formação ou quebra de ligações covalentes. Ao contrário, as estruturas biológicas interagem por meio de interações fracas, não covalentes e, assim, de natureza dinâmica por apresentar interações reversíveis (DESIRAJU, 2001; VARSHEY et al., 2012).

Essa nova visão partiu do pressuposto da abordagem feita por Emil Fischer, em 1894, quando ele propôs a analogia da chave e fechadura, a qual constituiu o modelo onde as enzimas seriam estruturalmente complementares a seus substratos. Essa teoria foi suportada por décadas, até que em 1958, Koshland propôs um modelo mais flexível, a *teoria do encaixe induzido*, onde o substrato é capaz de induzir uma mudança na conformação de uma enzima, promovendo o rearranjo dos aminoácidos para formar o sítio ativo complementar ao substrato (Figura 1). Ambos modelos são governados por forças não covalentes (DESIRAJU, 2001; STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2014; BARREIRO; FRAGA, 2015), como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, entre outras (VARSHAY et al., 2012).

Figura 1 - Modelos de interação enzima-substratos propostos por Emil Fischer (a) e Koshland (b).

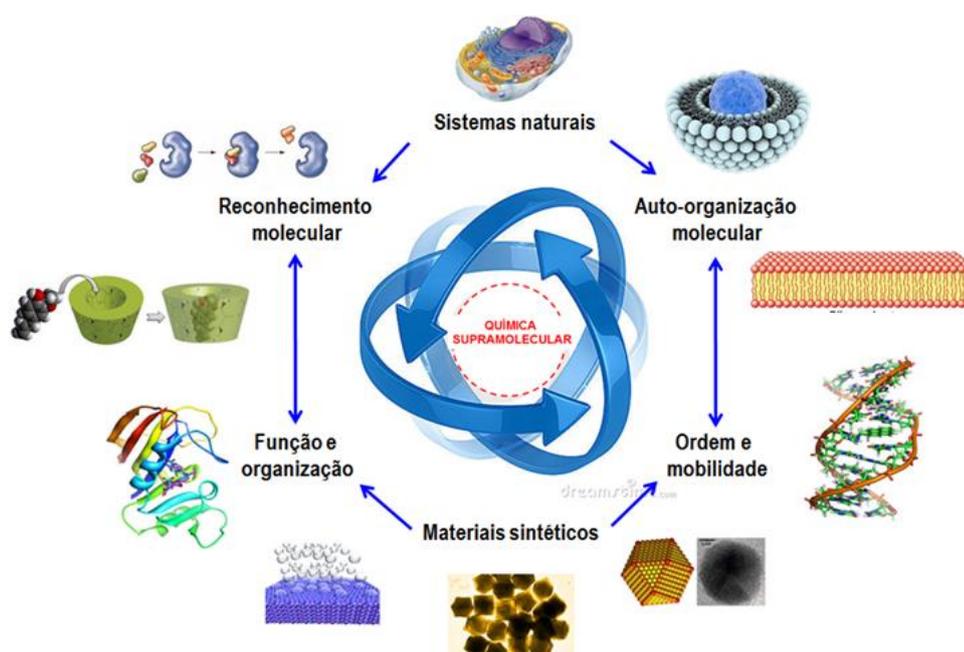


Fonte: adaptado de STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2014.

Em 1987, Charles Pedersen, Donald Cram e Lehn receberam o Prêmio Nobel de Química e, dessa forma, consolidou a “Química Supramolecular” como uma nova área de pesquisa

dentro da química e afins. Lehn ainda a definiu como “a química da ligação intermolecular” e, assim como as moléculas são formadas conectando átomos por meio de ligações covalentes, os compostos supramoleculares são construídos ligando moléculas através de interações intermoleculares dando origem às estruturas automontadas altamente ordenadas (VARSHNEY et al., 2012; HUANG; ANSLYN, 2015). Desde então, esta área vem ganhando espaço tanto na área da Biologia/Medicina (ligação molécula-proteína, molécula-DNA, desenho de drogas, entre outros) como também na Ciência dos Materiais (magnetismo, condutividade, sensores, óptica não-linear, etc. (Figura 2) (DESIRAJU, 2001; LEHN, 2002; YOU, 2015).

Figura 2 – Esquema baseado na teoria da química supramolecular.



Fonte: Adaptado HALL et al., 2004.

Na área de química medicinal, o entendimento das propriedades das supermoléculas é importante para a compreensão dos princípios do reconhecimento molecular, sendo este um procedimento onde uma molécula hospedeira é capaz de formar um complexo com uma molécula hóspede. Qualquer processo de reconhecimento molecular ocorre através de uma série de interações entre as duas moléculas, ou seja, proteína ou DNA (receptor) e ligante (fármaco), e a importância destas interações fracas, não-covalentes, se deve ao fato delas possuírem a característica de serem reversíveis e, assim, os ligantes podem ficar livres para outras interações (ERMONDI; CARON, 2006).

2.2. Interação macromolécula-ligante

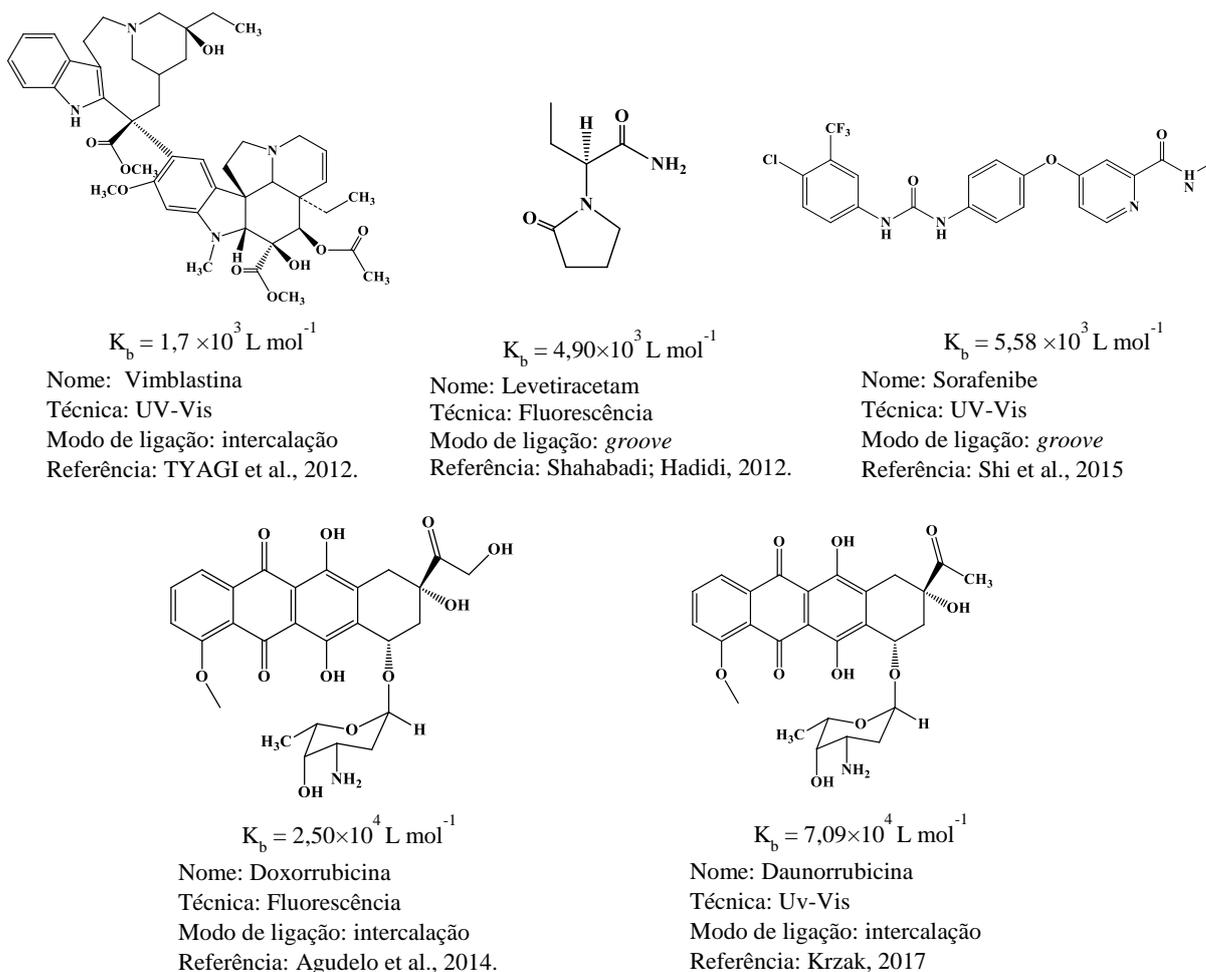
As interações macromolécula-ligante têm se tornado alvo de estudo na área de química, farmácia e medicina, uma vez que estas interações resultam em diversas respostas biológicas. O DNA e as proteínas tem sido os grandes alvos desse tipo de estudo, pois as informações obtidas sobre esta interação são relevantes para o desenvolvimento de fármacos mais promissores. O DNA, por sua vez, é o principal alvo farmacológico para diversas doenças (SIRAJUDDIN, ALI; BADSHAH, 2013; RAHMAN et al., 2017), como, por exemplo, em estudos realizados por SILVA et al., (2016b), confirmaram que os alcaloides β -carbolínicos interagiram com o ctDNA com constantes de interação (K_b) da ordem de 10^4 a 10^6 L mol⁻¹ e o modo de ligação foi via intercalação, além de verificar que o mecanismo de ação destes compostos podem estar relacionados ao DNA, visto que houve uma boa correlação entre os valores de K_b e os valores de IC₅₀ para atividade anticâncer, com r^2 variando de 0.5360 a 0.9600. Já as proteínas também desenvolvem diversas funções biológicas no organismo, sendo que algumas delas são resultados de interações intermoleculares entre proteínas e pequenas moléculas, a exemplificar, as albuminas de soro, a qual é a principal responsável por transportar e distribuir fármacos a seus respectivos alvos. Sendo assim, a interação de medicamentos com as albuminas influencia na atividade farmacológica do mesmo. Há também proteínas causadoras de alergias, portanto, estes tipos de estudos podem ajudar no entendimento do processo alergênico, como por exemplo, a avaliação de alguns fármacos com a proteína ovalbumina, como tetraciclina e sulfonamidas, os quais são usados em tratamento de animais, como galinhas. Estes medicamentos podem gerar resíduos nos alimentos derivados do animal, como os ovos e, dessa forma, resultar em efeitos tóxicos e reações alérgicas na população, uma vez que a ligação destes medicamentos com a proteína pode levar a mudanças conformacionais e, conseqüentemente, funcionais (ZHANG et al., 2009; DANTAS, 2015; DANTAS, 2017, LYRA, 2017). Desta forma, neste trabalho daremos enfoque a interação de compostos biologicamente ativos com DNA e albumina de soro bovino.

2.2.1. Sistema supramolecular: Importância da interação DNA-ligante

Pequenas moléculas que interagem com o DNA têm tido uma elevada importância na medicina, representando uma parcela significativa dos medicamentos contra o câncer (Figura 3) (TSE; BOGER, 2004; WU, 2010). Dessa forma, compreender como estas moléculas interagem com esta macromolécula ganhou a atenção nos últimos anos e se tornou um dos principais temas de pesquisa (RAHMAN et al., 2017), tornando-se bastante relevante na interface entre química, biologia molecular e medicina, uma vez que a interação DNA-ligante

pode modificar processos vitais, como transcrição, sobrevivência e proliferação celular, bem como o bom funcionamento de vários processos dentro do corpo. Dessa forma, a alteração de propriedades topológicas e mecânicas do DNA devido à interação com o fármaco, pode alterar o metabolismo e afetar o crescimento das células, resultando em cura ou controle de doenças (Figura 4a) como o câncer (SIRAJUDDIN; BADSHAH, 2013; AFRIN et al., 2017).

Figura 3 – Fármacos anticancerígenos que interagem com o DNA (modelo: *Calf thymus*).



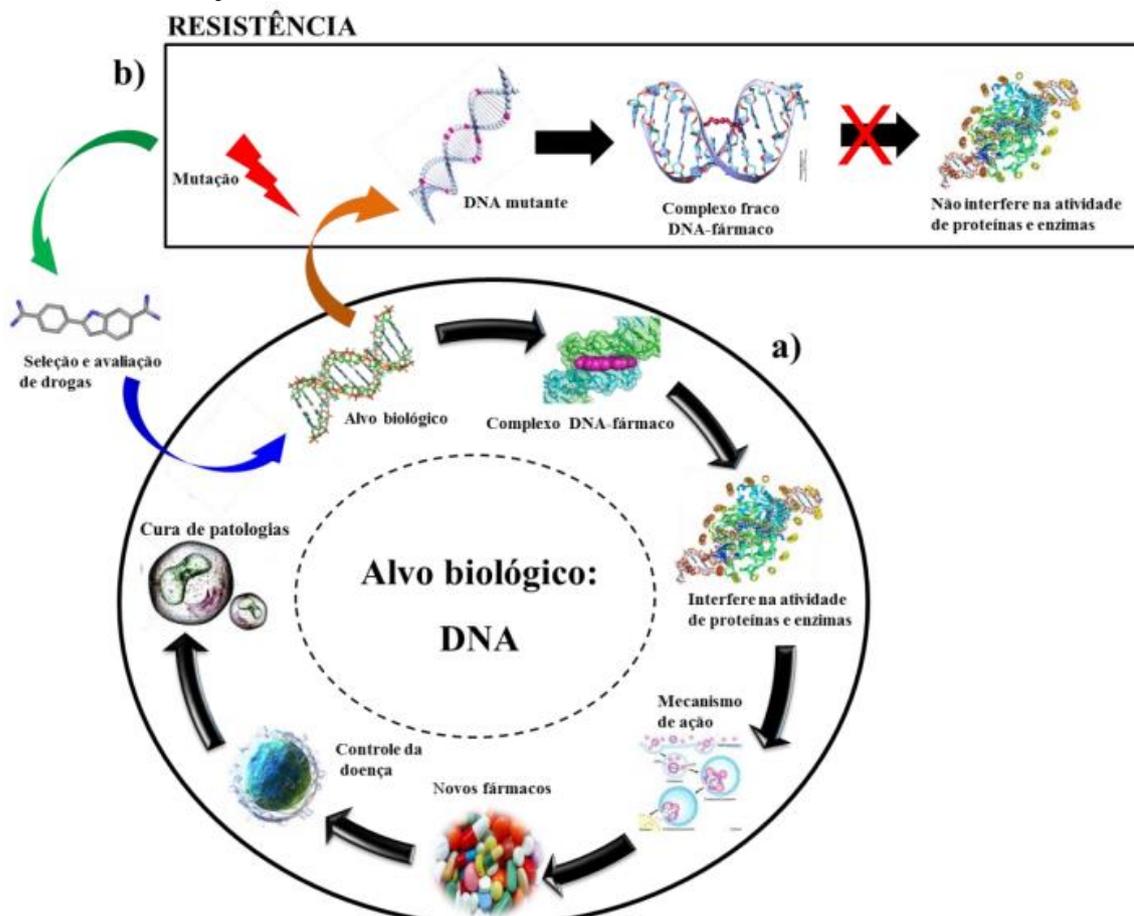
Fonte: elaborado pela autora, 2018

No desenvolvimento de fármacos faz-se necessário o entendimento dos princípios que regem o processo de reconhecimento molecular em relação ao alvo, no caso do DNA, (excetuando-se os complexos com platina), pode-se projetar moléculas visando a interação destas por meio de ligações não covalentes com o ácido nucleico. Esse evento é decorrente de uma reação de química supramolecular, uma vez que ocorre por meio de interações não covalentes entre as duas entidades, o alvo e ligante (ERMONDI; CARON, 2006), sendo a força da interação, em alguns casos, da mesma magnitude que uma ligação covalente.

Dessa forma, o entendimento do processo de interação deve ser considerado para o *design* de novos medicamentos que tenham maior eficiência e menores efeitos colaterais (SIRAJUDDIN, ALI; BADSHAH, 2013; FAN et al., 2018), tendo em vista que os agentes antineoplásicos, atualmente no mercado, possuem alta toxicidade e elevado grau de resistência pelos pacientes (KUMAR et al., 2017) (Figura 4b).

O modo de ligação via intercalação ao DNA, tem tido um grande destaque nas últimas décadas por apresentar um papel fundamental no efeito antitumoral de diversas drogas clinicamente utilizadas, incluindo antraciclinas, acridinas, antraquinonas e doxorrubicina. Por esse motivo, diversos grupos de pesquisas têm estudado vários intercalantes, dentre eles, moléculas derivadas das β -carbolinas as quais tem mostrado grandes potenciais farmacológicos, incluindo atividades anticâncers devido à sua ação direta em moléculas de DNA, danificando-as, ou inibição das enzimas topoisomerase I e II (CHEN et al., 2010; WU et al., 2010, SILVA et al., 2016b).

Figura 4 - a) Etapas do processo de ação de fármacos tendo DNA como alvo biológico até a cura de diversas patologias; b) Mecanismo de resistência do DNA à fármacos em função de processos de mutação.



Fonte: SILVA, 2016a.

Visto isso, é importante o estudo da interação fármaco-DNA para que se possa obter uma visão do mecanismo em nível molecular, sendo útil para otimizar a eficácia clínica de fármacos existentes e desenvolver novos quimioterápicos mais efetivos e seletivos (RAHMAN et al., 2017), uma vez que o câncer tem se tornado um problema global, com estimativa alta de novos casos nos próximos anos (KOVVURI et al., 2018).

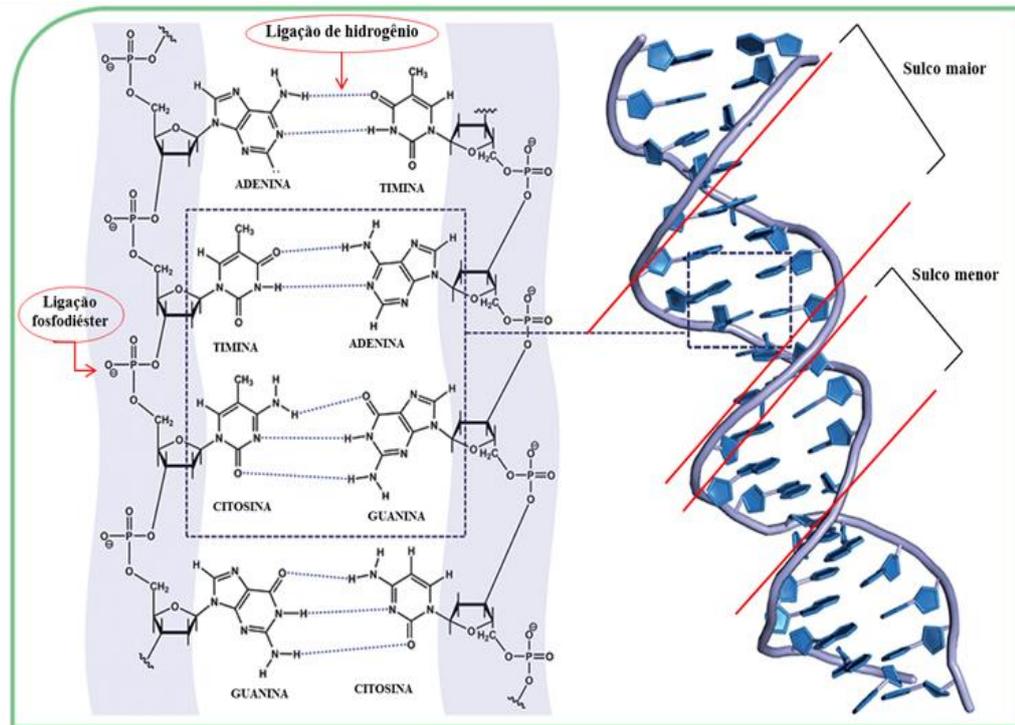
2.2.1.1. DNA e suas características gerais

O *ácido desoxirribonucleico*, mais conhecido como DNA, armazena as informações genéticas necessárias para o desenvolvimento de um organismo, através do tipo e sequência de bases nitrogenadas em sua cadeia polimérica. São estas informações que determinam a síntese de todos os constituintes celulares e regula o seu correto funcionamento, por meio de propriedades de reconhecimento molecular (NELSON; COX, 2014). Ele consiste em duas cadeias polinucleotídicas que se unem através de ligações de hidrogênios entre as bases nitrogenadas (Purínicas - Adenina (A), Guanina (G) e Pirimidínicas - Citosina (C), Timina (T)) de cada fita, sempre ocorrendo o pareamento de uma adenina com uma timina e uma citosina com uma guanina (NELSON; COX, 2014) (Figura 5).

A ocorrência de ligações não covalentes é essencial para a replicação, já que elas possibilitam que as fitas sejam separadas e utilizadas como um modelo para a nova dupla fita de DNA (MANNA, 2013). As cadeias são de sentidos opostos, enroladas em torno de um eixo, formando a dupla hélice (conhecido como β -hélice), como mostrado na Figura 5.

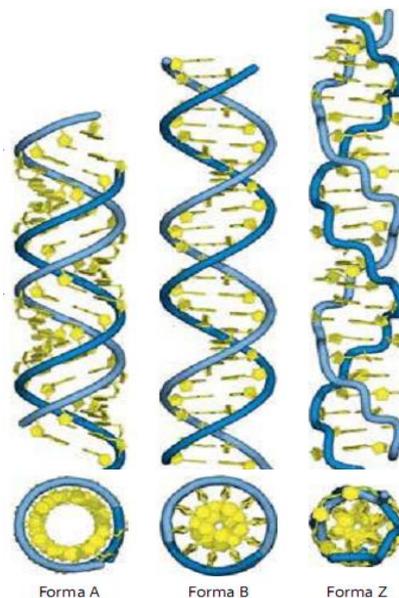
O DNA duplex (dupla hélice) pode ser encontrado de formas estruturais distintas, classificadas como A-, B- e Z-DNA, a depender das condições do meio (Figura 6). A forma B-DNA é a estrutura mais estável sob condições fisiológicas e, portanto, ela é usada como referência padrão para estudos de propriedades do DNA, além de ser a forma mais encontrada no organismo. Por outro lado, as demais isoformas requerem condições mais específicas: a isoforma A-DNA é formada em condições de desidratação, enquanto que a Z-DNA é favorecida em condições com alta concentração de sal e requer um tipo especial de sequências de bases. Quanto à rotação das hélices, diferente das duas primeiras isoformas, a Z-DNA gira para a esquerda (NELSON; COX, 2014).

Figura 5 – Estrutura dupla fita do DNA.



Fonte: Adaptado de BARREIRO; FRAGA, 2015.

Figura 6 – Isoformas do DNA: A-, B- e Z-DNA.



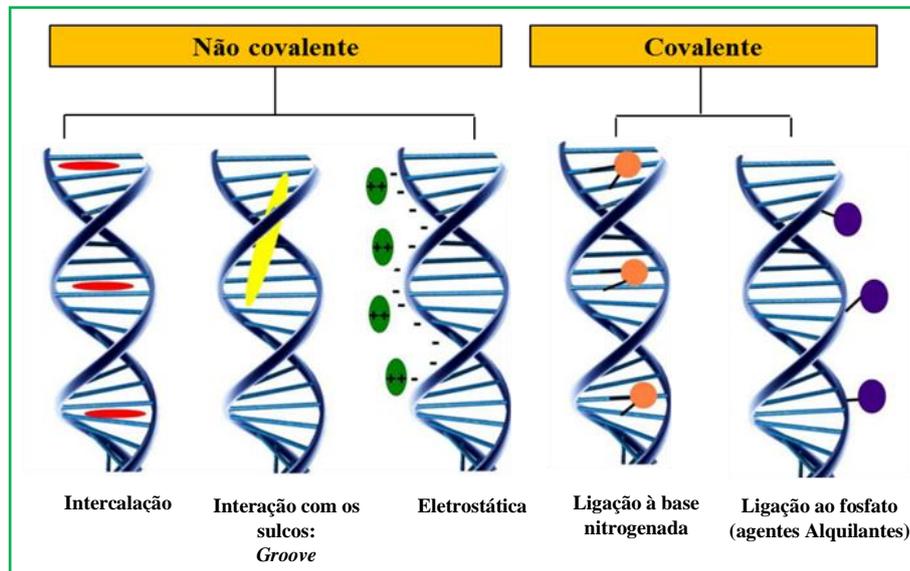
Fonte: NELSON; COX, 2014.

2.2.1.2. Modos de ligação entre DNA e ligantes

Como já mencionado, diversas moléculas pequenas bioativas podem ligar-se ao DNA por meio de ligações covalentes ou não covalentes (Figura 7) (RAHMAN et al., 2017). Decifrar

o modo de ligação preferencial entre estas duas moléculas tem sido uma abordagem importante para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais (SHAHABADI; HEIDARI, 2012; RAHMAN et al., 2017).

Figura 7 – Esquema de possíveis modos de interação entre DNA-ligante.



Fonte: Adpatado de BARRA; NETTO, 2015.

As interações que envolvem as ligações covalentes possuem alta energia, portanto são difíceis de ser rompidas e, dessa forma, os complexos fármaco-receptor são raramente desfeitos, o que leva à inibição completa dos processos de DNA e morte celular subsequente. Esse modo de ligação normalmente envolve ligantes de caráter eletrofílico e bionucleófilos orgânicos. No DNA, o ligante pode interagir com as bases nitrogenadas ou grupos fosfatos, como visto na Figura 7 (BARREIRO; FRAGA, 2015; HASANZADEH; SHADJOU, 2016), como por exemplo, a cisplatina, a qual é um potente agente anticancerígeno que se liga covalentemente aos pares de base adenina e guanina do DNA, resultando na inibição da transcrição e replicação do mesmo, além de induzir à morte celular (KELLAND, 2007; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

As ligações covalentes não são as mais adequadas em função do seu alto potencial de toxicidade, apesar de sua ocorrência ser bastante frequente em agentes bioativos, portanto a procura de candidatos a fármacos anticancerígenos que se liguem ao DNA de forma não-covalente, com mais especificidade, é alvo de grande interesse (DESPAIGNE et al., 2014; BARREIRO; FRAGA, 2015).

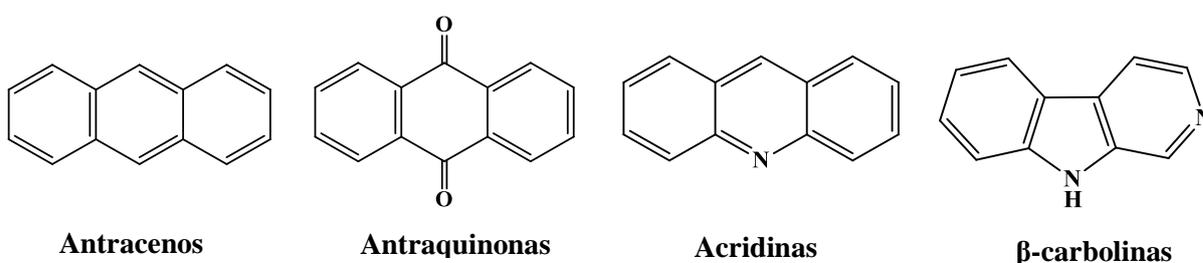
O modo de ligação não covalente, por sua vez, está relacionado a interações fracas e, portanto, possuem a característica de serem reversíveis, o que permite que os ligantes estejam

em equilíbrio livre/ligado e na forma livre possam realizar outras interações, além de ter menor citotoxicidade quando comparado aos agentes de ligação covalente (ERMONDI; CARON, 2006; SIRAJUDDIN, ALI; BADSHAH, 2013). Esse tipo de interação é a base da química supramolecular, como já foi discutido. Com o DNA ela pode ocorrer preferencialmente de três formas: por intercalação, via *groove* ou ainda de forma eletrostática (RAHMAN, et al., 2017; AHMAD, A.; AHMAD, M. 2018) (Figura 7).

De modo geral, as pequenas moléculas, em sua maioria, interagem com o DNA via intercalação ou *groove*. Todavia, os efeitos eletrostáticos também desempenham um papel importante ao ligar-se ao DNA. Além disso, há ocorrência de compostos que se ligam ao DNA por mais de um mecanismo (AFRIN et al., 2017; RAHMAN et al., 2017).

A intercalação ocorre quando um ligante aromático planar, com sistema rico em elétrons π , se insere entre dois pares de base adjacentes do DNA (STREKOWSKI, WILSON, 2007). A estabilidade do complexo, DNA-ligante, é efetuada pelo empilhamento π - π que ocorre entre os grupos aromáticos heterocíclicos dos pares de bases e o intercalante, por meio de forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, hidrofóbicas e/ou transferência de carga (MARTÍNEZ; CHACÓN-GARCIA, 2005; BARRA; NETTO, 2015). Este modo de interação causa uma mudança na estrutura do DNA, resultando em enrijecimento, alongamento e desenrolamento da dupla hélice. Conseqüentemente, a deformação da dupla hélice causada pelo intercalador impede a replicação do DNA na interrupção do mecanismo normal de replicação, transcrição e reparo do DNA e, portanto, inibe a proliferação de células cancerígenas ou causam a morte celular (BARRA; NETTO, 2015; SHANKARAIHAH et al., 2015). Este modo de ligação está relacionado a eficácia antitumoral de fármacos clinicamente utilizados baseados em acridinas e antraquinonas (WU et al., 2010). Dessa forma, diversas estruturas químicas, derivadas de núcleos intercalantes, têm sido propostas (Figura 8).

Figura 8 – Estruturas químicas de núcleos intercalantes ao DNA.



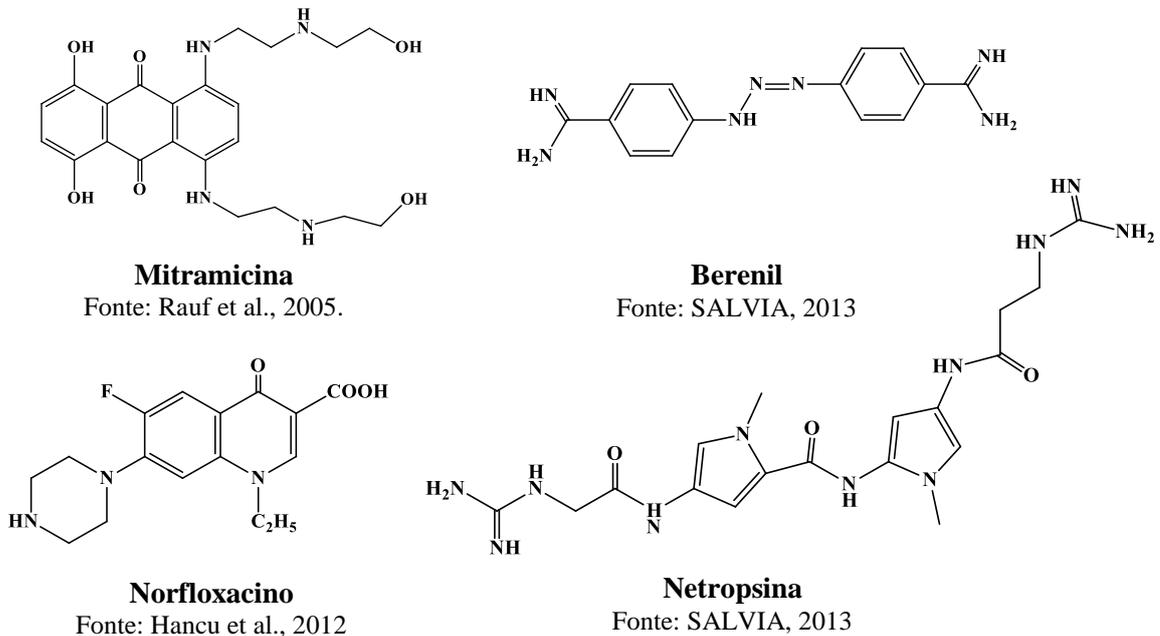
Fonte: adaptado de WHEATE, 2007.

Atualmente, existem quatro intercaladores orgânicos aprovados pela Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos para o tratamento de câncer humano: a daunorrubicina, doxorrubicina, mitoxantrona e a ansacrina. Estes agentes ao intercalarem ao DNA, promovem ligação covalente da macromolécula com a enzima Topoisomerase II, o que leva a intermediários prejudiciais ao metabolismo celular e, assim, resultando na morte via apoptose (HANDE, 2008). Os agentes intercalantes ao DNA formam uma importante classe de fármacos na terapia antitumoral (WU et al., 2010; CHEN et al., 2011)

O modo de ligação via *groove* ocorre quando as moléculas se ligam no sulco maior ou menor do DNA. Esse tipo de interação está relacionado à agentes ativos contra câncer e vírus, mas é principalmente encontrada em composto com atividades antiprotozoárias, como por exemplo leishmaniose, malária e doenças de chagas (MCKEEVER; KAISER; ROZAS, 2013). A exemplo, encontra-se a pentanamida que possui atividade contra a leishmaniose e contra pneumonia causada pelo *Pneumocystis carinii* (EVANS, NEIDLE, 2006). Esta forma de interação, ao contrário dos intercalantes, não ocasiona uma alteração conformacional extensa da dupla hélice do DNA (CHAIRES, 2006). O complexo formado por ligações ao sulco menor é estabilizado por várias ligações de hidrogênio, forças hidrofóbicas e interações de van der Waals, como por exemplo, no caso da mitramicina, um fármaco anticancerígeno. A ligação do sulco maior ocorre através da ligação de hidrogênio e pode formar uma hélice tripla de DNA, como por exemplo, o antibiótico norfloxacino (HAQ, 2002; RAUF, 2005). Na Figura 9, encontram-se as estruturas dos fármacos mencionados, como também de outros ligantes via *groove*.

Quanto à interação eletrostática, ela é mais fraca sob condições fisiológicas e, o ligante encontra-se na forma de cátions e interage com os grupos fosfatos, que são aniônicos, presentes na parte mais externa do DNA. Dessa forma, a formação do complexo depende da concentração de sal na solução (STREKOWSKI; WILSON, 2007).

Figura 9 – Estruturas químicas de ligantes que interagem com DNA via *groove*.



Fonte: elaborado pela autora, 2018.

2.2.1.3. DNA como alvo biológico: patologias associadas

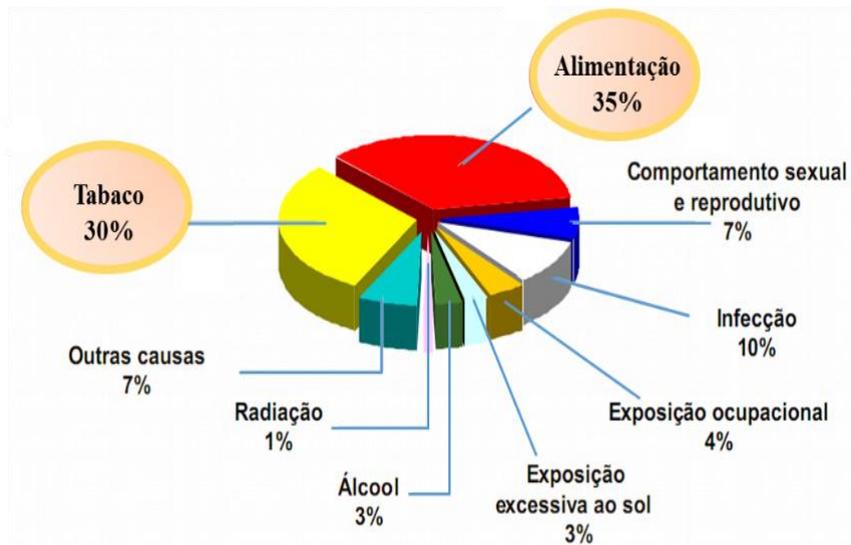
Muitos agentes terapêuticos, essenciais no tratamento de diversas doenças, atuam por meio da sua interação com o DNA. À exemplo destas patologias encontram-se o câncer e algumas doenças parasitárias como a malária, a doença de chagas e leishmaniose. Entretanto, no presente trabalho, destaca-se o câncer, uma vez que os compostos avaliados possuem atividades anticâncer contra linhagens celulares tumorais humanos.

O câncer por sua vez, é considerado uma doença de alto nível de complexidade, atualmente existindo em mais de 200 tipos, os quais podem se desenvolver em qualquer órgão do corpo. O câncer ocorre por diversas mutações cumulativas nos genes, o que leva a alterações nas funções celulares (HASSANPOUR; DEGHANI, 2017). As células alteradas (neoplásicas), por sua vez, adquirem comportamentos anormais com crescimento de maneira descontrolada e potencial invasivo, podendo assim disseminar para outros tecidos e órgãos, até mesmo os mais distantes do ponto de origem, o que resulta no estado mais grave da doença, a metástase (ALMEIDA et al., 2005).

O câncer se tornou um problema mundial de saúde pública onde o número de casos e óbitos que surgem por ano é bem alto. O seu desenvolvimento está associado a diversos fatores genéticos, ambientais, ocupacionais e comportamentais, como, por exemplo: a exposição à radiação, como também a algumas substâncias inorgânicas ingeridas indiretamente pelos seres

humanos, os quais mostraram-se capazes de produzir danos ao DNA, provocando anormalidades no crescimento e diferenciação celular (TORRES et al., 2015; HASSANPOUR; DEGHANI, 2017) (Figura 10).

Figura 10 – Fração atribuível dos principais fatores de risco de câncer.



Fonte: INCA, 2015

Segundo a organização mundial de saúde (WHO), até 30 de maio de 2017, o câncer era a segunda principal causa de morte em todo o mundo, com previsão de um aumento anual de novos casos de 14,1 milhões em 2012 para 21,6 milhões até 2030, e elevação da taxa de mortalidade em 60% (KOVVURI et al., 2018).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), um órgão que participa da formulação da política nacional de prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer, somente no Brasil, o número de mortes por câncer aumentou 31% desde 2000, chegando a 189.454 mortes em 2013 e 223 mil no final de 2015. As estimativas para o biênio 2016-2017, publicado no final de 2015, foi que o número de novos casos ultrapassasse 590 mil (INCA, 2015). Enquanto que para o biênio 2018/2019 foi estimado 600 mil novos casos (Figura 11) (INCA, 2018). A elaboração destes dados tem como objetivo conhecer a magnitude dos principais tipos de câncer, planejar ações e programas de controle e, definir políticas públicas e alocação de recursos (INCA, 2015).

Figura 11 – Estimativa do número de casos novos no Brasil para o biênio 2018-2019.

Localização primária	Casos novos	%	Tipo	Casos novos	%
Próstata	68.220	31,7	Mama feminina	59.700	29,5
Tranqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7	Cólon e reto	18.980	9,4
Cólon e reto	17.380	8,1	Colo do útero	16.370	8,1
Estômago	13.540	6,3	Tranqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2
Cavidade oral	11.200	5,2	Glândula Tireoide	8.040	4,0
Esôfago	8.240	3,8	Estômago	7.750	3,8
Bexiga	6.690	3,1	Corpo do útero	6.600	3,3
Laringe	6.390	3,0	Ovário	6.150	3,0
Leucemias	5.940	2,8	Sistema nervoso central	5.510	2,7
Sistema nervoso central	5.810	2,7	Leucemias	4.860	2,4
Total*	162.150		Total*	146.490	



*Neoplasias mais incidentes, exceto pele não melanoma

Fonte: INCA, 2018.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, atualmente entre 30-50% dos cânceres podem ser prevenidos ao evitar alguns fatores de riscos e adquirir estratégias de prevenção já estabelecidas. Porém, quando ocorre, tem grandes chances de cura quando o indivíduo é diagnosticado precocemente e tratado de forma adequada. O diagnóstico eficaz é extremamente importante e o tratamento engloba uma ou mais modalidades, onde os principais são: radioterapia, cirurgia e quimioterapia, os quais tem o objetivo de cura ou prolongamento de vida.

Os dois primeiros procedimentos são instrumentais, por outro lado, a quimioterapia faz uso de compostos químicos, chamados quimioterápicos, e pode curar alguns tipos de câncer e ter atuação efetiva em doenças disseminadas, como na doença de Hodgkin, linfomas não-Hodgkin de alto grau e leucemias, além de ser válida na palição de várias outras doenças (INCA, 2006). Esta modalidade é mais efetiva quando usada combinações de fármacos, e tem como objetivo destruir as células cancerígenas, porém, por não ser um método seletivo, as células normais também acabam sendo danificadas ocasionando os efeitos colaterais como fraqueza, perda de cabelo, náuseas, redução da imunidade, miocardiopatia, sequelas no sistema nervoso central, dentre outros (ALMEIDA, 2005, INCA, 2018). Entretanto, as células malignas são as mais afetadas devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos dessas duas populações celulares (INCA, 2018).

Atualmente, os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer incluem os alquilantes (ex.: cisplatina), antimetabólitos (ex.: metrotexato), derivados de vegetais (ex.: vincristina), antibióticos antitumorais (ex.: doxorrubicina), compostos de platina, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Porém, é preciso salientar que, em alguns casos, a quimioterapia não funciona completamente ou para de funcionar. Este processo é

conhecido como resistência à droga, sendo esse um dos problemas mais desafiantes que os pesquisadores e pacientes com câncer enfrentam atualmente.

A resistência pode ocorrer quando as células cancerosas contêm alterações moleculares que as tornam insensíveis a um medicamento específico antes do início do tratamento, sendo, portanto, chamada de resistência intrínseca. Em outros, as células cancerosas podem se adaptar ao fármaco enquanto estão sendo administradas, seja no início ou ao longo do tratamento, adquirindo mudanças moleculares que lhes permitem escapar de seus efeitos (Figura 4b) (HUBER et al., 2010; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2016).

As alterações moleculares que contribuem para a resistência incluem a mutação do alvo molecular do fármaco, alterações na forma como o fármaco interage com o tumor, aspectos relacionados à farmacocinética e metabolismo, alterações celulares amplas, e alterações no microambiente do tumor, entre outros (HUBER et al., 2010; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2016). Dessa forma, a resistência aos fármacos ocasiona redução de afinidade da droga pelo alvo biológico e, conseqüentemente reduz as alterações nos perfis de atividades das proteínas e enzimas, não levando à cura das doenças (PAXTON, 2012).

2.2.2. Sistema supramolecular: A importância da interação proteína-ligante

As proteínas são importantes biomoléculas responsáveis por diversas funções biológicas, no meio intra e extracelular, as quais são conseqüências de interações químicas. Estas interações podem ocorrer com diferentes macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, e pequenas moléculas, como drogas, íons, corantes, entre outros e, assim, definindo sua função no organismo (ALBERTS et al., 2010).

Dentre as diversas proteínas existentes, encontram-se aquelas que atuam no transporte de moléculas para dentro e para fora das células, a exemplo, a albumina sérica. Ela é a mais abundante no plasma sanguíneo, além de ser a principal proteína transportadora de fármacos. Por apresentar uma estrutura flexível e uma variedade de sítios de ligação, permite se ligue reversivelmente a diversas espécies químicas endógenas e exógenas (CHAKRABORTY; BASAU, 2009; DESPAIGNE, 2014; GHOSH; RATHI; ARORA, 2016; LI et al., 2016).

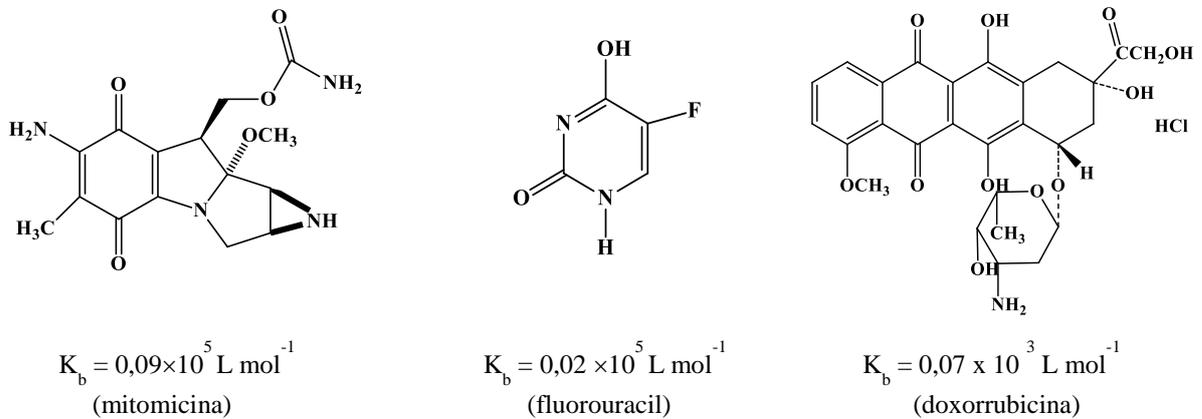
Alguns tratamentos, como por exemplo, a quimioterapia, podem ser afetados pelas interações dos agentes terapêuticos com proteínas transportadoras existentes na corrente sanguínea, uma vez que isto pode afetar a distribuição, concentração livre e metabolismo do fármaco. Por outro lado, a albumina, por ser molécula transportadora, pode favorecer na entrega seletiva de medicamentos na região tumoral e facilitar seu acesso na célula. Estes efeitos são, portanto, relacionados com a magnitude dessa interação (K_b), a qual podem ser efetuadas por

meio de ligações fracas não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas, formando assim um complexo supramolecular fármaco-proteína. (CHAKRABORTY; BASU; 2009; ALBERTS et al., 2010; DESPAIGNE et al., 2014). Dessa forma, a eficácia dos agentes terapêuticos depende da sua capacidade de ligação a proteínas transportadoras, como por exemplo as albuminas de soro (ZHANG et al., 2009). Uma ligação muito forte entre a albumina e o composto carregado pode diminuir a concentração deste no plasma sanguíneo, enquanto que uma fraca ligação pode levar a um tempo de meia-vida curto ou a uma má distribuição deste composto. Por isso, é importante conhecer e avaliar as propriedades de ligação (BASU; KUMAR, 2015; JAHANBAN-ESFAHLAN; PANAHI-AZAR, 2016).

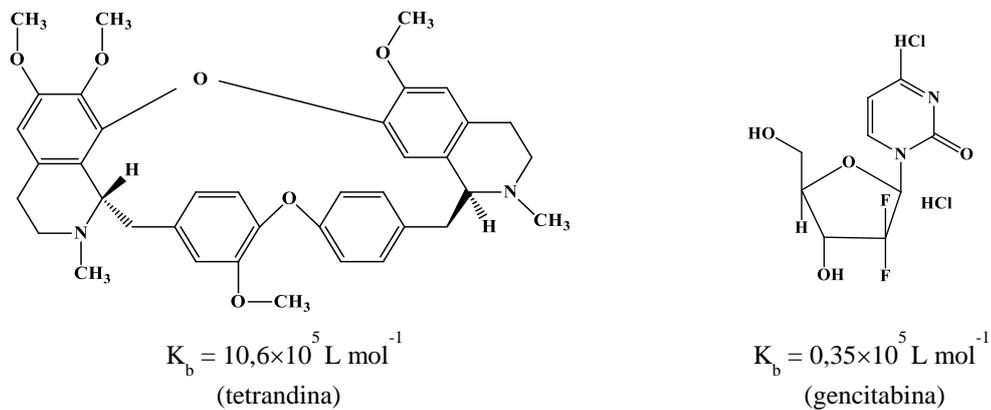
Dessa forma, o estudo da interação de pequenas moléculas bioativas com proteínas transportadoras tem sua importância, pois os parâmetros de ligação são úteis no estudo da farmacocinética de um fármaco, desenho de análogos com propriedades farmacológicas efetivas, farmacodinâmica e no *design* das formas de dosagem do medicamento, uma vez que estas interações implicam na ação farmacológica do fármaco, assim como sua biotransformação, biodistribuição, dentre outros fatores, pois apenas compostos livres exibem sua ação biológica (CHAKRABORTY; BASAU, 2009; LI et al., 2016). Esta avaliação fornece parâmetros, como constante de ligação, locais e força de ligação e a alteração dos parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) (BI et al., 2009). Porém, o presente trabalho focará na determinação da constante de ligação e os possíveis sítios de ligação.

Após a albumina de soro humano (HSA), a albumina de soro bovino (BSA) é um modelo mais amplamente utilizado em estudos de interações proteína-ligante, pois apresenta alta homologia estrutural com a HSA, é estável e possui menor custo quando comparada a albumina humana. Mas, ambas são empregadas como proteínas modelos para estudos do complexo fármaco-proteína (XIE et al., 2006; CHAKRABORTY; BASAU, 2009; GHOSH; RATHI; ARORA, 2016; LI et al., 2016), incluindo fármacos antitumorais clinicamente utilizados (Figura 12).

Figura 12 – Constantes de interação entre fármacos antitumorais e a BSA, obtidos por meio da técnica de fluorescência molecular (pH= 7,4)



Referência = Bi et al., 2009



Referência = Cheng; Liu; Jiang, 2013

Referência = Kandagal et al., 2006

Fonte: elaborado pela autora, 2018

2.2.2.1. Albumina de soro bovino (BSA) e suas características gerais

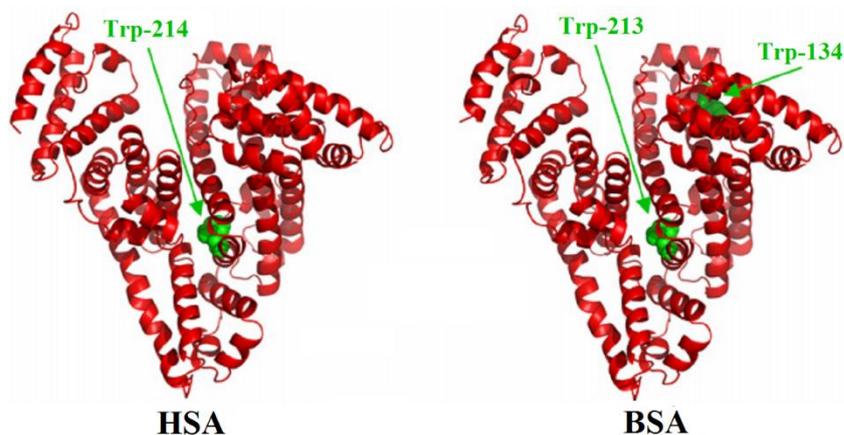
As albuminas do soro são as proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo correspondendo a aproximadamente 60% do seu total de proteínas. (GELAMO et al., 2002; JAHANBAN-ESFAHLAN; PANAHI-AZAR, 2016). Sua função fisiológica mais relevante é a de realizar o transporte de diversos compostos importantes ao organismo, como aminoácidos, fármacos, ácidos graxos, vitaminas, hormônios e bilirrubina para seus locais alvo, além de ser responsável por regular a pressão arterial osmótica sanguínea (NAIK, CHIMATADAR, NANDIBEWOR, 2010; BOURASSA; HASNI; TAJMIR-RIAHI, 2011). Além disso, ela é responsável pela distribuição de medicamentos em seus devidos sítio de ligação, como também tem a característica de aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis no plasma através

da simples interação (BECKFORD, 2010; JAHANBAN-ESFAHLAN; PANAHI-AZAR, 2016).

A BSA possui uma estrutura bastante similar à estrutura da HSA, apresentando uma percentagem de sequências idênticas de aminoácidos de aproximadamente 80% (METI et al., 2014) e, portanto, é geralmente utilizada como proteínas-modelo para diversos estudos bioquímicos, físico-químicos e biofísicos (GELAMO et al., 2002; SURYAWANSHI et al., 2016).

A BSA é uma cadeia polipeptídica simples de 582 resíduos de aminoácidos e três domínios (I, II, III). Dentre os aminoácidos encontram-se dois resíduos de triptofano (Trp 134 e Trp 213), os quais são os maiores responsáveis pela propriedade de fluorescência das albuminas, devido à porção aromáticas em suas estruturas, permitindo assim que os estudos de interações com compostos sejam realizados por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência. O Trp 134 localiza-se na superfície da molécula e o Trp 213 está localizado dentro de uma cavidade hidrofóbica da BSA (Figura 13), enquanto que a HSA é composta por 585 resíduos de aminoácidos e contém apenas um triptofano, o Trp 214 (BOURASSA; HASNI; RIAHI, 2011; LI et al., 2011; CHENG, 2012).

Figura 13 - Estrutura da HSA e BSA, com resíduos de triptofano mostrados em cor verde.

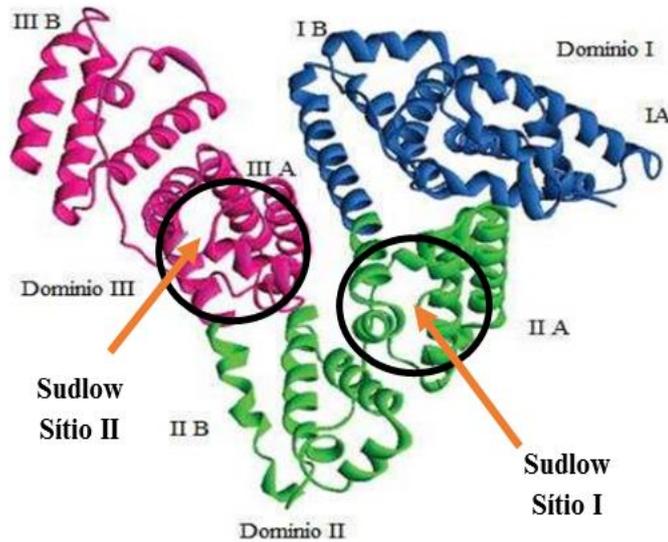


Fonte: BOURASSA; HASNI; TAJMIR-RIAHI, 2011.

A BSA possui três domínios (I, II, III) linearmente dispostos, que por sua vez são compostos por dois subdomínios, A e B (Figura 14). Os principais locais de ligação de moléculas endógenas e exógenas estão localizados nas cavidades hidrofóbicas dos subdomínios IIA e IIIA, também conhecidas por sítios I e II, respectivamente. Na superfície do subdomínio IB está localizado o Trp 134, enquanto que o Trp 213 encontra-se na cavidade hidrofóbica do domínio IIA (BOURASSA; HASNI; RIAHI, 2011; LI et al., 2011; JAHANBAN-ESFAHLAN;

PANAHI-AZAR, 2016). Na HSA, o Trp 214 está localizado no subdomínio IIA (SILVA et al., 2014a).

Figura 14 - Representação estrutural da BSA e seus domínios e subdomínios.



Fonte: Adaptado HUDSON, 2017.

2.3. Alcaloides β -carbolínicos

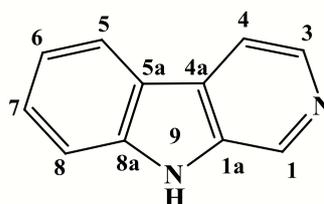
Os alcaloides representam um grupo heterogêneo de substâncias orgânicas, bastante diversificado, que se caracterizam pela presença de nitrogênio, em geral com propriedades básicas. Sua origem é principalmente vegetal, mas pode ser também encontrado em fungos, bactérias, animais e seres humanos. Esta classe de compostos está presente na história da medicina tradicional, pois muitos deles têm atividades farmacológicas comprovadas e, portanto, são importantes para medicina e biotecnologia (WINK, 2010).

Dessa forma, a indústria farmacêutica, é em parte, motivada pela descoberta de fármacos de origem vegetal que são importantes no tratamento diversas doenças, como o câncer, a citar o exemplo dos alcaloides de vinca vincristina e vimblastina, isolados da espécie *Catharanthus roseus* (família *Apocynaceae*) (RABÊLO, 2014), camptotecina, isolada da espécie *Camptotheca acuminata* (família *Nyssaceae*) (SRIRAM et al., 2005) e alguns análogos semi-sintéticos, a vinorelbina e vindesina (PRAKASH et al, 2013).

Dentre os alcaloides bioativos, uma importante classe que tem tornado alvo em estudos de interações macromolécula-ligante, por apresentar amplo espectro de propriedades bioquímicas e farmacológicas, inclusive potentes atividades antineoplásicas, são os alcaloides β -carbolínicos (CAO et al., 2010; CHEN et al., 2010). Eles são baseados na estrutura do núcleo

β -carbolina, o qual é composto por um anel tricíclico pirido[3,4-b]indol (Figura 15) (DAOUD, A. et al., 2014; ASHOK et al., 2015) com diferentes graus de aromaticidade (CAO et al., 2007), podendo sofrer substituições em qualquer das nove posições ao longo da estrutura do núcleo, dando origem a uma vasta diversidade estrutural (LIEW et al., 2014).

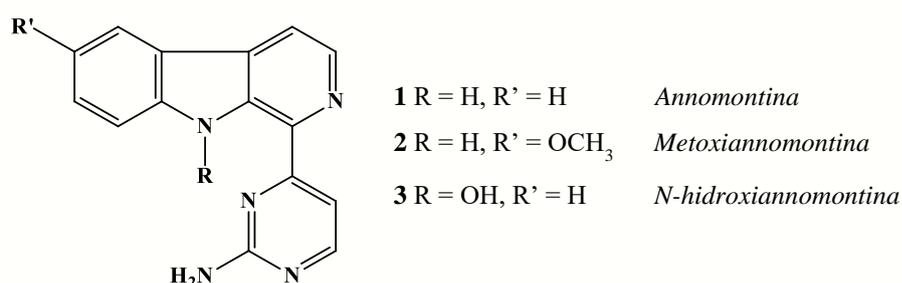
Figura 15 – Estrutura do núcleo β -carbolina.



Fonte: ASHOK et al., 2015.

Estes alcaloides são conhecidos como alcaloides do harmala, pois os primeiros a serem descobertos foram a harmalina e a harmina, isoladas a partir de sementes de *Peganum harmala*. Eles exercem sua atividade antitumoral através de múltiplos mecanismos, como intercalação em DNA, inibição das enzimas topoisomerase I e II, cinases dependentes de ciclina (CDK), *cinase* ativada por mitógenos (MAPKAP-K2), mevalonato quinase (MK-2) e a proteína kinesin (SHANKARAIHAH et al., 2015; CHOURASIYA et al., 2012). Os β -carbolínicos são moléculas pequenas de ocorrência natural (Figura 16) e também sintética (Figura 17) conhecidos como intercaladores ao DNA (CAO et al., 2007; ASHOK et al., 2015).

Figura 16 – Exemplos de alcaloides β -carbolínicos naturais.

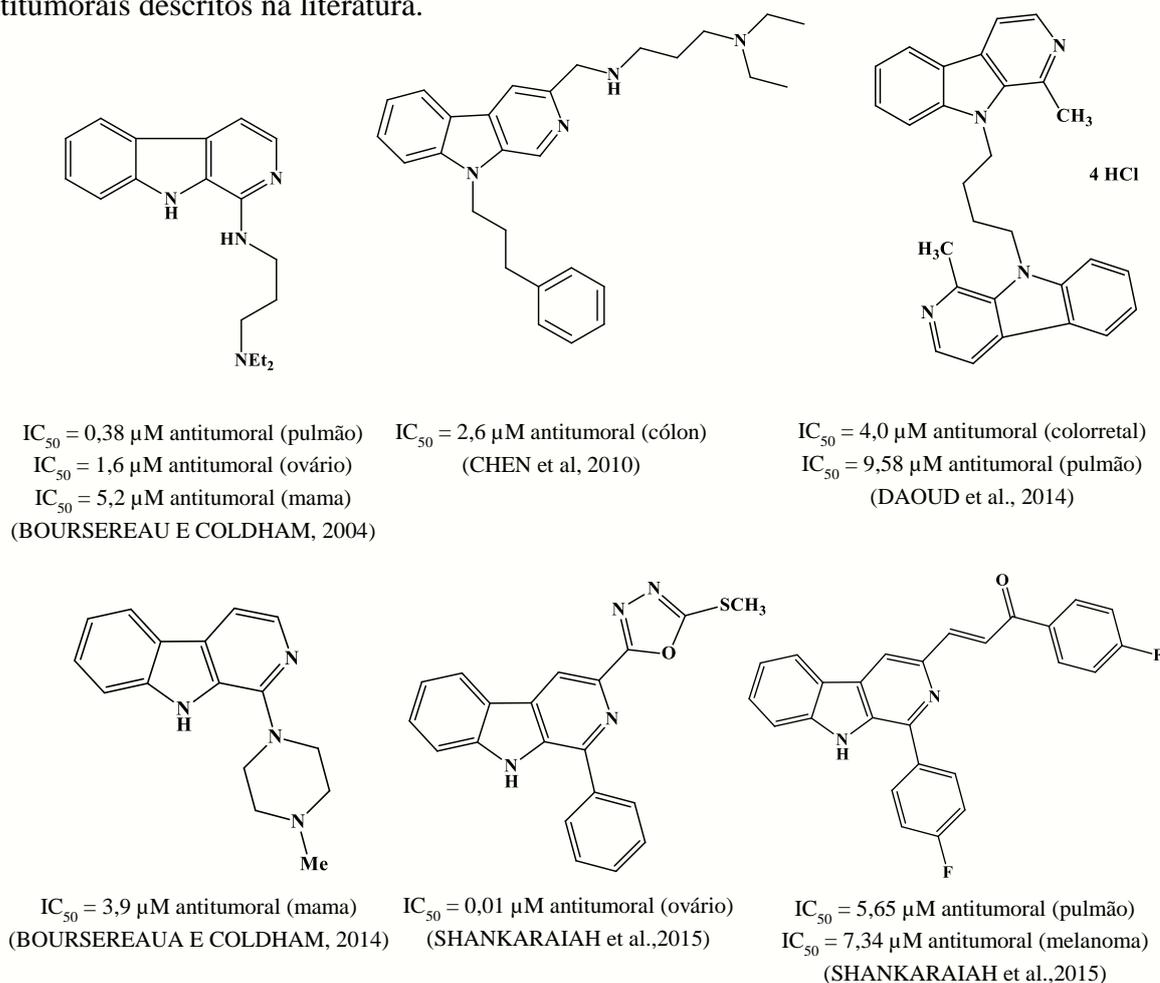


Fonte: Costa et al., 2008.

Estudos revelaram que os β -carbolínicos e seus derivados são agentes multifuncionais em potencial que possuem uma afinidade de ligação elevada ao DNA e diversas atividades biológicas, tais como anticâncer, antiprotozoário (malária), antileishmaniótica, antiviral, antiparasitária, antimicrobiana, dentre outros (CHOURASIYA et al., 2012; ROGGERO et al., 2014; HORTON et al., 2016; SILVA, 2016a). Esta extensa atividade, principalmente a antitumoral, tem tornado os β -carbolinas grandes alvos atrativos em síntese orgânica (Figura

13), onde é possível, com base em estudos de interações, fazer alterações estruturais em compostos bioativos, visando melhorar as propriedades terapêuticas, como também aumentar a seletividade, obtendo, assim, um protótipo à fármaco de maior eficácia clínica (CHEN, 2010; SHANKARAIHAH et al., 2015). Essa melhoria tem sido observada com a introdução de grupos apropriados nas posições 1, 2, 3 e 9 do núcleo β -carbolínico (CHEN, 2010; CHOURASIYA et al., 2012; BARBOSA et al., 2016).

Figura 17 – Estruturas dos derivados de β -carbolínicos sintéticos e as respectivas atividades antitumorais descritos na literatura.

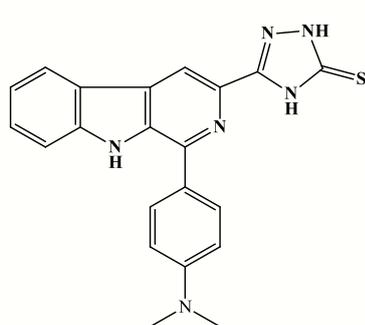


Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

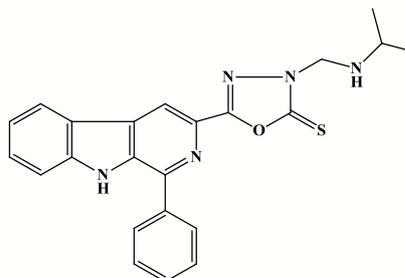
Dessa forma, na busca contínua de agentes antitumorais novos e eficazes, o grupo de pesquisa da professora Maria Helena Sarragiotto, localizados no laboratório de Produtos Naturais Estrutura, Conformação e Atividade Biológica do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM), vem realizando diversas sínteses de moléculas contendo o núcleo β -carbolina, com diferentes substituições nas posições 1 e 3 do anel, na tentativa de obter compostos com potencial atividade anticâncer. Dessa forma, o grupo também

realiza a avaliação das atividades contra diversas linhagens cancerígenas (FORMAGIO et al., 2008; FORMAGIO et al., 2009; SAVARIZ et al., 2010; BARBOSA et al., 2011; SAVARIZ et al., 2012; SAVARIZ et al., 2014). Alguns destes compostos são apresentados na Figura 18.

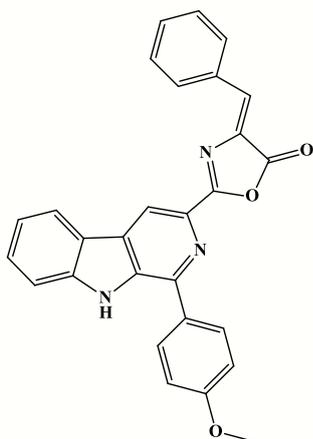
Figura 18 – Estruturas de β -carbolínicos, sintetizados pelo grupo de pesquisa UEM, e suas respectivas atividades antitumorais.



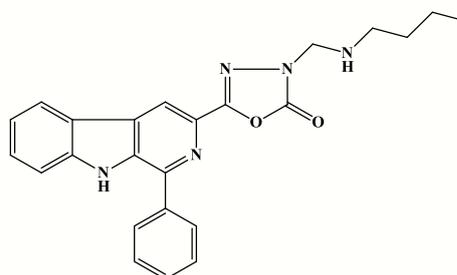
GI_{50} = 0,04 μ M antitumoral (rim)
 GI_{50} = 0,06 μ M antitumoral (pulmão)
 GI_{50} = 1,09 μ M antitumoral (ovário)
 (FORMAGIO et al., 2008)



GI_{50} = 0,86 μ M antitumoral (mama)
 GI_{50} = 4,66 μ M antitumoral (rim)
 GI_{50} = 5,72 μ M antitumoral (pulmão)
 (SAVARIZ et al., 2010)



IC_{50} = 0,48 μ M antitumoral (glioma)
 IC_{50} = 1,07 μ M antitumoral (ovário)
 IC_{50} = 1,50 μ M antitumoral (próstata)
 (SAVARIZ et al., 2012)



GI_{50} = 0,20 μ M antitumoral (ovário resis.)
 GI_{50} = 2,23 μ M antitumoral (próstata)
 GI_{50} = 7,04 μ M antitumoral (pulmão)
 (SAVARIZ et al., 2014)

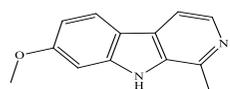
Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

2.3.1. Interação de alcaloides β -carbolinas com DNA

Como já foi discutido no presente trabalho, o estudo da interação DNA-ligante tem se tornado alvo de diversas pesquisas científicas, as quais tem o objetivo de entender a ação de fármacos em nível molecular, sendo assim uma importante ferramenta no desenvolvimento de novos fármacos mais promissores.

Os números de trabalhos publicados nessa área são imensos e, os β -carbolínicos ocupam um grande espaço, devido ao seu alto potencial antiproliferativo. Portanto, diversos grupos de pesquisas têm buscado sintetizar compostos derivados das β -carbolinas no intuito de obter moléculas de grande eficácia antitumoral e menores danos às células saudáveis, porém poucos estudos têm avaliado de forma quantitativa a interação destes compostos com o DNA. Dentre estes poucos trabalhos, encontra-se o estudo realizado por Xiao e colaboradores (2001), o qual mostrou que os compostos avaliados intercalam ao DNA entre os pares de bases G-C, com constante de ligação variando de $3,80 \times 10^3$ a $45,03 \times 10^3$ L mol⁻¹. Em trabalho semelhante, SILVA et al. (2016b) também concluíram que os compostos, por eles analisados, ligavam-se ao DNA preferencialmente via intercalação, com magnitude de interação na faixa de $0,033 \times 10^4$ a 182×10^4 L mol⁻¹, além de que o principal mecanismo de ação destes compostos está relacionado a sua interação com a macromolécula (Figura 19).

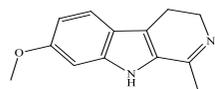
Figura 19 - Estruturas de compostos β -carbolicínicos e seus respectivos valores de constantes de ligação (K_b) (pH = 7,4).



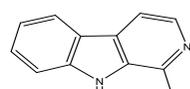
$$K_b = 34,4 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$$

Técnica: UV-vis

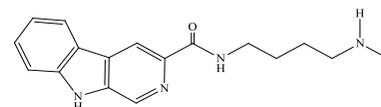
Referência: NAFISI et al., 2010.



$$K_b = 3,82 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$$



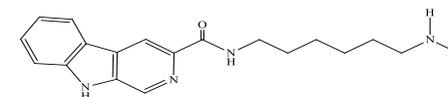
$$K_b = 1,63 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$$



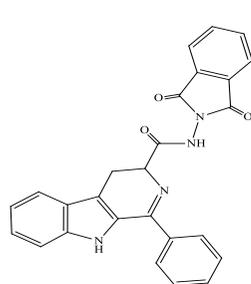
$$K_b = 4,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$$

Técnica: UV-vis

Referência: XIAO et al., 2001



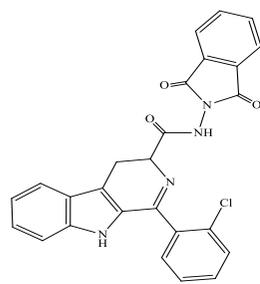
$$K_b = 0,68 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$$



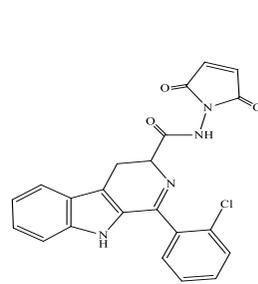
$$K_b = 2,2 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$$

Técnica: Fluorescência molecular

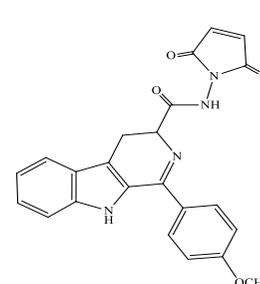
Referência: NASCIMENTO, 2017



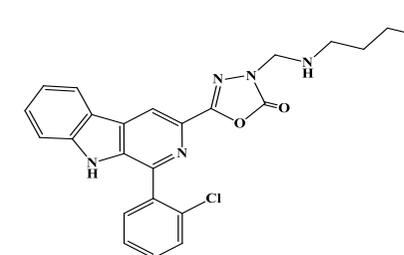
$$K_b = 9,8 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$$



$$K_b = 1,35 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$$



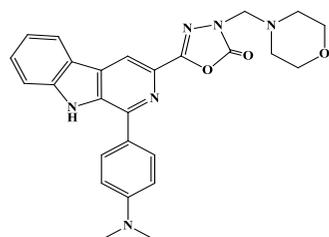
$$K_b = 1,84 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$$



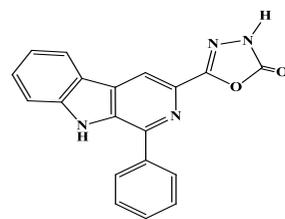
$$K_b = 0,033 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$$

Técnica: Fluorescência molecular

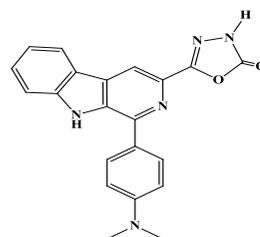
Referência: SILVA et al., 2016b.



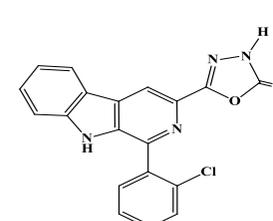
$$K_b = 1,82 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$$



$$K_b = 7,76 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$$



$$K_b = 3,98 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$$



$$K_b = 0,95 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$$

Técnica: Fluorescência molecular

Referência: SILVA et al., 2016b.

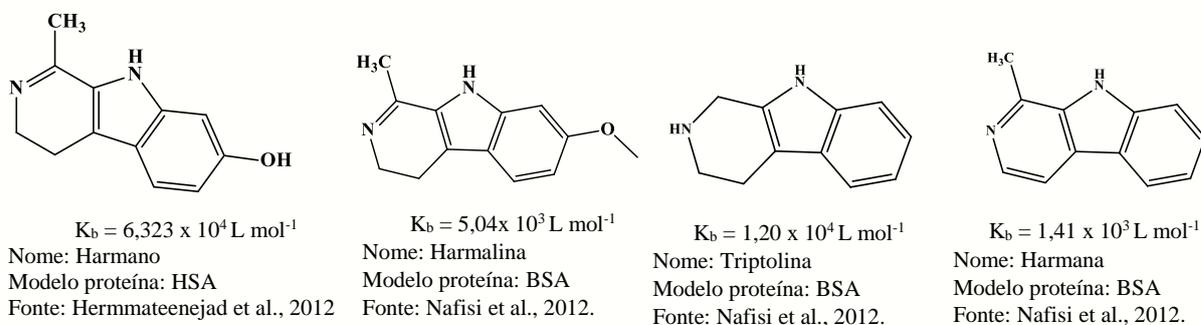
Fonte: elaborado pela autora, 2018.

2.3.2. Interação entre β -carbolinas e BSA

O estudo da interação das β -carbolinas com o DNA é bastante explorado devido as suas variadas atividades farmacológicas, em especial as atividades antitumorais. Porém, trabalhos do estudo da interação com proteínas carreadoras é muito escasso. Como já foi mencionado, as albuminas de soro são as principais proteínas solúveis no plasma sanguíneo e são responsáveis por diversas funções importantes no organismo, dentre elas a responsabilidade de transportar e distribuir fármacos aos seus alvos celulares. A albumina de soro bovino (BSA), por sua vez, é um modelo bastante utilizado devido à sua alta semelhança estrutural com a albumina de soro humano (HSA), além de ser mais barata.

Dentre os poucos estudos existentes na literatura, encontra-se o de Fenerty & Lindup (1991), onde avaliaram o sítio de ligação de alguns derivados β -carbolinas na BSA e, observaram que estes tiveram mais afinidade para o sítio II. Anos mais tarde, Hemmateenejad et al. (2012) avaliaram a interação do harmano, alcaloide também pertencente à classe dos β -carbolinas, com a HSA por fluorescência molecular. Os resultados mostraram a formação do complexo proteína-harmano, como também o local de ligação, o qual está localizado nos subdomínios IIA e IIIA da BSA, porém com preferência em relação ao subdomínio IIA. Além disto, as forças de ligação que prevaleceram foram interação hidrofóbica, interação de Van de Waals e ligação de hidrogênio. Nesse mesmo ano, Nafisi et al. (2012) também realizaram um estudo de interação de quatro β -carbolinas com a BSA, onde confirmaram a interação através das mesmas forças que aquelas encontradas por Hemmateenejad et al. (2012). Na Figura 20, podem ser observadas algumas β -carbolinas avaliadas em estudos de interação com proteínas carreadoras.

Figura 20 – β -carbolinas que interagem com BSA e/ou HSA.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Como pode ser visto, ainda é bastante limitado o número de trabalhos que visam analisar compostos derivados de β -carbolinas com a albumina de soro. Sendo assim, o presente estudo pode colaborar com esta área de pesquisa.

2.4. Análise de correlação entre K_b e IG_{50}

Diante da necessidade do *design* de novo fármacos antitumorais com maior potencial e maior seletividade frente as células cancerosas, alguns estudos vem buscando correlacionar os valores das atividades biológicas dos compostos bioativos (IG_{50}), inclusive as β -carbolinas, com seus respectivos valores de K_b , o qual se refere a magnitude da interação DNA-ligante. Quando a correlação é estabelecida, é indicativo de que o principal mecanismo de ação do composto é sua interação com o DNA, caso ocorra outro mecanismo, não há estabelecimento de correlação (DZIEGIELEWSKI et al., 2002; SILVA, 2016a; DAS et al., 2018).

Nesse sentido Das et al., (2018), realizaram o estudo da correlação da constante de ligação (K_b) com os valores da atividade citotóxica (IG_{50}) de compostos da classe piperidina os quais apresentaram interação por intercalação com o DNA. Os resultados mostraram que os compostos que apresentaram maior valor da constante de ligação, ou seja, maior interação com o DNA, foram os mais ativos (menor valor de IG_{50}) frente as células avaliadas, enquanto que os de menores valores de K_b foram os menos ativos (maior valor de IG_{50}). Dessa forma, estabeleceu uma relação linear inversa entre o K_b e IG_{50} , com coeficiente de correlação (r^2) na faixa de 0,8174 à 0,9868. Estes valores estão de acordo com os dados encontrado por Silva et al., (2016b), porém com derivados de alcaloides β -carbolínicos, onde obteve uma relação linear inversa com r^2 na faixa de 0,5360 a 0,9600, para as linhagens avaliadas. Ambos trabalhos concluíram que a interação dos compostos com o DNA pode ser um dos prováveis mecanismos de ação do mesmo.

Em trabalhos similares, foram encontradas correlações para derivados de bases de Schiff (SILVA et al., 2017) e composto ternários de cobre (II) (SILVA et al., 2014b), onde o K_b e IG_{50} mantiveram relações inversamente proporcionais, sugerindo assim o principal mecanismo de ação farmacológica a interação com o DNA.

Por outro lado, para alguns estudos não foi possível achar essa correlação entre as variáveis analisadas, indicando, portanto, que os compostos analisados possuíam ação biológica preferencialmente por meio de outros possíveis mecanismos, sendo assim suas atividades citotóxicas exercidas em alvos diferentes do DNA, mesmo eles apresentando interações com a macromolécula. Foi o caso das pesquisas realizadas por Dziegielewski et al., (2002) para imidazoacridinonas, e por Pivetta et al., (2017) para derivados de cumarina.

2.5. Técnicas e métodos utilizados para avaliar as interações DNA/Proteína- ligante

A interação entre biomoléculas e fármacos atraiu grande interesse entre pesquisadores há décadas. Ao longo dos últimos anos, muitas pesquisas foram focadas na interação fármaco-DNA e fármaco-proteína (KALANUR; KATRAHALLI; SEETHARAMAPPA, 2009). Para isso, diversas técnicas instrumentais podem ser usadas tanto para caracterizar a natureza do complexo, quanto para avaliar os efeitos desta interação na estrutura da biomolécula. Dentre elas a espectrometria de fluorescência molecular e absorção no UV-vis, eletroforese, espectrometria de massa, infravermelho, voltametria cíclica, dentre outras (SIRAJUDDIN, ALI; BADSHAH, 2013).

No presente trabalho, daremos enfoque as técnicas espectroscópicas de fluorescência molecular e absorção no UV-vis, sendo estas a mais utilizadas em trabalhos similares (DESPAIGNE et al., 2014).

2.5.1. Espectroscopia de absorção no UV-visível

A espectroscopia UV-visível é uma técnica relativamente simples, mas eficaz, utilizada para avaliar a formação de complexos supramoleculares entre o ligante e a macromoléculas, como DNA e proteínas, assim como a estabilidade do complexo.

A formação do complexo com o DNA pode ser avaliada por meio das mudanças espectrais no máximo de absorção da molécula, na presença e ausência do DNA, sabendo que as moléculas em estudo absorvem radiação na região visível. (REHMAN et al., 2015; AFRIN et al., 2017; AHMAD; AHMAD, 2018). Geralmente, quando a ligação ocorre por intercalação observa-se variações na intensidade de absorção (hipocromismo) normalmente junto ao deslocamento no comprimento de onda para o vermelho (mudança batocrômica). Por outro lado, se o modo for *groove*, a variação da intensidade é desprezível e apenas é observado os efeitos hipocrômico e hiperocrômico (RAHMAN et al., 2017; AHMAD; AHMAD, 2018).

Já para o emprego da técnica para avaliação do complexo formado com a proteína avaliam-se as alterações das propriedades de absorção da proteína na ausência e presença do ligante, em que se observa um aumento na intensidade da banda de absorção quando a proteína livre é associada a um ligante, o que indica a formação do complexo (YU et al., 2014). As proteínas possuem duas bandas de absorção: uma com máximo em aproximadamente 220 nm correspondente às características da estrutura α -hélice, e outra banda em 280 nm que corresponde a absorção dos resíduos dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina (ZHANG, G. et al., 2012; YUE et al., 2008).

Esta técnica é ainda utilizada para se calcular a concentração do DNA e da proteína em solução, como também para verificar a pureza do DNA. O máximo de absorção do DNA encontra-se em 260 nm ocasionado, preferencialmente, pelos grupos cromóforos nas porções de purina (adenina e guanina) e pirimidina (citosina e timina), sendo estas responsáveis pelas transições eletrônicas (SIRAJUDDIN, ALI; BADSHAH, 2013).

Dessa forma, a partir dos valores de absorção, calcula-se a concentração do DNA e proteína utilizando a lei de Beer (SIRAJUDDIN, ALI; BADSHAH, 2013; SAVARIZ et al., 2014). Quanto à pureza do DNA, calcula-se a razão das absorvâncias A_{260}/A_{280} ou A_{260}/A_{230} , onde o valor deve estar entre 1,8-2,0.

2.5.2. Espectroscopia de fluorescência molecular

A espectroscopia de fluorescência molecular é uma das técnicas mais amplamente exploradas para compreender a interação macromolécula-ligante, podendo fornecer informações importantes sobre a formação do complexo, como o mecanismo de *quenching*, modo de ligação, distâncias intermoleculares, constante de ligação, parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG), sítios de ligação (estequiometria), entre outras. Ela é rápida, sensível e seletiva (AFRIN et al., 2017; RAHMAN et al., 2017).

Diversos compostos que possuem grupos funcionais aromáticos e estruturas rígidas apresentam fluorescência intensa. Portanto, a avaliação do potencial de ligação ao DNA é estudada com base nas mudanças desse sinal analítico do ligante na presença de concentrações variáveis de DNA, sendo que este possui fluorescência desprezível (REHMAN et al., 2015). Por outro lado, a avaliação da interação do ligante-proteína pode ser feita por meio do monitoramento do sinal de fluorescência da proteína ou do ligante. Mas, é preferível avaliar por meio do sinal da proteína onde a emissão radioativa está relacionada aos resíduos dos aminoácidos aromáticos: triptofano, tirosina e fenilalanina, que são fluorescentes e atuam como fluoróforo. Entretanto, a fluorescência de muitas proteínas está relacionada, principalmente, ao resíduo de triptofano, sendo este o de maior rendimento quântico (CHAKRABORTY; BASU; 2009; DESPAIGNE et al., 2014; DANTAS, 2015).

2.5.2.1. Mecanismo de *quenching*

O processo de *quenching* refere-se ao mecanismo onde uma espécie fornece uma via alternativa para o fluoróforo de retornar do estado excitado ao estado fundamental, ou seja, ocorre a supressão do sinal de fluorescência de um fluoróforo por uma molécula desativadora (*quencher*) por uma variedade de interações moleculares. (AFRIN et al., 2017). Estes incluem formação do complexo do estado fundamental, rearranjos moleculares, reações do estado

excitado, extinção colisional ou por transferência de energia. A supressão de sinal pode ser induzida por processo dinâmico ou estático. O *quenching* dinâmico é um mecanismo momentâneo e ocorre quando o fluoróforo, em seu estado excitado, entra em contato, por colisão, com a molécula *quencher* levando à transferência de energia, e conseqüentemente à diminuição no sinal. Por outro lado, o *quenching* estático refere-se ao processo em que há formação de um complexo não-fluorescente no estado fundamental, resultando também na redução do sinal analítico (ZHANG et al., 2009; DESPAIGNE et al., 2014).

O tipo desse mecanismo pode ser avaliado por meio de titulações fluorimétricas em diferentes temperaturas, onde mantem constante a concentração da molécula *quencher* e varia a do ligante. Caso ocorra o modo *dinâmico*, o valor da constante de Stern-Volmer, K_{SV} , será diretamente proporcional à temperatura (T), uma vez que o número de colisões aumenta quando a temperatura se eleva. De forma contrária, no modo *estático*, o aumento da temperatura ocasionará redução do valor de K_{SV} , ou seja, essas variáveis serão inversamente proporcionais, pois com o aumento da temperatura o complexo formado tende a desestabilizar, reduzindo assim o valor da constante (MOLINA-BOLÍVAR et al., 2014).

O mecanismo *quenching* pode também ser estudado através da técnica de absorção no UV-Vis, onde os espectros do DNA, do composto livre e do complexo formado são avaliados. Quando o valor de absorção do complexo é a somatória da absorção do DNA mais o composto ($A_{\text{complexo}} = A_{\text{composto}} + A_{\text{DNA}}$), tem-se um *quenching dinâmico*, uma vez que este não afeta o estado fundamental da molécula. Do contrário, se houver mudanças espectrais e nas intensidades do sinal, sendo $A_{\text{complexo}} \neq (A_{\text{composto}} + A_{\text{ctDNA}})$, indica ocorrência e *quenching estático* (ZHANG et al., 2008; SILVA et. Al., 2016b)

No presente estudo de avaliação da interação DNA-ligante, a macromolécula funciona como *quencher*, enquanto que no sistema proteína-ligante, o desativador passa a ser o ligante, uma vez que a proteína tem propriedades fluorescentes e o monitoramento da interação é feito na faixa no sinal analítico da macromolécula, como foi visto no tópico 2.5.2. A alteração na intensidade de fluorescência é, portanto, interpretada através da equação de Stern-Volmer:

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

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do quencher, $[Q]$ é a concentração do *quencher*, K_q é a taxa de extinção biomolecular, τ_0 refere-se ao tempo de vida médio do fluoróforo na ausência do extintor, geralmente igual a 10^{-8} s, e K_{SV} é a constante de extinção de Stern-Volmer, a qual pode ser obtida a partir da linearização da equação (1), onde o coeficiente angular do gráfico F_0/F vs $[Q]$ corresponde ao valor de K_{SV} (LI et al., 2011;

CHAKRABORTY; BASU, 2009; RAHMAN et al., 2017; AFRIN et al., 2017). A linearidade da equação de Stern-Volmer indica que a fluorescência de extinção tem apenas um mecanismo, dinâmico ou estático (CHAKRABORTY; BASU, 2009; DEHKHODAEI et al, 2017). O tipo do mecanismo pode ser avaliado a partir da constante K_q , onde para valores acima de $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ é indicativo de que o *quenching* ocorre preferencialmente de modo estático, enquanto que para valores inferiores, é indicativo do tipo dinâmico. Para isto pode-se utilizar a equação (1) ou, de forma mais simplificada, a equação (1.1) (DIMIZA et al., 2011; RAHMAN et al., 2017; QAIS et al., 2017).

$$k_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0} \quad \text{Equação (1.1)}$$

2.5.2.2. Constante de ligação (K_b)

Através da espectroscopia de fluorescência molecular, é também possível avaliar a magnitude da interação e a estequiometria do complexo supramolecular formado, n . Estes parâmetros podem ser calculados a partir da equação 2:

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{Equação (2)}$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença de *quencher*, n é o número de sítios, K_b a constante de ligação e $[Q]$ é a concentração do *quencher*. Os valores de n e K_b podem ser obtidos a partir do coeficiente angular e linear, respectivamente, do gráfico de $\log (\Delta F/F)$ versus $\log [Q]$ (CHAKRABORTY; BASU, 2009; REHMAN et al., 2015; AFRIN et al., 2017).

2.5.2.3. Determinação do modo de Ligação DNA-ligante

É sabido que a interação por intercalação, via *groove* e eletrostática são as três principais interações não covalentes que desempenham um papel importante na interação composto-DNA. Para elucidar qual modo de ligação é preferencial em cada interação, utiliza-se alguns métodos analíticos baseados em propriedade de emissão de fluorescência, como titulação de extinção com iodeto de potássio e ensaios de competição com brometo de etídio.

2.5.2.3.1. Ensaio de extinção com iodeto de potássio (KI)

O teste realizado com o KI é geralmente usado, quando a molécula, em estudo, possui propriedades de fluorescência. Este ensaio indica a possível localização que o fármaco interage com o DNA, se ocorre na parte externa ou interna do mesmo (REHMAN et al., 2015).

Isso é possível porque os íons iodeto são capazes de promover o *quenching* dinâmico em fluoróforos quando em solução aquosa, mas, para isso, o ligante, ou seja, a molécula em estudo, precisa encontrar-se acessível para que interaja com ele. Como os íons iodetos são carregados negativamente, este será repellido pelo esqueleto de fosfato do DNA caso o ligante encontre-se intercalado à macromolécula, estando assim bem protegido entres os pares de bases nitrogenados. Por outro lado, se o modo de ligação for preferencialmente via *groove* ou eletrostático, o ligante estará mais acessível aos íons iodeto, o que facilitará a colisão e, assim, ocorrerá a supressão de fluorescência (REHMAN et al., 2015).

Para avaliar esse mecanismo, faz-se a análise quanto a acessibilidade do fluoróforo ao *quenching* KI. Para isso, é usada a equação de Stern-Volmer (eq. 2) seguido da comparação dos valores de K_{SV} da solução de ligante mais KI na ausência e presença do DNA. Dessa forma, para intercalação os valores de K_{SV} tendem a ser menores em sistemas contendo DNA, enquanto que para ligação por *groove* ou eletrostático geralmente são maiores (REHMAN et al., 2015).

2.5.2.3.2. Ensaios de competição com brometo de etídio (BE)

O modo de ligação DNA-ligante também pode ser avaliado a partir do uso de sondas fluorescentes, as quais possuem seu modo de ligação já bem estabelecido. Nesse sentido, geralmente é realizado o teste de deslocamento competitivo usando corantes fluorescentes que possuem seu modo de ligação ao DNA já bem definido. Como resultado, mudanças na emissão de fluorescência do complexo corante-DNA são interpretados (REHMAN et al., 2015).

No estudo de interação, é normalmente utilizado o corante brometo de etídeo (BE), o qual possui estrutura planar e liga-se ao DNA por intercalação ocasionando em sinal de fluorescência elevado. Se, portanto, for adicionado ao sistema uma molécula, cujo modo de ligação é também intercalante, ela competirá com o BE o que ocasionará no deslocamento do mesmo e, conseqüentemente causará redução considerável do sinal analítico. Do contrário, nenhuma mudança será observada (TU et al., 2005; REHMAN et al., 2015; AHMAD; AHMAD, 2018). O grau da extinção de fluorescência do sistema BE-DNA pode ser usada para determinar a extensão da intercalação entre a molécula e a macromolécula (REHMAN et al., 2015). De forma semelhante, outras sondas são usadas para avaliar os demais modos de ligação. A exemplo a Hoechst 33258 e DAPI, as quais ligam-se via *groove* ao DNA (BASU; KUMAR, 2013).

2.5.2.4. Parâmetros termodinâmicos

As interações ligantes-DNA e composto-proteína são também avaliadas com base em alguns parâmetros termodinâmicos os quais fornecem informações necessárias para compreender as forças moleculares responsáveis pela formação do complexo. A partir de ensaios em diferentes temperaturas, é possível calcular a variação da entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) aplicando a linearização da equação (3) (equação de Van't Hoff), obtendo assim gráfico $\ln K_b$ vs $1/T$ (SILVA et al., 2016a; CHAKRABORTY; BASU, 2009; ZHANG et al., 2009).

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação (3)}$$

onde K_b representa a constante de ligação, T a temperatura em Kelvin (K) e R a constante do gás ideal ($8,314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). A espontaneidade da reação é avaliada calculando a variação da energia livre de Gibbs, a qual pode ser estimada através da equação 4 ou 5, fazendo-se em função de ΔH e ΔS ou de K_b (ZHANG et al., 2009; SILVA et al., 2016a; SURYAWANSHI et al., 2016).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (4)}$$

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad \text{Equação (5)}$$

As forças de interação entre uma molécula pequena e macromolécula incluem ligações de hidrogênio, força van der Waals, força hidrofóbica, interações eletrostáticas, dentre outras (HAQ, 2002). De modo geral, quando a interação macromolécula-ligante acontece preferencialmente por forças eletrostáticas, tem-se $\Delta H < 0$ (ou $\Delta H \approx 0$) e $\Delta S > 0$, caso ocorra por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, o processo está associado a $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$, enquanto que interações hidrofóbicas são consideradas a principal força quando $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ (CARUSO et al, 2012; SUN et al., 2014; REHMAN et al., 2015).

Normalmente, a ligação via intercalação de pequenas moléculas ao DNA é estabilizada por interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals, enquanto que a interação via *groove* ocorre principalmente através de interações hidrofóbicas (REHMAN et al., 2015).

3. JUSTIFICATIVA GERAL DO ESTUDO PROPOSTO

Estudos quantitativos focados nas interações DNA-ligantes e proteína-ligantes, tem sido uma ferramenta importante para o *design* de fármacos mais eficientes e com menos efeitos colaterais, direcionados ao DNA, pois ajudam a compreender o mecanismo de ação de moléculas bioativas em nível molecular, como também sua biodistribuição. Por esse motivo, o presente trabalho traz um estudo de interação com compostos sintéticos derivados das β -carbolinas, os quais possuem atividades anticâncers contras diversas linhagens tumorais humanas.

4. OBJETIVO GERAL DO ESTUDO PROPOSTO

Avaliar, de modo quantitativo, a interação do ctDNA (DNA, *Calf thymus*) e da proteína, albumina de soro bovino (BSA), com derivados sintéticos de alcaloide β -carbolínicos biologicamente ativos, por meio de técnicas espectroscópicas e estudos teóricos, bem como a correlação da magnitude da interação (K_b) com suas respectivas atividades biológicas.

4.1. Objetivos Específicos

- Determinar os principais parâmetros de ligação e termodinâmicos entre quatro derivados sintéticos β -carbolínicos com ctDNA (*Calf thymus*) e BSA por fluorescência molecular em condições fisiológicas simuladas;
- Avaliar o processo de interação por UV-vis para o sistema β -carbolínico e ctDNA;
- Determinar o modo de ligação DNA-ligante, empregando ensaios com o iodeto de potássio e estudos de competição com brometo de etídio;
- Correlacionar os valores das constantes de ligação (K_b) obtidas com os valores de IG_{50} visando avaliar o possível mecanismo de ação da atividade anticâncer;
- Realizar estudos teóricos entre os quatro derivados sintéticos β -carbolínicos com a BSA.

5. EXPERIMENTAL

5.1. Reagentes e preparo das soluções

Todos os reagentes utilizados foram com grau de pureza analítica, incluindo o DNA (*Calf thymus*, ctDNA) tipo I na forma de fibras (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e a albumina de soro bovino (BSA). Por outro lado, os compostos β -carbolínicos a serem estudados, foram sintetizados pelo grupo de pesquisa de Produtos Naturais: Estrutura, conformação e atividade biológica do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, sob coordenação da Prof^a Dra. Maria Helena Sarragiotto.

As soluções estoque dos compostos β -carbolínicos foram preparadas pela solubilização de 1,0 mg da substância em 2,0 mL de dimetilsulfóxido – DMSO e, posteriormente armazenadas sob refrigeração a 4°C em tubos criogênicos (SILVA et al., 2016a).

A solução tampão (Tris 50 mM, NaCl 100 mM e pH = 7,4) foi preparada pela pesagem de 3,0285 g de tris (hidroximetil)aminometano TRIS (Sigma, Brasil) e 2,922 g de cloreto de sódio NaCl (Vetec, Brasil) e solubilizado em 500 mL de água ultrapura. Para o ajuste do potencial hidrogeniônico (pH) para 7,4 utilizou-se ácido clorídrico diluído – HCl (Merck, Alemanha).

Para o preparo da solução estoque de ctDNA (*Calf thymus*), pesou-se aproximadamente 3,5 mg da macromolécula e solubilizou em 7,0 mL de solução tampão Tris (50 mM, pH= 7,4) e NaCl (100mM). A solução foi armazenada em frascos e deixada sob agitação durante 24h e, em seguida, para garantir uma maior solubilidade e homogeneidade da solução, ela foi levada a um banho ultrassom (Quimis modelo Q335D, Brasil), por 30 min, e guardadas sob refrigeração a 4°C (SILVA et al., 2016a). Já para a solução estoque da proteína albumina de soro bovino (BSA), foram pesados 10 mg e solubilizados em 10,0 mL de solução tampão (Tris 50 mM, NaCl 100 mM e pH = 7,4). Em seguida, foi armazenada sob refrigeração a 4°C.

Para o preparo da solução de iodeto de potássio (0,2 mol L⁻¹) foi pesado 0,8295 g de KI (Sigma Aldrich, USA) e solubilizado em 25 mL de água ultrapura. Para o preparo da solução estoque de brometo de etídio (2,0 mM) pesou-se 0,0016 g do brometo de etídio (Sigma Aldrich, USA) e solubilizou-se em 2,0 mL de água ultrapura (2,0 mM).

5.2. Equipamentos utilizados

Nos estudos realizados por fluorescência molecular, os espectros de fluorescência no estado estacionário foram obtidos por meio de um espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF-5301PC, Japão) equipado com uma lâmpada de xenônio de 150 W. As medidas espectrofluorimétricas foram realizadas utilizando uma cubeta de quartzo com capacidade de 4 mL e 1,0 cm de caminho óptico.

Os espectros de absorção foram obtidos empregando um espectrofotômetro Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) de duplo feixe equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e capacidade de 4 mL.

Para os ajustes de pH utilizou-se um eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro Gehaka (modelo PG 1800, Brasil). As massas dos reagentes foram medidas em balança analítica eletrônica Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de 0,1 mg (para os compostos β -carbolínicos) e balança analítica Mettler Toledo-AG245 com precisão de 0,01 mg.

5.3. Procedimentos

5.3.1. Determinação da concentração do ctDNA (*Calf thymus*) e albumina de soro bovino (BSA)

Para determinar a concentração da solução estoque do ctDNA, fez-se uma diluição na proporção de 1:100 e, a partir da medida no espectrofotômetro, calculou por meio da equação de Lambert-Beer, utilizando o valor da absorvância da solução em 260 nm e o coeficiente de extinção de 6600 L mol^{-1} . Em seguida verificou se a solução estava livre de proteína por meio da razão do sinal de absorvância a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), obtendo valores entre 1,8-1,9 (SAVARIZ et al., 2014).

Por outro lado, para a concentração da solução estoque da BSA, a diluição foi feita na proporção de 1:5. O cálculo foi realizado por meio da equação de Lambert-Beer, utilizando o valor da absorvância da solução em 280 nm e o coeficiente de extinção de $44.500 \text{ L mol}^{-1}$.

5.3.2. Estudo da interação ctDNA-ligante por fluorescência molecular e UV-vis

O estudo da interação entre o ctDNA e os compostos β -carbolínicos foi realizado por meio de titulações espectrofluorimétricas com base no monitoramento do sinal de emissão do analito, onde se manteve constante a concentração do ligante ($10 \mu\text{M}$) e aumentou, gradativamente, a quantidade de ctDNA ($0 - 300 \mu\text{M}$). Para o estudo no UV-Visível, levou-se em consideração o sinal de absorvância do composto ($10 \mu\text{M}$) na presença e na ausência de ctDNA ($0 - 20 \mu\text{M}$), assim como a absorvância do DNA na forma livre ($10 \mu\text{M}$). O tempo de

incubação, antes das medições, foram de 1 hora e as medidas analíticas foram realizadas à temperatura ambiente.

5.3.3. Estudo da interação proteína-ligante por fluorescência molecular

O estudo da interação entre a proteína e os compostos β -carbolínicos foram realizados por meio de titulações espectrofluorimétricas com base no monitoramento do sinal de emissão da proteína (280 nm), onde se manteve constante a concentração da macromolécula (2 μ M) e variou, progressivamente, a quantidade dos compostos (2 – 45 μ M). As medidas foram realizadas sem tempo de incubação à temperatura ambiente.

5.3.4. Avaliação do modo de ligação com iodeto de potássio (KI)

Para avaliar o modo de ligação dos compostos com ctDNA, manteve-se constante a concentração dos compostos β -carbolínicos (10 μ M) e variou-se, progressivamente, a concentração de iodeto de potássio (0,02 – 0,22 mol L⁻¹) na presença e ausência de ctDNA em concentração fixa (50 μ M).

5.3.5. Estudo de competição com brometo de etídio (BE)

O estudo de competição com brometo de etídio foi realizado mantendo constante do ctDNA (100 μ M) e do BE (10 μ M) e, aumentando progressivamente a concentração dos compostos (50 – 400 μ M). O monitoramento do sinal de fluorescência foi realizado no comprimento de onda de emissão do complexo BE-ctDNA (596 nm) quando excitado no $\lambda_{exc} = 525$. (REHMAN et al. 2015).

5.3.6. Estudo Teórico: *Docking* molecular

Os estudos por *docking* molecular foram realizados em colaboração com o professor Thiago Mendonça de Aquino, apenas para interação entre os compostos β -carbolinas e a albumina de soro bovino (BSA). Assim todas as estruturas foram desenhadas usando o Software *MarvinSketch* e, em seguida foram calculadas as conformações 3D. Os modelos moleculares foram otimizados usando método quântico do software *Gabedit*. A estrutura modelo da BSA foi obtida a partir do *Protein Data Bank* (PDB ID: 4SF5). Todas as estruturas foram preparadas para os ensaios de *docking* usando o módulo *Dock Prep* do software Chimera. Os ensaios foram então efetuados usando o software *Autodock vina*.

Para o *docking* com BSA foram realizadas duas análises nos domínios I e II e, o domínio que obteve os melhores valores de energia livre de Gibbs, foi utilizado para construção do modelo molecular para BSA. Por meio do Software *DiscoveryStudio* foi verificado os tipos de interações intermoleculares de cada molécula com a BSA, podendo ser expresso no diagrama 2D de interações. Foi realizada uma análise da escala de hidrofobicidade do receptor no sítio de interação, usando o *Discovery studio*.

5.3.7 Tratamento dos dados

Após a aquisição dos dados, todos os resultados foram tratados empregando o programa Originlab versão 9.0 (Northampton, USA) e o Excel 2013 (Microsoft Office), onde foi possível obter informações para o cálculo dos parâmetros de ligação dos compostos ao ctDNA e BSA. Para desenhos das estruturas foi utilizado o ChemDraw Ultra 12.0.

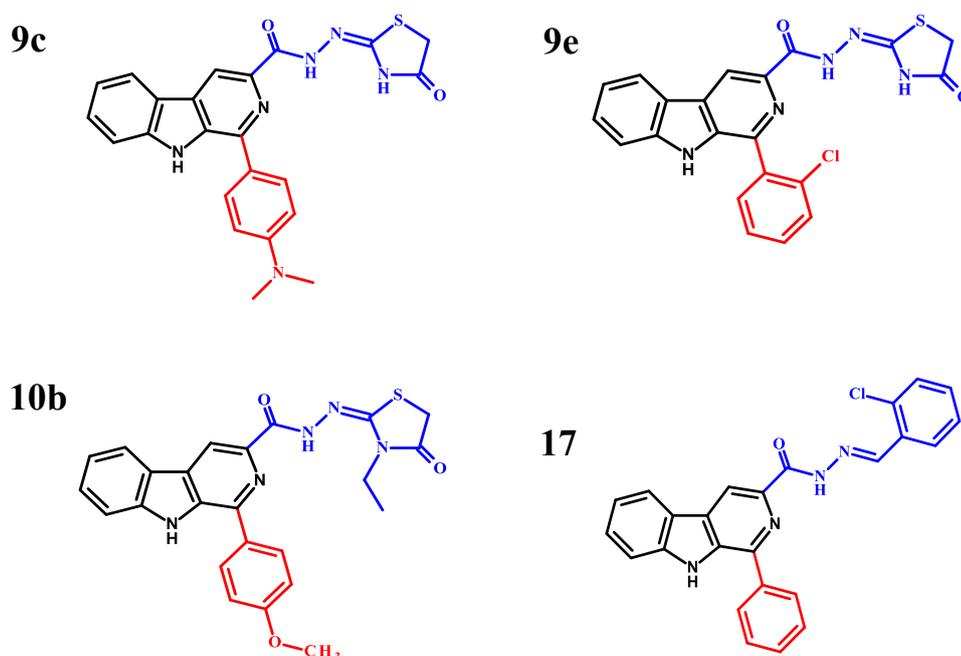
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Considerações iniciais

O presente trabalho avaliou a interação de quatro compostos β -carbolínicos com o ctDNA (*Calf Thymus*) e com a proteína albumina de soro bovino (BSA). Ambos os modelos de macromoléculas são amplamente utilizados para estudos de interações, uma vez que o ctDNA é similar ao DNA de placenta humana, com as seguintes proporções das bases: para ctDNA se tem AT (58,1 %), CG (41,9 %) e, para DNA de placenta humana tem AT (58%), CG (42%) (SILVA et al., 2016a). Por sua vez, a BSA é similar à albumina de soro humano (HSA), onde a percentagem de sequências idênticas de aminoácidos é de aproximadamente 80% (METI et al., 2014).

As estruturas químicas dos compostos avaliados estão dispostas na Figura 21 enquanto que as respectivas atividades anticâncers são descritas na Tabela 1, sendo consideradas ativos os compostos com valores de $IG_{50} < 100 \mu M$, utilizando como controle positivo a doxorrubicina. As moléculas foram sintetizadas e cedidas pelo grupo de pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Estadual de Maringá, liderado pela Professora Maria Helena Sarragiotto (BARBOSA et al., 2016). Na síntese, o núcleo β -carbolina foi substituído nas posições 1 (em vermelho) e 3 (em azul) do anel carbolínico.

Figura 21 - Estruturas químicas dos derivados β -carbolínicos avaliados.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Tabela 1 – Valores de IG_{50} (em μM) dos compostos β -carbolínicos avaliados frente a 7 linhagens de células tumorais humanas.

Compostos	Glioma (U251)	Mama (MCF7)	Ovário Resistente (NCI/ADR-RES)	Rim (786-0)	Pulmão (NCI-H460)	Ovário (OVCAR-3)	Cólon (HT29)
9c	NT	2,93	0,48	1,60	1,44	1,27	5,04
9e	NT	1,42	>100	6,10	3,85	0,01	10,81
10b	1,95	6,52	12,16	NT	8,56	6,52	9,62
17	NT	6,13	NT	2,16	4,57	2,84	1,26

NT = não testado; IG_{50} : concentração do composto necessária para promover 50% de inibição do crescimento celular após 48h de tratamento, comparando com células crescendo sem tratamento.

Fonte: BARBOSA et al., 2016.

De acordo com Barbosa et al. (2016) dentre os compostos avaliados, o **9c** foi o mais ativo, obtendo atividade frente a todas as linhagens de células cancerígenas avaliadas com valores de $IG_{50} < 5,5 \mu M$, além de obter uma maior afinidade com o ctDNA, expressa pelo maior valor da constante de ligação (K_b). Por esse motivo, ele foi usado como modelo para apresentação dos resultados, uma vez que todos os compostos apresentaram perfil quanto aos resultados espectroscópicos similares. Adicionalmente, segundo os autores, o composto **9e** foi considerado o mais seletivo, com $IG_{50} = 0,01 \mu M$ para ovário, ao considerar a magnitude do valor de IG_{50} quando comparado aos demais.

6.2. Avaliação da interação DNA-ligante

A interação DNA-ligante foi avaliada por meio das técnicas de espectroscopia de absorção no UV-Vis e fluorescência molecular, com base nas mudanças espectrais que ocorrem após a ligação do composto com a macromolécula (HU et al., 2013). Por meio destes estudos, foi possível inferir sobre a formação do complexo e alguns parâmetros, tais como: o mecanismo de *quenching* preferencial, a constante de ligação (K_b), constante do *quenching* (K_{sv}), estequiometria da reação, o modo de ligação preferencial, constante aparente (K_{app}), além dos parâmetros termodinâmicos, ΔH , ΔS e ΔG .

6.2.1. Estudos por espectroscopia fluorescência molecular

A interação DNA-ligante foi avaliada por meio da técnica de fluorescência molecular, a partir da qual obteve-se informações a respeito dos parâmetros de ligação com ctDNA. Esta avaliação foi possível porque os compostos β -carbolínicos analisados possuem grupos funcionais aromáticos, os quais apresentam fluorescência intensa, enquanto que o sinal analítico do DNA é desprezível (REHMAN et al., 2015).

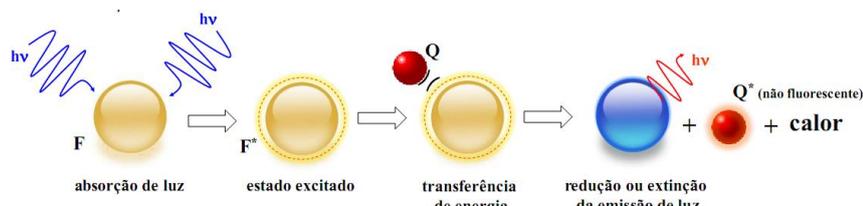
6.2.1.1 – Determinação dos parâmetros de ligação com o DNA

A partir da capacidade de emissão de fluorescência destes compostos, foi realizada uma titulação fluorimétrica, onde manteve-se constante a concentração do composto e, se variou, progressivamente, a concentração do ctDNA.

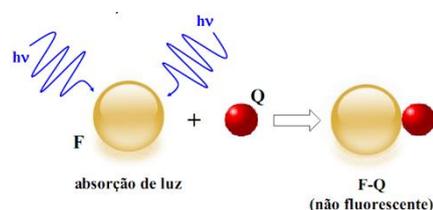
Inicialmente, foi verificado que os compostos emitiram na faixa de 409 a 438 nm, quando excitados entre 260 a 275 nm. Esses valores do comprimento de onda estão de acordo com outras β -carbolicinas já descritas na literatura em estudos similares (SHARMA et al., 2016; SILVA et al., 2016b; KOVVURI et al., 2018). Por seguinte, observou-se que, à medida que a concentração de ctDNA aumentava no meio, a intensidade do sinal de fluorescência reduzia gradualmente. Este perfil espectral caracteriza o processo de *quenching*, onde a molécula desativadora (ctDNA) interage com o fluoróforo (composto) levando a diminuição da radiação emitida. Segundo Despaigne et al. (2014), este processo pode ocorrer de forma dinâmica ou estática. No *quenching* dinâmico, a transferência de energia é efetuada por meio de colisões entre as moléculas e não há formação de complexo. Por outro lado, no *quenching* estático, a redução de energia de um fluoróforo se dá pela formação de um complexo, não fluorescente, no estado fundamental (Figura 22).

Figura 22 – Representação do processo de a) *quenching* dinâmico e b) *quenching* estático.

a)



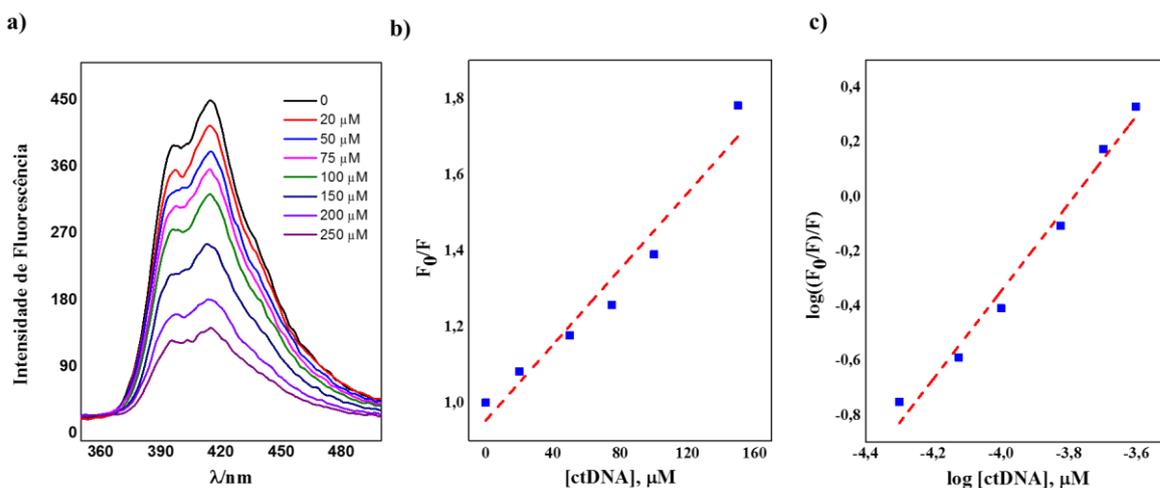
b)



Fonte: SILVA et al., 2016a.

O perfil espectral da redução do sinal analítico, portanto, pode ser observado na Figura 23a, a qual refere-se ao composto **9c**, porém, este comportamento foi obtido para os demais compostos avaliados.

Figura 23 - Espectros obtidos para avaliação da interação ctDNA-ligante por fluorescência molecular para o composto **9c**. **a)** Espectro do composto (10 μM) com adições crescentes de ctDNA; **b)** Curva para cálculo da constante Stern-Volmer, K_{SV} , (processo de *quenching*); **c)** Curva logarítmica para cálculo da constante de ligação (K_b) e n do complexo ctDNA-composto.



Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Para a análise quantitativa deste evento, primeiramente foi calculado a constante de supressão de fluorescência (K_{SV}), a qual está associada à alteração na intensidade de fluorescência, sendo esta interpretada por meio da linearização da equação de Stern-Volmer (eq. 1), onde o K_{SV} refere-se ao coeficiente angular do gráfico F_0/F vs [ctDNA] (Figura 23b) (REHMAN et al., 2015; AFRIN et al., 2017). O perfil espectral linear, indica, portanto, que o processo de extinção de fluorescência tem apenas um mecanismo, dinâmico ou estático (CHAKRABORTY; BSAU, 2009; DEHKHODAEI et al., 2017). Dessa forma, para verificar qual mecanismo governa a interação dos compostos com o ctDNA, fez-se a avaliação da taxa de extinção biomolecular, K_q , por meio da equação (1.1). Os valores obtidos são apresentados na Tabela 2.

De forma similar, a constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n), foram obtidos por meio da linearização da equação (2), sendo esta expressa pela curva $\log[(F_0 - F)/F]$ vs $\log[\text{ctDNA}]$ (Figura 23c), onde os valores de K_b e n podem ser obtidos a partir do coeficiente linear e angular da reta, respectivamente. Para ambos os gráficos, tem-se que F_0 e F são as intensidades de fluorescência do ligante na ausência e na presença do *quencher*, respectivamente, e $[Q]$ é a concentração do *quencher* (ctDNA) (SILVA et al., 2016b). Na Tabela 2 encontram-se os valores dos parâmetros referente ao processo de *quenching* e ligação para todos os compostos β -carbólico avaliados.

Tabela 2 – Parâmetros de interação dos derivados de β -carbolinas com o ctDNA.

Composto	Parâmetro de Stern-Volmer		Parâmetros de ligação			
	K_{SV} (10^3 L mol^{-1})	r	K_q ($10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	K_b (10^4 L mol^{-1})	n	r
9e	$7,04 \pm 0,29$	0,9949	7,04	$2,45 \pm 0,01$	$1,14 \pm 0,03$	0,9971
9c	$3,73 \pm 0,22$	0,9757	3,73	$119,0 \pm 0,1$	$1,60 \pm 0,11$	0,9911
10b	$8,31 \pm 0,23$	0,9977	8,31	$9,82 \pm 0,01$	$1,29 \pm 0,03$	0,9983
17	$3,92 \pm 0,06$	0,9985	3,91	$7,85 \pm 0,01$	$1,32 \pm 0,05$	0,9957

Fonte: elaborado pela autora, 2018.

É possível observar na Tabela 2 que a interação dos compostos β -carbolínicos avaliados apresentaram valores de K_{SV} variando na faixa de $3,73$ a $8,31 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$, enquanto que os valores de K_q variaram na faixa de $3,73$ a $8,31 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tabela 2) e, portanto, indicando que o mecanismo preferencial de extinção da fluorescência dos compostos pelo ctDNA é o *quenchig* estático, uma vez que $K_q > 2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (SILVA et al., 2016b; DAS et al., 2018). Dessa forma, há a formação do complexo supramolecular que, por sua vez, leva à diminuição da concentração de composto livre no meio e, conseqüentemente, ocorre a redução do sinal analítico (SHI et al., 2015). Os valores de K_{SV} e K_q estão de acordo com dados reportados na literatura para outros derivados de β -carbolinas (WU et al., 2007; SILVA et al., 2016b).

Adicionalmente, pôde-se observar que o número de sítios de ligação (n) para os compostos avaliados ficaram aproximadamente igual a 1 (Tabela 2), indicando a razão estequiométrica de 1:1 (ctDNA: ligante), exceto para o ligante **9c** que possivelmente é de 1:2. Além disso, foi possível avaliar a força da interação DNA-ligante, expressa pela constante de ligação (K_b), onde se observou que esta variou de $2,45 \times 10^4$ a $1,19 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$, indicando assim alta afinidade com a macromolécula. Estes resultados estão de acordo com valores relatados na literatura para outros compostos β -carbolínicos (Figura 19), os quais variaram na ordem de 10^4 a 10^6 (XIAO et al. 2001; NAFISI et al, 2010; SILVA et al., 2016b; NASCIMENTO, 2017), incluindo o trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa, publicado por Silva et al., (2016b), onde foi relado a força da ligação dos compostos similares com o ctDNA na faixa de $0,033 \times 10^4$ a $1,82 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$.

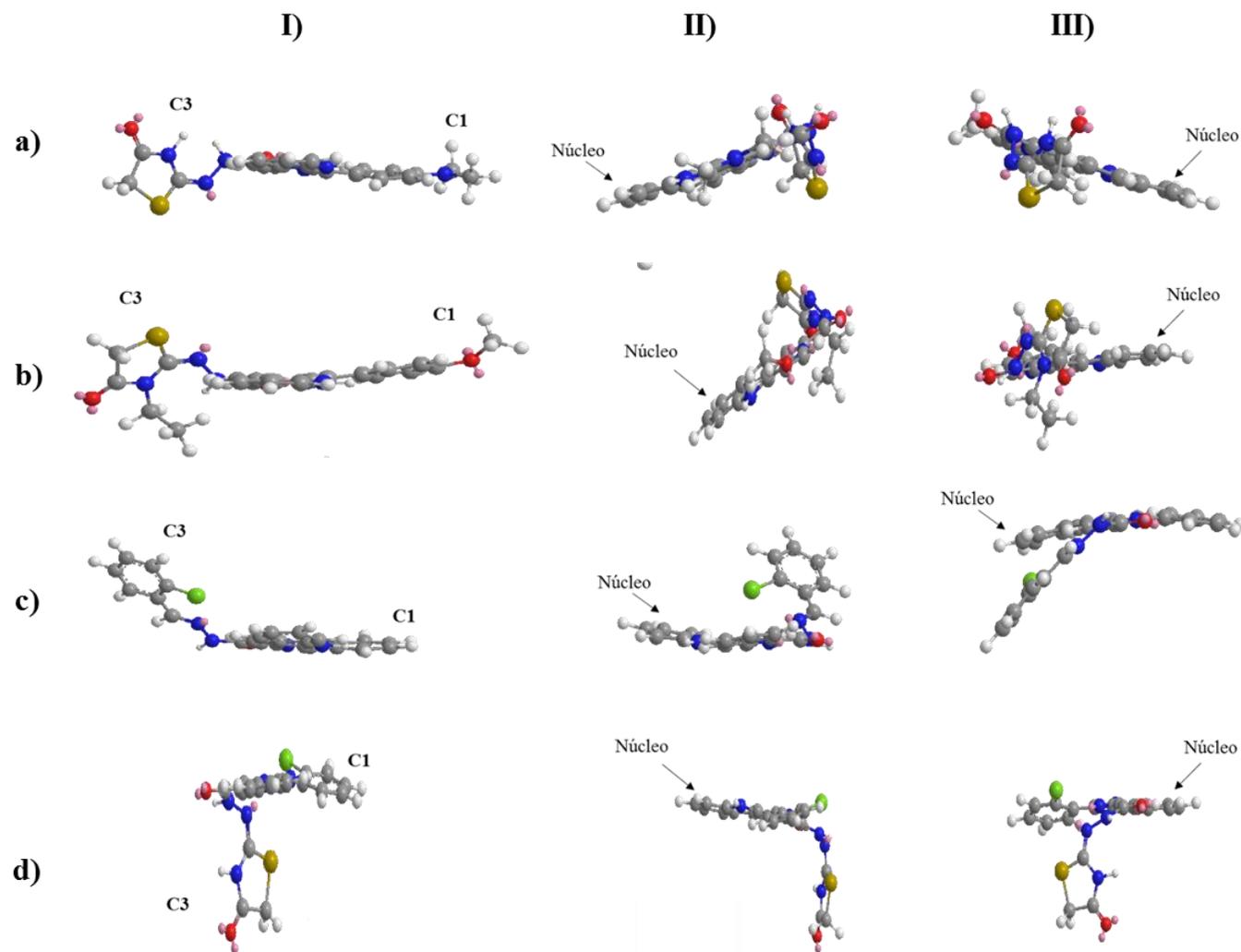
O maior valor da constante K_b encontrada foi para o composto **9c** ($119 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$), possivelmente devido à presença do grupo substituinte *N,N*-dimetilnilina na posição C1 do anel β -carbolina, levando ao aumento da polaridade da molécula, caso esteja protonado na condição do pH experimental (7,40). Esta protonação pode ocorrer devido ao aumento do valor

do pKa do grupo substituinte ocasionado pela interação com a macromolécula. Assim, a presença da carga positiva em **9c** levaria a uma maior interação entre o ligante e o DNA, devido a contribuição de interações eletrostáticas com grupos fosfato da cadeia lateral. Moléculas como brometo de etídio e acridina orange apresentam perfil similar, pois, possuem carga positiva e forte interação com a macromolécula via intercalação e forças eletrostáticas (NAFISI et al., 2007; SILVA et al., 2016b). Adicionalmente, estes resultados são compatíveis com trabalhos reportados na literatura para moléculas contendo grupo $-N(CH_3)_2$ na posição 1 no anel carbolina (SAFARIZ et al., 2014; SILVA et al., 2016b).

O composto **10b** possui a segunda maior constante de ligação e apresenta um grupo metoxila no anel de aromático ligado ao núcleo β -carbolina, enquanto que o composto **17** possui o substituinte fenil em C1 e apresentou valor de K_b igual a $7,85 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, e **9e** contendo o substituinte *o*-cloro fenil em C1 demonstrou o menor valor da constante de ligação ($2,45 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$). De acordo com SILVA et al. (2016b), o menor valor de K_b associado ao composto **9e** pode ser atribuído a presença do átomo de cloro, o qual possui densidade eletrônica negativa, levando a redução da afinidade entre o composto e o DNA em função da repulsão com os grupos fosfatos, também negativos, presentes nas fitas do DNA. Resultados semelhantes foram relatados por SILVA et al. (2016a) para derivados β -carbolínicos com as mesmas substituições em C1.

Considerando que os derivados β -carbolínicos normalmente atuam como intercalantes (CAO et al., 2007; ASHOK et al., 2015; SILVA et al., 2016b), segundo a literatura, a planaridade de uma molécula é um fator importante para promover uma interação eficiente via intercalação com DNA, onde estruturas mais planares tendem a obter uma melhor afinidade (NAFISI et al., 2010; CHOURASIYA et al., 2012). Neste trabalho, a ordem decrescente para os valores de K_b obtida: **9c** > **10b** > **17** > **9e**, a qual pode estar associada a planaridade das moléculas avaliadas. Portanto, se observou que o ligante **9c** apresenta uma estrutura mais planar quando comparada aos demais compostos enquanto que, **9e**, o qual possui o menor valor de K_b , apresentou a uma menor planaridade (Figura 24). Vale ressaltar que esta avaliação foi feita por meio do programa ChemDraw Ultra 12.0, o qual considera como meio o vácuo.

Figura 24 – Planaridade dos compostos **a)** 9c; **b)** 10b; **c)** 17; **d)** 9e. Estruturas químicas com os seguintes grupos projetados para frente: **I)** núcleo β -carbolina; **II)** substituinte em C1; **III)** substituinte em C3.



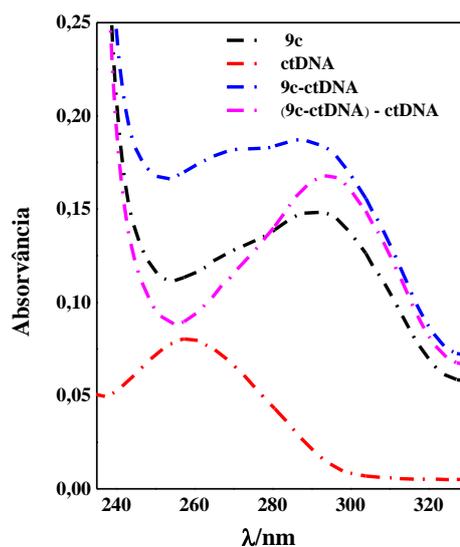
Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Segundo Wu et al. (2007), valores de K_b na ordem de 10^3 a 10^6 representa uma forte interação entre o composto e o DNA. Além disso, a maioria dos agentes anticâncer, ao interagir com o DNA, possuem K_b na ordem de 10^4 a 10^7 , a exemplo dos compostos intercalantes o antibiótico daunomicina ($7,0 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$), utilizado no tratamento de vários tipos de câncer e para leucemia (IHMEIS; OTTO, 2005; CESCINETTO et al., 2013) e a doxorubicina ($2,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$), eficaz para diversos tipos de câncer, incluindo leucemia aguda e câncer de mama (AGUDELO et al., 2014). Dessa forma, é possível afirmar que os compostos avaliados interagem fortemente com o DNA, com magnitude de forças similares a alguns fármacos anticancerígenos clinicamente utilizados, como pode ser observado na Figura 3.

6.2.2. Estudos por espectroscopia de absorção no UV-vis

A espectroscopia no UV-visível é uma técnica bastante utilizada na avaliação da interação do DNA-ligante. A formação deste complexo supramolecular pode ser analisada por meio das mudanças espectrais que ocorrem no máximo de absorção da molécula avaliada, na presença e ausência do DNA (REHMAN et al., 2015; AFRIN et al., 2017; AHMAD; AHMAD, 2018). A Figura 25 apresenta o espectro avaliado, onde os valores de máxima absorção do composto **9c** (em preto) e do ctDNA (em vermelho) estão estabelecidos em 291 e 260 nm, respectivamente.

Figura 25 – Avaliação da interação ctDNA-ligante por absorção no UV-vis: Composto **9c** (5 μM) e ctDNA (10 μM).



Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Portanto, observa-se que ocorreu mudanças espectrais no máximo de absorção do composto ao adicionar ctDNA ao sistema, expresso pelo aumento do sinal analítico (Figura 25, em azul), caracterizando assim o efeito hipercrômico, como também um leve deslocamento do comprimento de onda para menores valores, com variação de 3 nm, sendo este um efeito hipsocrômico (JANNESARI et al., 2013; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; SILVA et al., 2016a). Observa-se também alterações na banda do ctDNA, o que pode ser atribuído a mudanças que ocorrem na estrutura do DNA ocasionadas pela interação com o composto por meio de ligações não covalentes (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; QAIS et al., 2017). Dessa forma, sugere-se que essas β -carbólicas podem interagir efetivamente com o ctDNA. Por conseguinte, verificou se esta interação ocorreu devido a colisões ou por formação do complexo ctDNA-ligante, ou seja, se houve *quenching* dinâmico ou estático, respectivamente.

Embora o processo de *quenching* esteja associado à redução da emissão de fluorescência de um fluoróforo na presença de outra molécula (desativadora), o mecanismo pode ser avaliado por espectroscopia de absorção na região do UV-vis. Dessa forma, ao avaliar os espectros de absorção do composto livre, do ctDNA e do possível complexo formado, o valor da absorvância do complexo foi diferente do da somatória da absorção do ctDNA mais o composto ($A_{\text{complexo}} \neq (A_{\text{composto}} + A_{\text{ctDNA}})$), caracterizando assim o mecanismo de *quenching* estático. Dessa forma, a $\Delta A \neq A_{\text{complexo}} - (A_{\text{composto}} + A_{\text{ctDNA}}) \neq 0$ (Tabela 3), sendo este um indicativo de que ocorreu alteração no estado fundamental da molécula ocasionado pela formação do complexo (WU et al., 2011; SILVA et al., 2016b; MARQUES et al., 2018), uma vez que o *quenching* dinâmico só afeta o estado excitado das moléculas e, portanto, não ocasiona mudanças no espectro de absorção.

Tabela 3 – Variação da máxima absorvância entre o complexo DNA-ligante e o somatório das absorvâncias do ligante e DNA livres.

Composto	A_{composto}	A_{ctDNA}	A_{complexo}	ΔA
9c	0,1482	0,0804	0,1872	-0,0414
9e	0,2244	0,0804	0,2362	-0,0686
10b	0,1764	0,0835	0,1869	-0,0730
17	0,1419	0,0835	0,1744	0,0510

Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Ao efetuar a análise através do perfil espectral, o espectro da diferença (Figura 25, em rosa) entre o valor de absorção do complexo (**9c**-ctDNA) e a absorção do ctDNA, não é sobreponível ao espectro do composto livre (Figura 25, em preto), sendo este o perfil do

mecanismo de *quenching* estático, com formação do complexo não fluorescente (SILVA et al., 2016b; DAS et al., 2008).

Sendo assim, é possível afirmar que houve a formação do complexo supramolecular, DNA-composto, preferencialmente por *quenching* estático. Esse comportamento foi observado para todas as moléculas avaliadas e está de acordo com o trabalho relatado por SILVA et al., (2016b). Dessa forma, estes resultados confirmam os obtidos na análise por fluorescência molecular.

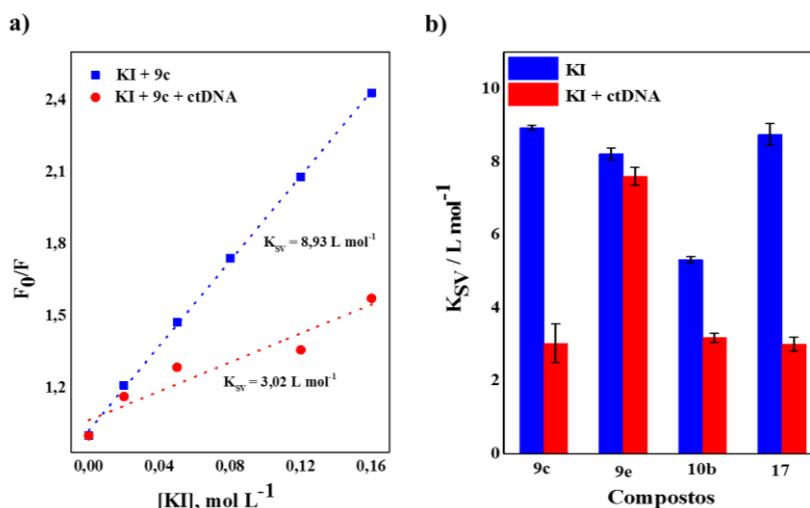
6.2.3. Avaliação do modo de ligação

Os principais modos de ligação não covalente, entre pequenas moléculas e o DNA são três: intercalação, via *groove* e eletrostático. Portanto, para determinar qual modo de ligação preferencial os compostos β -carbólicos avaliados ligam-se ao DNA, foi realizado o estudo por meio da avaliação do efeito *quenching* do KI e por competição com brometo de etídio.

6.2.3.1. Estudo com iodeto de potássio (KI)

Para avaliar o mecanismo de ligação por meio do estudo com o iodeto de potássio (KI), verifica-se a acessibilidade do *quenching* KI ao fluoróforo (compostos avaliados). Para isso, é utilizada a equação de Stern-Volmer (equação 1) seguido da comparação dos valores de K_{SV} da condição do ligante com o KI na ausência e presença do ctDNA. Os resultados para este ensaio podem ser observados na Figura 26.

Figura 26 – Avaliação do modo de ligação DNA-ligante por meio de ensaios com KI (0,02 – 0,22 mol L⁻¹). **a)** Gráfico Stern-Volmer (determinação de K_{SV}) na ausência e presença do ctDNA (50 μ M), para o composto **9c** (10 μ M). **b)** Gráfico em barras dos valores de K_{SV} na ausência e na presença de ctDNA para todos os compostos avaliados.



Fonte: elaborado pela autora, 2018.

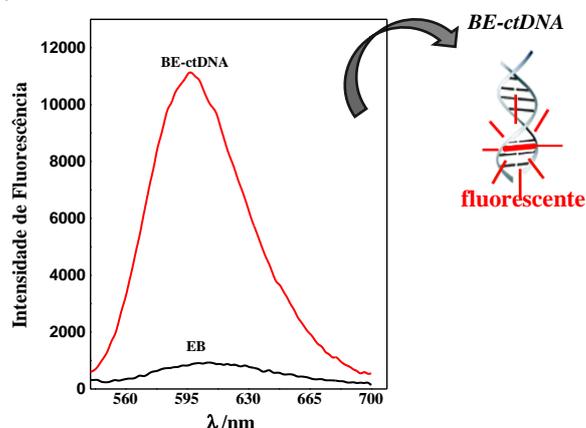
Observa-se, portanto, na Figura 26a que, na presença de ctDNA a reta do gráfico apresentou uma inclinação menor (em vermelho), quando comparada ao sistema sem o ctDNA (em azul). Essa inclinação mostra que o valor de K_{SV} diminuiu na presença da macromolécula, sendo esse comportamento também observado para os compostos **10b** e **17**, sendo melhor visualizado no gráfico da Figura 26b. Portanto, observa-se que na presença do ctDNA, os valores da constante de Stern-Volmer, sistematicamente foram menores. Contudo, para o composto **9e**, se observou uma menor redução em comparação aos outros compostos. Como o ensaio do KI pode apresentar resultados similares para compostos intercalante e localizados no *groove* menor, um ensaio adicional para avaliação do modo de ligação foi necessário.

O perfil da redução do valor de K_{SV} é característico de agentes intercalante ao DNA, pois como os íons iodetos são carregados negativamente, eles tendem a serem repelidos pelos grupos fosfatos presentes na dupla hélice do DNA. Portanto, se o ligante estiver intercalado na macromolécula, ele estará protegido entre os pares de bases nitrogenados, evitando assim o acesso dos íons iodetos (SARWAR et al., 2015; QAIS et al., 2017). Dessa forma, por haver menor quantidade do composto livre em solução, os valores de K_{SV} tendem a diminuir expressivamente quando comparados ao sistema que não possui DNA, onde os compostos encontram-se livres, logo, mais acessíveis. Assim, pode-se inferir com base nos resultados que os compostos β -carbólicos avaliados interagem com o ctDNA preferencialmente via intercalação. Do contrário, se os valores de K_{SV} aumentassem, seria indício de que o ligante estaria mais acessível aos íons iodetos e, portanto, a intercalação provavelmente não seria o modo de ligação preferencial (REHMAN et al., 2015; KUNDU; GHOSH; CHATTOPADHYAY, 2015; SILVA et al., 2016b; SHARMA et al., 2016; QAIS et al., 2017). Para confirmação destes resultados foi realizado outro ensaio para inferir o modo de ligação, neste foi utilizada a competição com brometo de etídio como parâmetro.

6.2.3.2. Estudo de competição com brometo de etídio (BE)

O estudo do deslocamento competitivo utilizando sondas fluorescentes, cujos modos de ligação ao DNA são bem estabelecidos, são frequentemente utilizados para inferir o modo de interação entre pequenas moléculas e o DNA. O brometo de etídio (BE) é um agente intercalante bastante utilizado para este fim e, possui sinal de fluorescência desprezível quando livre em solução aquosa devido a extinção promovida por moléculas do solvente, porém, ao intercalar no DNA, forma o complexo ctDNA-BE e o sinal analítico aumenta consideravelmente (Figura 27) (RAMAKRISHNAN et al., 2009; GANESHPANDIAN et al., 2014; MUKHERJEE; SINGH, 2017; QAIS et al., 2017).

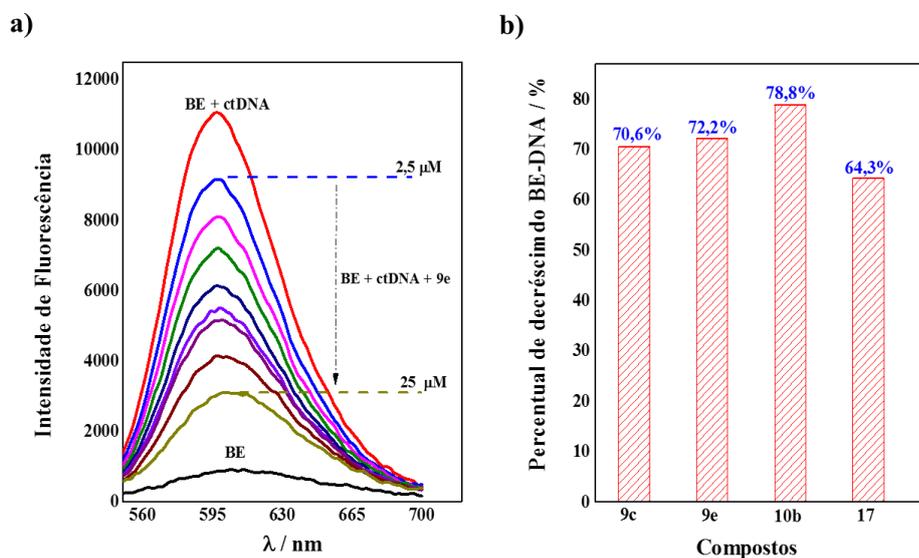
Figura 27 – Espectro do sinal de fluorescência do brometo de etídio livre ($10\ \mu\text{M}$) e na presença do ctDNA ($100\ \mu\text{M}$).



Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Dessa forma, o estudo foi realizado acrescentando concentrações crescente do composto β -carbolínico ao sistema contendo ctDNA-BE em concentrações fixas (Figura 28a). O objetivo foi verificar se o ligante em avaliação seria capaz de deslocar o brometo de etídio do ctDNA, comprovando assim ser também um agente intercalante. Para este fim, o monitoramento da emissão de fluorescência foi no comprimento de onda do sinal do complexo ctDNA-BE ($\lambda_{em} = 596\ \text{nm}$), diferente dos demais estudos, onde o monitoramento foi realizado no sinal do composto.

Figura 28 – a) Avaliação da intensidade de fluorescência do sistema BE-ctDNA na presença do composto **9e** b) Decréscimo percentual do sinal de fluorescência do sistema BE-ctDNA na presença dos compostos β -carbolínicos. Concentrações: $[\text{BE}] = 10\ \mu\text{M}$, $[\text{ctDNA}] = 100\ \mu\text{M}$ e $[\text{ligantes}] = 50 - 400\ \mu\text{M}$.



Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Com base na Figura 28a, pôde-se observar que o sinal de fluorescência do complexo ctDNA-BE decai à medida que a concentração do composto **9c** aumenta no meio. Esse comportamento foi observado para todos os compostos avaliados, obtendo um percentual de decréscimo variando na faixa de 64,3 a 79,9% (Figura 28b). Esta redução de sinal acontece quando existe no sistema ctDNA-BE, um ligante que possua o mesmo modo de ligação que o BE com ctDNA. Assim, o ligante compete pelo mesmo sitio que o BE, promovendo, assim, seu deslocamento e, intercala ao DNA formando um complexo no estado fundamental. Conseqüentemente, ocorre redução do sinal analítico, devido a liberação do BE livre a solução (SILVA et al., 2016; QAIS et al., 2017). Alternativamente, pode ocorrer também um deslocamento do BE de forma não competitiva por meio da alteração da conformação do ctDNA, o que resulta em liberação do BE e, assim, redução de fluorescência (DEHKHODAEI et al. 2017a).

Dessa forma, pôde-se concluir que todos os compostos avaliados interagem com o ctDNA de forma similar ao brometo de etídio, ou seja, via intercalação e, portanto, estes resultados reforçam os obtidos pelo estudo com o iodeto de potássio. Os agentes intercalantes, por sua vez, apresentam estrutura aromática policíclica planar, sendo assim capaz de empilhar-se entre os pares de bases nitrogenadas do DNA e, assim, tendem a estabilizar a dupla hélice da macromolécula, o que provavelmente contribuiu para a inibição da replicação, transcrição e reparo do DNA, gerando assim morte celular e, conseqüentemente, atividade antitumoral. (CAO et al, 2005).

A partir do estudo de competição com o BE, ainda foi possível verificar a capacidade de ligação entre os compostos em estudo com o ctDNA, como também a magnitude da interação do complexo ctDNA-BE com os compostos analisados. Para verificar a capacidade de ligação, realizou-se a avaliação da magnitude da supressão de sinal do complexo ctDNA-BE em função das concentrações crescentes de composto no sistema por meio do valor do K_{SV} , sendo assim calculada por meio da linearização da equação (1) (CHOWDHURY et al., 2011; DEHKHODAEI et al., 2017). Onde a extensão da supressão de fluorescência do complexo BE-ctDNA está diretamente relacionada ao grau de ligação, via intercalação, do composto com o ctDNA (QAIS et al., 2017).

Por seguinte, a magnitude da interação do complexo ctDNA-BE com os compostos foi avaliada a partir dos valores de K_b , sendo este calculado através da linearização da equação (2) (DEHKHODAEI et al., 2017a; MARQUES et al., 2018). Adicionalmente, calculou-se as

constantes de ligação aparente (K_{app}) por meio da equação 6 (MARQUES et al., 2018; KUMAR et al., 2011; GANESHPIANDIAN et al., 2014):

$$K_{app} = K_{BE} \times [BE] \times K_{SV} \quad (\text{Equação 6})$$

onde K_{BE} é igual a $1,0 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$, $[BE] = 10 \mu\text{M}$, e K_{SV} corresponde aos valores das constantes de Stern-Volmer obtidos pela equação 1. Os valores obtidos para K_{SV} , K_{app} e K_b estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros de interação dos derivados de β -carbolicinas com o complexo BE-ctDNA, obtidos por estudo de competição.

Composto	Parâmetros de Stern-Volmer		Parâmetros de ligação		
	K_{SV} (10^3 L mol^{-1})	r	K_b (10^5 L mol^{-1})	K_{app} (10^5 L mol^{-1})	r
9c	$4,80 \pm 0,66$	0,9640	$15,96 \pm 0,001$	$4,80 \pm 0,01$	0,9812
9e	$9,44 \pm 0,36$	0,9955	$0,19 \pm 0,001$	$9,44 \pm 0,01$	0,9961
10b	$11,15 \pm 0,11$	0,9806	$7,83 \pm 0,001$	$11,15 \pm 0,01$	0,9889
17	$5,69 \pm 0,27$	0,9945	$0,64 \pm 0,001$	$5,69 \pm 0,01$	0,9906

Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Com base na Tabela 4, observa-se que os valores de K_{SV} variaram de 4,80 a $11,15 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$, demonstrando assim uma boa eficiência de deslocamento de extinção da fluorescência para todos os compostos avaliados, ou seja, uma boa capacidade destes deslocarem o BE das bases nitrogenadas do ctDNA e, assim, interagir com a macromolécula (CHOWDHURY et al., 2011; ZHU et al., 2014). A magnitude desta interação é expressa pelos valores de K_b , os quais apresentaram-se na faixa de 0,0073 a $78,29 \times 10^4$ (Tabela 4), demonstrando boa afinidade de ligação entre os compostos em estudo e o ctDNA por meio do deslocamento do BE.

Além disso, foram calculados os valores K_{app} , por meio da equação (6) (Tabela 4). A constante aparente, K_{app} , se refere à interação dos compostos com o complexo ctDNA-BE, e os valores obtidos foram de 4,80 a $11,15 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$, confirmando assim a interação dos β -carbolicínicos com o ctDNA. Outros trabalhos reportados na literatura, para compostos derivados de Annonalide e para complexos de Cu(II), relatam valores de K_{app} na ordem de 10^4 e 10^5 L mol^{-1} para estudos similares (MAYTI et al., 2009 ; KUMAR et al., 2011; DESPAIGNE et al. 2014; MARQUES et al., 2018).

Por fim, por meio do estudo de competição, realizados em três temperaturas (22, 30 e 37 °C), foi possível calcular alguns parâmetros termodinâmicos em função da variação de K_b ,

a partir da linearização da equação de Van't Hoff (Eq. 3). A partir destes parâmetros pôde-se propor os principais tipos de interação intermoleculares envolvidas na formação do complexo supramolecular DNA-ligante (WANG et al., 2015; QAIS et al., 2017), o que ajuda na orientação de possíveis alterações estruturais no ligante visando aumentar a força da interação com o DNA, como também a seletividade a uma determinada sequência de base (HAQ et al., 2000). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros Termodinâmicos de interação dos derivados de β -carbolinas com o complexo BE-ctDNA, obtidos por estudo de competição.

Composto	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ mol ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)		
			22 °C	30 °C	37 °C
9c	+ 204,90	+ 0,74	-12,87	-18,78	-23,94
9e	+ 64,25	+ 0,29	-23,36	-25,74	-27,82
10b	+ 114,16	+ 0,48	-28,56	-32,43	-35,82
17	+ 29,63	+ 0,19	-26,79	-28,32	-29,66

Fonte: elaborado pela autora, 2018.

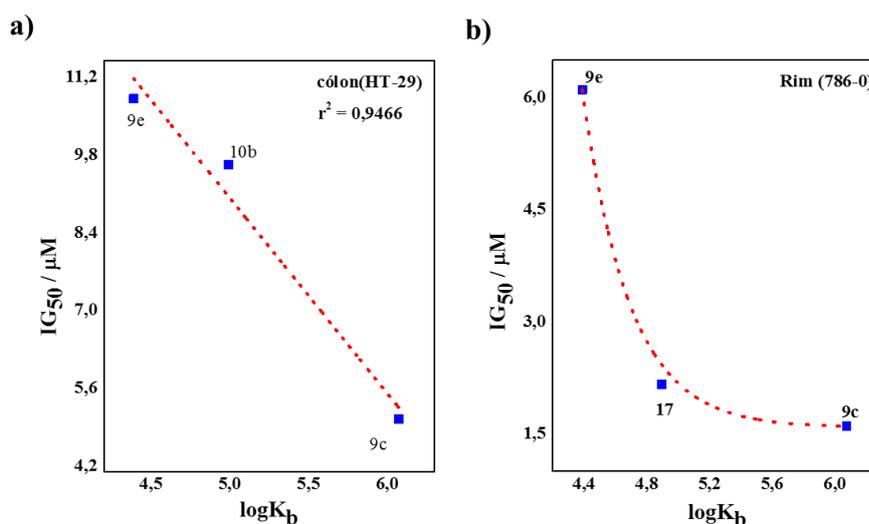
De acordo com os resultados, pôde-se observar que a interação entre os ligantes β -carbolínicos e ctDNA foi entropicamente favorecida. Segundo Caruso et al. (2012) forças eletrostáticas são favorecidas no processo de interação quando $\Delta H < 0$ (ou $\Delta H \approx 0$) e $\Delta S > 0$; enquanto que ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals quando $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ e interações hidrofóbicas para $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$. Dessa maneira, as principais forças associadas a formação do complexo ligante-ctDNA são interações hidrofóbicas, uma vez que foram obtidos valores de $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$, o que indica que as moléculas de água que antes se posicionavam de forma ordenada em volta do ligante e da macromolécula, adquiriram uma composição mais aleatória após a interação (SEEDHER; BHATIA, 2005; LI et al., 2011). Além disto, houve um nível de desordem maior no sistema devido as mudanças de conformação da molécula de DNA decorrentes da quebra de ligações de hidrogênios (BARRA; NETTO, 2015). Por fim, foram obtidos valores negativos para ΔG , significando assim que a interação ocorreu de forma espontânea. Resultados similares foram encontrados por Wu et al. (2007) para derivados outros β -carbolínicos.

6.2.4. Análise de correlação

A análise de correlação é realizada visando auxiliar quanto ao possível mecanismo de ação dos compostos. Para isto, faz-se a correlação entre os valores da constante de ligação (K_b)

dos compostos avaliados e, suas atividades citotóxicas (IG_{50}) para as linhagens celulares cancerígenas (Figura 29). Os compostos foram considerados ativos para valores de $IG_{50} \leq 100 \mu\text{M}$, limitando assim os números de pontos utilizados.

Figura 29 - Correlação entre IG_{50} e K_b das linhagens de células tumorais cólon (HT-29) e rim (786-0), para os compostos β -carbolicínicos avaliados.



Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Dessa forma, é observado, na Figura 29, a correlação encontrada, entre alguns dos compostos avaliados para duas linhagens celulares, cólon (HT-29) e rim (786-0). Para cólon (HT-29) a correlação apresentou uma tendência inversa linear (Figura 29a), com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9466, enquanto que para a linhagem de rim (786-0), verificou-se uma tendência exponencial inversa (Figura 29b). Dessa forma, pode-se perceber que as variáveis analisadas (K_b vs IG_{50}) são inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior o valor da constante de interação com ctDNA menor o valor de IG_{50} , logo, maior atividade, indicando assim que possivelmente a via de ação dos compostos, para estas linhagens, pode estar relacionada à interação com o DNA (DZIEGIELEWSKI et al., 2002; DAS et al., 2018). Assim, se estabelece a ordem de maior atividade e, conseqüentemente, maior valor de K_b , para linhagem de cólon: $9c > 10b > 9e$, e para linhagem de rim, se tem: $9c > 17 > 9e$. Vale ressaltar que, de forma geral, o composto **9c** foi o que se apresentou mais ativo e com maior valor de K_b .

Estes dados estão de acordo com trabalhos reportados na literatura, para diversas classes de compostos com atividades anticâncers (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2017; DAS et al., 2018), incluindo o de Silva et al., onde relatam a correlação das variáveis mencionadas para compostos β -carbolicínicos, apresentando uma relação linear inversa com r^2 na faixa de 0,5360 a

0,9600. Outras linhagens não apresentaram correlação com a constante de ligação, isso pode ser um indicio de que a atividade desses compostos não está relacionada a interação com DNA.

6.3. Avaliação da interação proteína-ligante

As interações de medicamentos com as proteínas carreadoras afetam diretamente a distribuição do fármaco no organismo e, conseqüentemente, sua eliminação como também sua eficácia terapêutica, uma vez que apenas o fármaco não ligado tem atividade farmacológica (BI et al., 2009; CHAVES et al., 2017). Dessa forma, o estudo da interação da proteína com os compostos β -carbolínicos torna-se importante, pois pode fornecer informações úteis para o *design* de novos protótipos bioativos mais eficazes, como foram os casos relatados por Hall et al., (2013), onde as informações obtidas a partir do estudo da interação da HSA com protótipos à fármacos inibidores de Bcl-2 e COX-2, permitiram efetuar pequenas mudanças estruturais e, assim, melhorá-los tornando-os mais eficazes. Estes inibidores, a princípio, mostraram alta afinidade pela macromolécula, o que dificultou sua eficácia terapêutica. Portanto, as mudanças em sua estrutura levaram à redução da afinidade pela HSA e, conseqüentemente, maior ação farmacológica.

Sendo assim, a partir do presente estudo de interação com a BSA, sendo esta uma proteína modelo, foi possível inferir alguns parâmetros de ligação, tais como: o mecanismo de *quenching* dominante, a constante de ligação (K_b), constante do *quenching* (K_{sv}) e número de sítios de ligação. Os resultados são preliminares e, os espectros que serão apresentados correspondem a avaliação do composto **9e**, sendo este o que apresentou a maior constante de ligação, K_b . Porém, os demais analitos obtiveram comportamentos similares.

6.3.1. Estudos por espectroscopia de fluorescência molecular

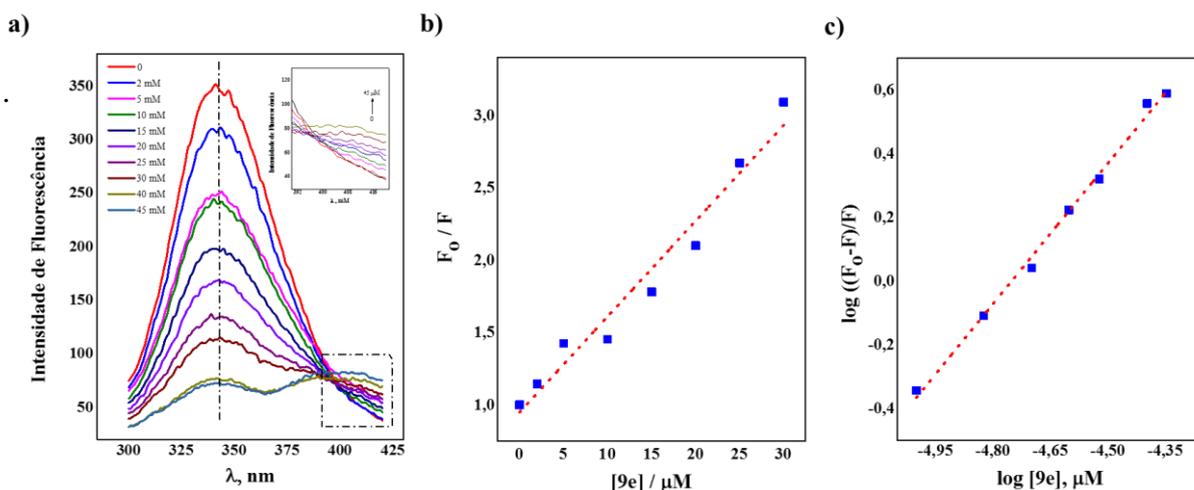
De forma similar ao estudo da interação dos compostos β -carbolínicos com o ctDNA, a avaliação dos mesmos com a proteína BSA foi realizada por fluorescência molecular. Porém, o sinal analítico que aqui foi monitorado, corresponde à fluorescência intrínseca da proteína e, portanto, os compostos β -carbolínicos se comportam como *quencher*. Dessa forma, o monitoramento da emissão de fluorescência foi realizado em $\lambda_{em} = 341$ nm, não havendo assim interferência com o sinal analítico dos compostos, os quais emitem em $\lambda > 390$ nm.

6.3.1.1. Determinação dos parâmetros de ligação com BSA

A fluorescência intrínseca da proteína corresponde, principalmente aos resíduos de triptofano. Assim, na titulação realizada, observou-se que a adição de concentrações crescentes do composto ao sistema contendo a proteína, levou à redução gradual do sinal analítico (Figura

30a). A supressão de emissão, portanto, caracteriza o mecanismo de *quenching*, sendo este um indicativo de que ocorreu a interação do composto com a BSA. Além disso, pode-se observar um deslocamento brando de ~ 3 nm para o azul, como também um aumento, simultâneo, na intensidade do sinal analítico em $\lambda > 409$ nm, o qual é atribuído a emissão de fluorescência do composto **9e**, juntamente com a presença de um ponto isobéstico em aproximadamente 395 nm, relacionado à existência do equilíbrio entre ligante livre e complexado a BSA. Este comportamento foi encontrado para todos os compostos em estudo e, também relato por Hemmateenejad et al., (2012) para o sistema harmalol-HSA, sendo o ligante um derivado β -carbolina, além de outros trabalhos similares disponíveis na literatura com a BSA, dentre eles a avaliação do ligante alpinetina (ZHANG et al., 2010), ergosterol (CHENG, 2012) e derivados de naftalimida (TIAN et al., 2015).

Figura 30 – Espectros obtidos para avaliação da interação BSA-ligante por fluorescência molecular para o composto **9e**: **a)** Espectro da proteína (2 μ M) com adições crescentes de ligante (0 – 45 μ M); **b)** Curva para cálculo da constante Stern-Volmer, K_{SV} , (processo de *quenching*); **c)** Curva logarítmica para cálculo da constante de ligação (K_b) e n do complexo BSA-composto.



Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Os gráficos apresentados na Figura 30 referem-se ao composto **9e**, uma vez que este apresentou maior interação com a proteína, porém comportamentos similares foram mostrados pelos demais compostos em estudo. Os parâmetros de ligação BSA-ligante foram então determinados como já foi discutido anteriormente, onde a constante de Stern-Volmer foi determinada por meio da curva apresentada na Figura 30b, e a constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) foram obtidas a partir da curva expressa na Figura 30c, e a taxa de extinção biomolecular, K_q , por meio da equação (1.1). Vale ressaltar que, para ambos os

gráficos, tem-se que F_0 e F são as intensidades de fluorescência da proteína na ausência e na presença do ligante. Os dados obtidos estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros de interação dos derivados de β -carbolicinas com a proteína BSA.

Compostos	Parâmetros de Stern-Volmer			Parâmetros de ligação		
	K_{SV} (10^4 L mol^{-1})	r	K_q ($10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	K_b (10^5 L mol^{-1})	N	r
9e	$6,05 \pm 0,54$	0,9806	6,05	$40,86 \pm 0,01$	$1,04 \pm 0,05$	0,9964
9c	$6,34 \pm 0,20$	0,9963	6,34	$3,51 \pm 0,01$	$1,17 \pm 0,04$	0,9979
10b	$2,17 \pm 0,06$	0,9936	2,17	$0,51 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,04$	0,9961
17	$1,13 \pm 0,07$	0,9907	1,13	$0,32 \pm 0,01$	$1,09 \pm 0,08$	0,9884

Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Nota-se então, na Tabela 6, que os valores de K_{SV} para a interação dos compostos β -carbolicínicos com a BSA ficaram na faixa de 1,13 a $6,34 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, mostrando assim que ocorreu uma interação eficiente entre as moléculas. Valores de K_{SV} nesta ordem de grandeza foram relatados em diversos estudos da interação da BSA, dentre eles ligantes como artemisinina (BIAN et al., 2016) e complexos de cobre (II) com hidrazona (DESPAIGNE et al., 2014), assim como os fármacos proflavina (CHAKRABORTY; BASU, 2009) e atomoxetina (BUDDANAVAR; NANDIBEWOR, 2017). A redução na intensidade de fluorescência, portanto, juntamente com leve mudança espectral com o deslocamento para o azul (Figura 30a), vem sendo relacionada, por outros trabalhos, com mudanças que ocorrem na estrutura secundária da proteína levando a alterações no microambiente do subdomínio hidrofóbico IIA presente na BSA, onde está localizado o resíduo de Trp-213 (BI et al., 2009; JANNESARI et al 2013; LI; YANG, 2015; JAHANBAN-ESFAHLAN; PANAHI-AZAR, 2016; DEHKHODAEI et al., 2017b), assim, sugere-se que o composto pode se ligar neste subdomínio e, dessa forma, o resíduo Trp-213 encontra-se próximo ou dentro do sítio de ligação (CHENG; LIU; JIANG, 2009; GHOSH; RATHI; ARORA, 2016).

Os valores de K_q variaram na faixa de 1,13 a $6,34 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, sendo este valor um indicativo de que o mecanismo de extinção preferencial é o *quenchig* estático, uma vez que $K_q > 2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, provando assim a formação do complexo supramolecular proteína-ligante não fluorescente (BI et al., 2009; DEHKHODAEI et al., 2017b). Adicionalmente, observou-se que o número de sítio de ligação (n), para todos os compostos estudados, foi aproximadamente 1, sugerindo assim uma estequiometria da reação de 1:1 (proteína: ligante) e, por fim, a força da interação proteína-ligante, expressa pela constante de ligação (K_b), variou na faixa de $3,20 \times 10^4$ a $4,10 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$, demonstrando, portanto, afinidade moderada com a macromolécula

(SURYAWANSHI et al., 2016; CHAVES et al., 2017). Segundo Topalã et al., (2014), interações com valores de K_b na ordem de 10^4 a 10^6 indica força suficiente para que o ligante seja transportado pela BSA e liberado quando atingir o alvo. Esses resultados são comparáveis com outros trabalhos relatados na literatura com derivados de pirimidinas (SURYAWANSHI et al 2016), complexos de Cu(II) com hidrazona (DESPAIGNE et al., 2014) e o corante carmoisina (DATTA; MAHAPATRA; HALDER, 2013). Resultados similares também foram encontrados para outros compostos β -carbolínicos, onde Nafisi et al., (2012b) relatam valores de K_b na faixa de 0,10 a $2,04 \times 10^4$ L mol⁻¹. Além disso, os valores encontrados para os compostos avaliados, foram consistentes com alguns trabalhos reportados, também na literatura, para a avaliação de interação entre fármacos antitumorais com a BSA, por meio da técnica de fluorescência molecular (Figura 12).

Dessa forma, os valores de K_b para os compostos avaliados neste trabalho, estão também de acordo com as constantes de ligação de alguns fármacos clinicamente utilizados, os quais possuem a força de ligação classificada como forte ou moderada. De acordo com Tian et al., (2015) estes valores permitem a formação do complexo com ligações reversíveis e, ainda, segundo Li e Yang (2015), permite que o composto em estudo seja armazenado e transportado pela proteína BSA através corpo, por meio do sistema circulatório, até chegar em seu alvo onde será efetuado a ação farmacológica.

Quando um composto com baixa solubilidade em água é usado como fármaco, ele liga-se à uma proteína transportadora, nesse caso a BSA, e aumenta sua solubilidade. A proteína, por sua vez, leva a molécula até seu alvo, porém, a liberação do fármaco desta macromolécula depende da força da interação entre eles, sabendo que apenas o fármaco em sua forma livre possui atividade farmacológica. A liberação do fármaco, portanto, é realizada à medida que o composto vai sendo metabolizado (NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013; RIBEIRO, 2015). Dessa forma, quanto maior for a interação da droga com a proteína carregadora, mais lento ele vai sendo liberado, e mais tempo o fármaco fica no organismo, o que aumenta seu tempo de ação. Sendo assim, a afinidade de ligação entre estas moléculas determina a farmacocinética (volume de distribuição e eliminação) e farmacodinâmica (atividade biológica e toxicologia) de um fármaco, isso porque determina a biodisponibilidade do mesmo (METI et al, 2014; LI; YANG, 2015). Magnitude de interação baixa resulta em má distribuição do fármaco no organismo, como também um rápido metabolismo e excreção, o que leva a incapacidade de fornecer os efeitos farmacológicos (LI; YANG, 2015; CHENG 2012). Por outro lado, afinidades de ligação elevadas também comprometem a eficácia do fármaco, pois a forte interação pode impedir que o ligante seja liberado da proteína em seu alvo e, além disso, a forte

interação ocasiona metabolismo e excreção lentos, como também aumenta o tempo do fármaco no organismo levando a efeitos tóxicos (LI; YANG, 2015). Por fim, segundo Topalã et al., (2014), a força de interação BSA-ligante para efeito terapêutico eficiente, deve ser moderada, com K_b variando de 10^4 a 10^6 , para garantir o transporte e liberação do fármaco em seu alvo. Portanto, é necessário o conhecimento dessa interação para design de medicamentos e para a fixação de limites de dose.

6.4. Estudos de *docking* molecular

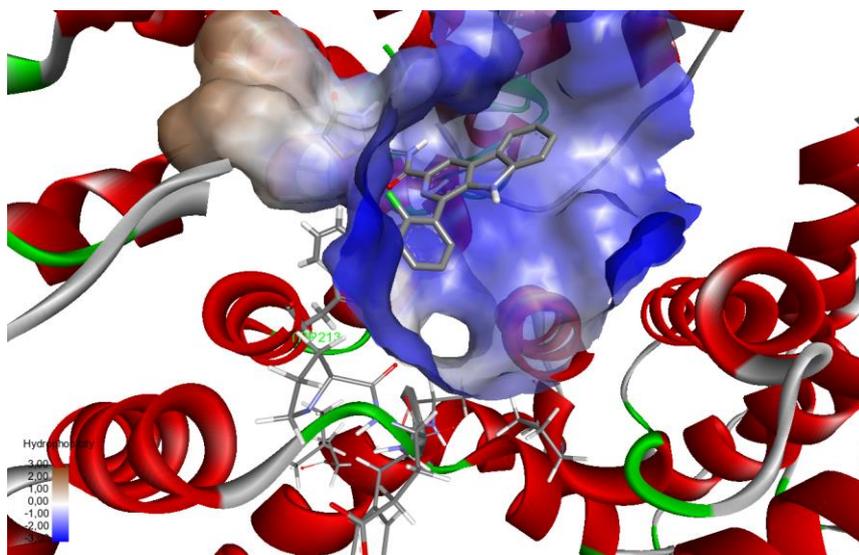
O *docking* molecular é uma importante ferramenta utilizada na concepção de novos fármacos, uma vez que fornece informações úteis do processo de interação entre moléculas bioativas e biomoléculas a BSA (REHMAN et al., 2015; AJLOO et al. 2015). Sendo assim, foram realizados estudos de docagem molecular para os compostos β -carbolínicos, afim de prever o sítio destes ligantes na BSA.

6.4.1. *Docking* molecular com BSA

O primeiro passo no encaixe molecular foi identificar os bolsos de ligação mais prováveis e potenciais dentro da estrutura da proteína. Nesse sentido, o estudo do *docking* foi realizado nos subdomínios IB e IIA da albumina de soro bovino, sendo este segundo pertencente ao sítio I que é um dos principais sítios de ligação para fármacos. A avaliação mostrou que o sítio I é energeticamente mais favorável para que se ocorra a interação entre o receptor (BSA) e os ligantes avaliados. Portanto, foram analisadas as conformações obtidas a partir da interação com sítio I o qual contém o resíduo Trp 213.

Desse modo, foi observado que os compostos avaliados interagiram na cavidade hidrofóbica da BSA localizado no sítio I (Figura 31) promovendo diversas interações, as quais podem ser observadas através do diagrama 2D exibido na Figura 32. Note que no canto inferior esquerdo da Figura 31 contém uma escala de hidrofobicidade, onde a região mais hidrofóbica está em marrom e a menos hidrofóbica em azul.

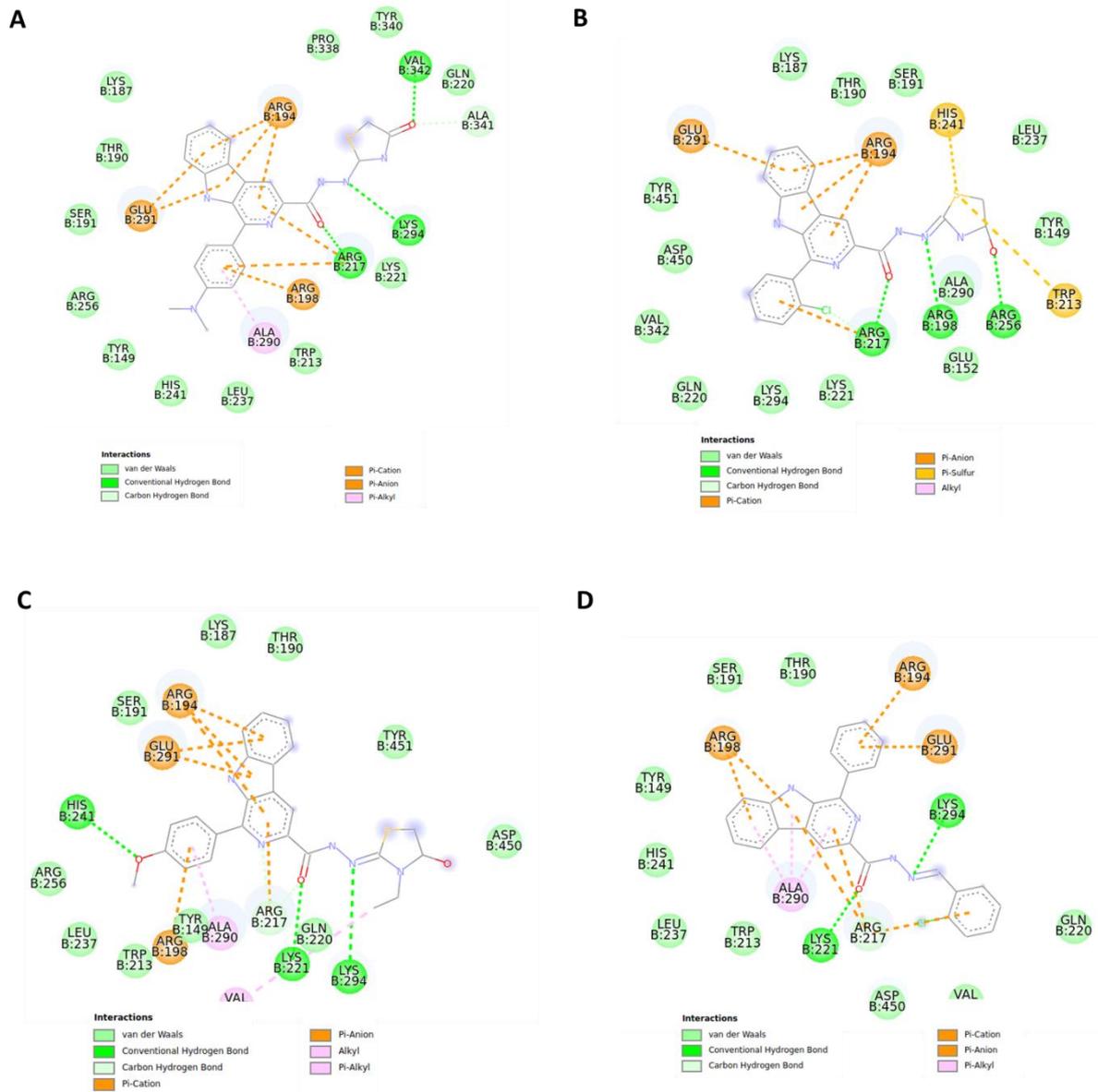
Figura 31 – Estrutura tridimensional do complexo **9e**-BSA.



Fonte: elaborado pelo aluno de mestrado Edjan Carlos Dantas da Silva, 2018.

É possível observar na Figura 32 que os compostos foram circundados pelos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos Alanina (Ala290), Leucina (Leu237), Valina (Val342), Triptofano (Trp 213) e Tirosina (Tyr149), como também os resíduos hidrofílicos Arginina (Arg194, Arg256, Arg198, Arg217), Aspartato (Asp450), Glutamato (Glu291), Histidina (His241), Lisina (Lys187, Lys221, Lys294), Serina (Ser191), Treonina (Thr190) e Glutamina (Gln220), o que confirma que os compostos possuem uma melhor afinidade com uma região menos hidrofóbica como foi visualizado na Figura 31. Note que somente o composto 9e interagiu diretamente com o resíduo de Trp 2013, mas todos os demais ligantes se acomodaram próximo, o que está de acordo com os dados obtidos experimentalmente, onde esse perfil foi mostrado por meio do deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão da proteína.

Figura 32 – Docking molecular em diagrama 2D da interação β -carbolinas-BSA: **9c** (A); **9e** (B); **10b** (C); **17** (D)



Fonte: elaborado pelo aluno de mestrado Edjan Carlos Dantas da Silva, 2018.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo mostrou que houve interação dos compostos derivados de alcaloides β -carbolínicos com as duas macromoléculas avaliadas, ctDNA e BSA, resultando em formação de complexos supramoleculares não fluorescentes através do mecanismo de *quenching* estático, o qual foi caracterizado por ambas as técnicas utilizadas no presente estudo: espectroscopia de absorção no UV-Vis e fluorescência molecular.

No estudo com o ctDNA, pode-se observar que a interação dos compostos com a macromolécula foi significativa, com valores das constantes de ligação, K_b , variando na faixa de $2,45 \times 10^4$ a $1,18 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$, sendo a reação efetuada na proporção de 1:1 (composto: ctDNA). O maior valor de K_b foi exibido pelo composto **9c**, o qual possui um radical *N,N*-dimetilanilina na posição C1 no anel β -carbolina, enquanto que para o composto **9e**, possuindo o substituinte em C1 *o*-cloro fenil, apresentou o menor valor de K_b . O principal modo da interação ocorre preferencialmente via intercalação, o qual foi estabelecido por meio dos ensaios com o iodeto de potássio (KI) e brometo de etídio (BE).

A partir do estudo da correlação analítica entre os valores de K_b vs IG_{50} , foi possível observar que o modo intercalativo, para alguns compostos, é o principal mecanismo de ação anticâncer do mesmo. A correlação foi, portanto, encontrada para linhagens de cólon (HT-29), para os compostos **9e**, **10b** e **9c**; e de rim (786-0) para os compostos **9e**, **17** e **9c**.

Para o estudo com a proteína BSA, os valores de K_b variaram de $3,2 \times 10^4$ a $4,1 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$, demonstrando uma boa afinidade com a proteína e com relação estequiométrica de 1:1. Segundo a literatura, estes valores sugerem uma ligação eficiente dos ligantes com a proteína BSA e estão de acordo com as constantes de ligação de fármacos antitumorais atualmente utilizados. Por fim, o estudo do *docking* molecular sugeriu que os compostos β -carbolinas estudados, possuem boa afinidade com a cavidade hidrofóbica contida no sítio I da proteína, localizado no subdomínio IIA onde é encontrado o resíduo de triptofano (Trp213). E, de acordo com estudos reportados na literatura, este sítio é um dos principais sítios de ligação para fármacos.

8. REFERÊNCIAS

- AFRIN, S. et al. Molecular spectroscopic and thermodynamic studies on the interaction of anti-platelet drug ticlopidine with calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, India, v. 186, p. 66–75, 2017.
- AGUDELO, D. et al. Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications. **International Journal of Biological Macromolecules**, Canadá, v. 66, p. 144–150, fev., 2014.
- AHMAD, A.; AHMAD, M. Deciphering the mechanism of interaction of edifenphos with calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, India, v. 188, p. 244–251, 2018.
- AJLOO, D. et al. Synthesis, characterization, spectroscopy, cytotoxic activity and molecular dynamic study on the interaction of three palladium complexes of phenanthroline and glycine derivatives with calf thymus DNA. **Inorganica Chimica Acta**, Iran, v. 430, p. 144–160, mar., 2015.
- ALBERTS et al. **Biologia molecular da célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, Brasil, v. 28, p. 118-129, Set., 2005.
- ASHOK, P. et al. Design, synthesis of new b-carboline derivatives and their selective anti-HIV-2 activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Índia, v.25, p. 1232–1235, Jan., 2015.
- BARBOSA, V. A. et al. Synthesis and evaluation of novel hybrids b-carboline-4-thiazolidinones as potential antitumor and antiviral agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Brasil, v. 124, p. 1093-1104, Out. 2016.
- BARBOSA, V.A. et al. Synthesis and antitumor activity of β -carboline 3-(substituted-carbohydrazide) derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.19, p.6400–6408, Set., 2011.
- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual Química**, v. 7, p.1998-2016, agos., 2015.
- BARREIRO, L. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BASU, A.; KUMAR, G. S. Biophysical studies on curcumin–deoxyribonucleic acid interaction: Spectroscopic and calorimetric approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, Índia, v. 62, p. 257– 264, Set., 2013.

BASU, A.; KUMAR, G. S. Thermodynamics of the interaction of the food additive tartrazine with serum albumins: A microcalorimetric investigation. **Food Chemistry**, Índia, v. 175, 137–142, dez., 2015.

BECKFORD, F. A. Reaction of the Anticancer Organometallic Ruthenium Compound, [η^6 -p-Cymene)Ru(ATSC)Cl]PF₆ with Human Serum Albumin. **International Journal of Inorganic Chemistry**, Estados Unidos, p. 1-7, jan., 2010.

BIAN, H. et al. Study of the interaction of artemisinin with bovine serum albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, China, v. 39, p. 291–297, maio, 2006.

BI et al., Binding of several anti-tumor drugs to bovine serum albumin: Fluorescence study. **Journal of Luminescence**, China, v. 129, p. 541–547, dez., 2009.

BOURASSA, P.; HASNI, I.; TAJMIR-RIahi, H. A. Folic acid complexes with human and bovine serum albumins. **Food chemistry**, Canadá, v. 129, p. 1148–1155, maio, 2011.

BOURSERAU, Y.; COLDHAM, I. Synthesis and biological studies of 1-amino b-carbolines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p. 5841–5844, out., 2004.

BROCK, A. R. et al. The role of antimalarial quality in the emergence and transmission of resistance. **Medical Hypotheses**, Austrália, v. 111, p. 49–54, 2018.

BUDDANAVAR, A. T.; NANDIBEWoor, S. T. Multi-spectroscopic characterization of bovine serum albumin upon interaction with atomoxetine. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, India, v. 7, p. 148–155, 2017.

CAO, R. et al. DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives. **Biochemical and Biophysical**, China, v. 338, p. 1557–1563, nov., 2005.

CAO, R. et al. β -Carboline Alkaloids: Biochemical and Pharmacological Functions. **Current Medicinal Chemistry**, China, v. 14, n 4, p. 479-500, 2007.

CAO, R. et al. Design, synthesis and 3D-QSAR of b-carboline derivatives as potent antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, China, v. 45, p. 2503-2515, fev., 2010.

CARUSO, I. P. et al. Exploring the binding mechanism of Guaijaverin to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy and computational approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Brasil, v. 97, p. 449–455, 2012.

CESCONETTO, E. C. et al. DNA interaction with Actinomycin D: mechanical measurements reveal the details of the binding data. **Physical Chemistry Chemical**, v. 15, p. 11070 – 11076, maior, 2013.

CHAKRABORTY, B.; BASU, S. Interaction of BSA with proflavin: A spectroscopic approach. **Journal of Luminescence**, Índia, v. 129, p. 34-39, agos., 2009.

CHAIRES, J. B. A thermodynamic signature for drug–DNA binding mode. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Estados Unidos, v. 453, p. 26–31, 2006.

CHAN, S. T. S. et al. Antimalarial β -Carbolines from the New Zealand Ascidian *Pseudodistoma opacum*. **Journal of Natural Products**, Nova Zelândia, v. 74, p. 972–1979, 2011.

CHAVES, O. A. et al. Binding studies of lophirone B with bovine serum albumin (BSA): Combination of spectroscopic and molecular docking techniques. **Journal of Molecular Structure**, Brasil, v. 1128, p. 606-611, 2017.

CHEN et al. Synthesis and biological evaluation of 1,9-disubstituted b-carbolines as potent DNA intercalating and cytotoxic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, China, v. 46, p. 5127-5137, agos., 2011.

CHEN, Z. et al. Synthesis, cytotoxic activities and DNA binding properties of b-carboline derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, China, v. 45, p. 4740-4745, jul., 2010.

CHENG, Z. Interaction of ergosterol with bovine serum albumin and human serum albumin by spectroscopic analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 9493–9508, jun., 2012.

CHOURASIYA, R. K. et al. QSAR analysis for some β -carboline derivatives as anti-tumor. **Journal of Saudi Chemical Society**, Índia, v. 20, p. 536–542, Set., 2012.

COSTA, E. V. et al. A. Full NMR analysis of annomontine, methoxyannomontine and N-hydroxyannomontine pyrimidine- β -carboline alkaloids. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 69-74, 2008.

DANTAS, M.D.A. et al. Interactions of tetracyclines with ovalbumin, the main allergen protein from egg white: Spectroscopic and electrophoretic studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, Brasil, v. 102, p. 505–514, Abr., 2017.

DANTAS, Maria Dayanne. **Avaliação da interação das proteínas do ovo (ovalbumina e outras) com os antibióticos tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina empregando técnicas espectroscópicas e eletroforese**. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

DAOUD, A. et al. B-9-3, a novel β -carboline derivative exhibits anti-cancer activity via induction of apoptosis and inhibition of cell migration in vitro. **European Journal of Pharmacology**, China, v. 724, p. 219–230, 2014.

DAS, S. et al. Highly functionalized piperidines: Free radical scavenging, anticancer activity, DNA interaction and correlation with biological activity. **Journal of Advanced Research**, Brasil, v. 9, p. 51–61, 2018.

DATTA, S.; MAHAPATRA, N.; HALDER, M. pH-insensitive electrostatic interaction of carmoisine with two serum proteins: A possible caution on its uses in food and pharmaceutical industry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Índia, v. 124, p. 50–62, abr., 2013.

DEHKHODAEI, M. et al. Synthesis, characterization, crystal structure and DNA, HSA-binding studies of four Schiff base complexes derived from salicylaldehyde and isopropylamine. **Inorganica Chimica Acta**. Iran, v. 466, p. 48–60, maio, 2017a.

DEHKHODAEI, M. et al. Studies of DNA- and HSA-binding properties of new nano-scale green synthesized Ni (II) complex as anticancer agent using spectroscopic methods, viscosity measurement, molecular docking, MD simulation and QM/MM. **Journal of Molecular Liquids**, Iran, v. 248, p. 24–35, out., 2017b.

DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 1703-1724, 2001.

DESIRAJU, G. R. Chemistry beyond the molecule. **Nature**, v. 412, p. 397–400, jul., 2001.

DESPAIGNE, A. A. R. et al. ROS-Mediated Cytotoxic Effect of Copper (II) Hydrazone Complexes against Human Glioma Cells. **Molecules**, Brasil, v. 19, p. 17202-17220, out., 2014.

DIMIZA, F. Interaction of copper (II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac: Synthesis, structure, DNA- and albumin-binding. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Grécia, v. 105, p. 476–489, set., 2011.

DZIEGIELEWSKI, J. et al. Intercalation of imidazoacridinones to DNA and its relevance to cytotoxic and antitumor activity. **Biochemical Pharmacology**, Polônia, v.63, p. 1653-1662, fev., 2002.

ERMONDI, G.; CARON, G. Recognition forces in ligand–protein complexes: Blending information from different sources. **Biochemical Pharmacology**, Itália, v. 72, p. 1633-1645, 2006.

EVANS, D. A., NEIDLE, S. Virtual Screening of DNA Minor Groove Binders. **Journal of Medicinal Chemistry**, Inglaterra, v. 49, p. 4232-4238, 2006.

FAN, Y. L. et al. Antiplasmodial and antimalarial activities of quinolone derivatives: An overview. **European Journal of Medicinal Chemistry**, China, v. 146, p. 1-14, jan., 2018.

FENERTY, C. A.; LINDUP, W. E. Effect of fcarboline derivatives on the binding of l-tryptophan and diazepam to bovine and human albumin. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, p. 1589-1594, 1991.

FORMAGIO, A.S.N. et al. Synthesis and antitumoral activity of novel 3-(2-substituted-1,3,4-oxadiazol-5-yl) and 3-(5-substituted-1,2,4-triazol-3-yl) β -carboline derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.16, p.9660–9667, Out., 2008.

FORMAGIO, A.S.N. et al. Synthesis and antiviral activity of β -carboline derivatives bearing a substituted carbohydrazide at C-3 against poliovirus and herpes simplex virus (HSV-1). **European Journal of Medicinal Chemistry**, Brasil, v.44, p.4695–4701, jul., 2009.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, p. 1271-1278, Abr., 2008.

GANESHPIANDIAN, M. et al. Mixed ligand copper (II) complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline: Tridentate 3N primary ligands determine DNA binding and cleavage and cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, India, v. 140, p. 202–212, agosto, 2014.

GELAMO, E. L. et al. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, Brasil, v. 1594, p. 84–99, 2002.

GHOSH, K.; RATHI, S.; ARORA, D. Fluorescence spectral studies on interaction of fluorescent probes with Bovine Serum Albumin (BSA). **Journal of Luminescence**, Índia, v. 175, p. 135–140, fev., 2016.

GUAN, Y.; LOUIS, E. D.; ZHENG, W. Toxicokinetics of tremorogenic natural products, harmaline and harmine, in male sprague-dawley rats. **J. Toxicol Environ Health**, Nova York, v. 64, p. 645–660, 2001.

GUETZOYAN, L. et al. Antimalarial acridines: Synthesis, in vitro activity against *P. falciparum* and interaction with hematin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, França, v. 17, p. 8032–8039, Out., 2009.

HALL, M. L.; JORGENSEN, W. L.; WHITEHEAD, L. Automated Ligand- and Structure-Based Protocol for in Silico Prediction of Human Serum Albumin Binding. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Estados Unidos, v. 53, p. 907–922, 2013.

HALL, N. et al. **Neoquímica: A química moderna e suas aplicações**. 1. ed. Bookman, 2004.

HANDE, K. R. Topoisomerase II inhibitors. **Update on Cancer Therapeutics**, Estados Unidos, v. 3, p. 13–26, 2008.

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, Iran, v. 4, p. 127–129, 2017.

HASANZADEH, M.; SHADJOU, N. Pharmacogenomic study using bio- and nanobioelectrochemistry: Drug–DNA interaction. **Materials Science and Engineering C**, Iran, v. 61, p. 1002–1017, 2016.

HAQ, I. et al. Parsing free energies of drug–DNA interactions. **Methods in Enzymology**, v. 323, p. 373–405, 2000.

HAQ, I. Part II: The Thermodynamics of Drug–Bipolymer Interaction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Reino Unido, v. 403, p. 1–15, 2002.

HEMMATEENEJAD, B. et al. Combined fluorescence spectroscopy and molecular modeling studies on the interaction between harmaline and human serum albumin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Iran, v. 68, p. 201–208, abr., 2012.

HORTON, W. et al. Synthesis and application of β -carbolines as novel multi-functional anti-Alzheimer's disease agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Estados Unidos, v.27, p. 232–236, Nov., 2016.

HU, W. et al. Intercalative interaction of asymmetric copper(II) complex with DNA: Experimental, molecular docking, molecular dynamics and TDDFT studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 127, p. 90–98, 2013.

HUANG, F.; ANSLYN, E. V. Introduction: supramolecular chemistry. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 15, p. 6999-7000, 2015.

HUBER, C. P. et al. Glicoproteína-P, Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, Brasil, v. 33, p. 2148-2154, Ago., 2010.

HUDSON, E. A. **Albumina do soro bovino como nanocarreador de curcumina**. 2017. Dissertação (Magister Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2017.

IHMELS, H.; OTTO, D. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA general principles and recent developments. **Topics in Current Chemistry**, v. 258, p. 161–204, 2005.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **A situação do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/situacao_cancer_brasil.pdf>. Acesso em 22 de julho de 2017.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa | 2016: Incidência de câncer no Brasil**. 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>, acesso em 13 de outubro de 2017.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>, acesso em 3 de janeiro de 2018.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa | 2018: Incidência de câncer no Brasil**. 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>>, acesso em 02 de julho de 2018.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A.; PANAHI-AZAR, V. Interaction of glutathione with bovine serum albumin: Spectroscopy and molecular docking. **Food Chemistry**, Iran, v. 202, p. 426–431, fev., 2016.

JANNESARI, Z. et al. Experimental and molecular modeling studies on the interaction of the Ru(II)-piroxicam with DNA and BSA. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 69, p. 577-590, 2013.

JONES, M., et al. Antitumour and antimalarial activity of artemisinin–acridine hybrids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Irlanda, v. 19, p. 2033–2037, Fev., 2009.

KAFAI, N. M.; JOHN, A. R. O. Malaria in Children. **Infectious Disease Clinics of North America**, Estados Unidos, 2017. Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891552017301034#bib19>>. Acesso em janeiro de 2018.

KALANUR.S. S.; KATRAHALLI, U.; SEETHARAMAPPA, J. Electrochemical studies and spectroscopic investigations on the interaction of an anticancer drug with DNA and their analytical applications. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Índia, v. 636, p. 93-100, set., 2009.

KANDAGAL, P. B. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, India, v. 41, p. 393–399, jan., 2006.

KARNAD, D. R. et al. Intensive care in severe malaria: Report from the task force on tropical diseases by the World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. **Journal of Critical Care**, Índia, v.43, p. 356–360, 2018.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Review**, v. 7, p. 573, agos., 2007.

KOVVURI, J. et al. Design, synthesis and biological evaluation of new β -carboline-bisindole compounds as DNA binding, photocleavage agents and topoisomerase I inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Índia, v. 143, p. 1563-1577, 2018.

KRZAK, A. et al. Complexing daunorubicin with β -cyclodextrin derivative increases drug intercalation into DNA, **Electrochimica Acta**, Polônia, v. 247, p. 139–148, jun., 2017.

KUMAR, P. et al. DNA binding and nuclease activity of copper (II) complexes of tridentate ligands. **Inorganica Chimica Acta**, Índia, v. 376, p. 264–270, jun., 2011.

KUMAR, S. et al. Recent insights into synthetic β -carbolines with anti-cancer activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Índia, v. 142, p. 48e73, maio, 2017.

KUNDU; GHOSH; CHATTOPADHYAY. Exploration of the binding interaction of a potential nervous system stimulant with calf-thymus DNA and dissociation of the drug–DNA complex by detergent sequestration. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Índia, v.17, p.17699-17709, 2015.

LEHN, J. M. Toward complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization. **PNAS**, França, v. 99, n. 8, p. 4763–4768, abril, 2002.

LI, D. et al. Characterization of the baicaleinebovine serum albumin complex without or with Cu^{2+} or Fe^{3+} by spectroscopic approaches. **European Journal of Medicinal Chemistry**, China, v. 46, p. 588-599, 2011.

LI, X.; YANG, Z. Interaction of oridonin with human serum albumin by isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques. **Chemico-Biological Interactions**, China, v. 232, p. 77–84, mar., 2015.

LI et al. Interactions of two food colourants with BSA: Analysis by Debye-Hückel Theory. **Food Chemistry**, China, v. 211, p. 198–205, maio, 2016.

LIEW, L. P. P. et al. Synthesis of 1-indolyl substituted b-carboline natural products and discovery of antimalarial and cytotoxic activities. **Tetrahedron**, Nova Zelândia, v. 70, p. 4910-4920, maio, 2014.

LYRA, A. C. F. **Avaliação da interação da ovalbumina, principal alérgeno natural da clara do ovo, com sulfonamidas através de estudos Espectroscópicos e de atividade biológica.** 2017. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

MANNA, A. K. Supramolecular chemistry – concepts and applications. **International Journal of Science and Research**, Índia, v. 4, n. 4, p. 892-899, 2013.

MARQUES, R. A. et al. Annonalide and derivatives: Semisynthesis, cytotoxic activities and studies on interaction of annonalide with DNA. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, Brasil, v. 179, p. 156–166, 2018.

MARTÍNEZ, R.; CHACÓN-GARCÍA, L. The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did not Work. **Current Medicinal Chemistry**, México, v. 12, p. 127-151, 2005.

MAYTI, B. et al. Photoinduced DNA and Protein Cleavage Activity of Ferrocene-Conjugated Ternary Copper(II) Complexes. **Organometallics**, Índia, v. 28, p. 1495–1505, 2009.

MCKEEVER, C.; KAISER, M.; ROZAS, I. Aminoalkyl Derivatives of Guanidine Diaromatic Minor Groove Binders with Antiprotozoal Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Irlanda, v. 56, p. 700-711, Jan., 2013.

METI, M. D. et al. Multi-spectral characterization & effect of metal ions on the binding of bovine serum albumin upon interaction with a lincosamide antibiotic drug, clindamycin phosphate. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Índia, v. 138, p. 324–330, jun., 2014.

Ministério da Saúde, BRASIL. **Formulário Terapêutico Nacional 2010: Rename 2010.** Disponível em: <http://www.uberlandia.mg.gov.br/uploads/cms_b_arquivos/14514.pdf>, acesso em 3 de janeiro de 2018.

MOLINA-BOLIVAR, J. A., et al. Spectroscopic investigation on the interaction of maslinic acid with bovine serum albumin. **Journal of Luminescence**, Espanha, v.156, p.141–149, Ago., 2014.

MUKHERJEE, A.; SINGH, B. Binding interaction of pharmaceutical drug captopril with calf thymus DNA: a multispectroscopic and molecular docking study. **Journal of Luminescence**, Índia, v. 190, p. 319–327, 2017.

NAFISI, S. et al. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. **Journal of Molecular Structure**, Iran, v.827, p.35–43, Jul., 2007.

NAFISI, S. et al. β -Carboline alkaloids bind DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Iran, v. 100, p. 84–91, maio, 2010.

NAFISI, S.; PANAHYAB, A.; SADEGHI, G. B. Interactions between β -carboline alkaloids and bovine serum albumin: investigation by spectroscopic approach. **Journal of Luminescence**, Iran, v. 132, p. 2361–2366, abr., 2012.

NAIK, P. N.; CHIMATADAR, S. A.; NANDIBEWOOR, S. T. Interaction between a potent corticosteroid drug – Dexamethasone with bovine serum albumin and human serum albumin: A fluorescence quenching and fourier transformation infrared spectroscopy study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Índia, v. 100, p. 147-159, jun., 2010.

NASCIMENTO, E. O. O. **Avaliação da interação entre derivados β -carbolínicos e DNA (*Calf thymus*) através de técnicas espectroscópicas**. 2017. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Química). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

National Cancer Institute (NHI). **Identifying Novel Drug Combinations to Overcome Treatment Resistance**, 2016. Disponível em < <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/drug-combo-resistance>>, acesso em 04 de janeiro de 2018.

NAKAGAWA, Y. et al. Mitochondrial dysfunction and biotransformation of β -carboline alkaloids, harmine and harmaline, on isolated rat hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, Japão, v. 188, p. 393–403, set., 2010.

NAUE, J. A. **Química supramolecular de tetrapiridilporfirinas associadas a complexos de platina (II)**. 2006. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, Índia, v. 14, p. 53–71, set., 2013.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Organização Mundial da Saúde (WHO), disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> >, acesso em 5 de agosto de 2017.

PAXTON, J. **Topics on drug metabolism**. Croácia: In Tech, 2012.

PIVETTA, T. et al. Novel coumarins and related copper complexes with biological activity: DNA binding, molecular docking and in vitro antiproliferative activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Itália, v. 177, p. 101–109, 2017.

PRAKASH, O. et al. Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review. **American Journal of Pharmacological Sciences**, Índia, v. 1, n. 6, p. 104-115, dez., 2013.

QAIS, F. A. Interaction of capsaicin with calf thymus DNA: A multi-spectroscopic and molecular modelling study. **International Journal of Biological Macromolecules**, Índia, v. 97, p. 392–402, jan., 2017.

RABÊLO, S. V. **Revisão de alcaloides do gênero *annona*, estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de atemoia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Pretolima-PE, 2014.

RAHMAN, Y. et al. Unravelling the interaction of pirenzepine, a gastrointestinal disorder drug, with calf thymus DNA: An in vitro and molecular modelling study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, India, v. 626, p. 1-12, maior, 2017.

RAJENDIRAN, V. et al. Mixed-Ligand Copper(II)-phenolate Complexes: Effect of Coligand on Enhanced DNA and Protein Binding, DNA Cleavage, and Anticancer Activity. **Inorganic Chemistry**, India, v. 46, p. 8208–8221, 2007.

RAMAKRISHNAN, S. Induction of Cell Death by Ternary Copper(II) Complexes of L-Tyrosine and Diimines: Role of Coligands on DNA Binding and Cleavage and Anticancer Activity. **Inorganic Chemistry**, India, v. 48, p. 1309-1322, 2009.

RAUF, S. et al. Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Paquistão, v.37, p. 205–217, 2005.

REHMAN, S. U. et al. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, India, v. 576, p. 49–60, maio, 2015.

RODRÍGUEZ, F. et al. New Bis(2-aminoimidazoline) and Bisguanidine DNA Minor Groove Binders with Potent in Vivo Antitrypanosomal and Antiplasmodial Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 909–923, 2008.

ROGGERO, C. M. et al. Efficient synthesis of eudistomin U and evaluation of its cytotoxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Estados Unidos, v.24, p. 3549–3551, Maio, 2014.

SALVIA, M., et al. Thiazotropin aggregation and its relationship to molecular recognition in the DNA minor groove. **Biophysical Chemistry**, México, v.179, p. 1–11, Abr., 2013.

SARWAR, T. et al. Interaction of coumarin with calf thymus DNA: Deciphering the mode of binding by in vitro studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, Índia, v.73, p.9–16, Nov., 2015.

SAVARIZ, F.C. et al. Synthesis, Antitumor and Antimicrobial Activity of Novel 1-Substituted Phenyl-3-[3-alkylamino(methyl)-2-thioxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl] β -Carboline Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 21, p. 288-298, 2010.

SAVARIZ, F.C. et al. Synthesis and Evaluation of New β -Carboline-3-(4-benzylidene)-4H-oxazol-5-one Derivatives as Antitumor Agents. **Molecules**, Brasil, v.17, p.6100-6113, Mai., 2012.

SAVARIZ, F.C. et al. Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carbolines and their Mannich bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.22, p.6867–6875, Out., 2014.

SEEDHER, N.; BHATIA, S. Mechanism of interaction of the non-steroidal antiinflammatory drugs meloxicam and nimesulide with serum albumin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Índia, v. 39, p. 257–262, abr., 2005.

SHAHABADI, N.; HEIDARI, L. Binding studies of the antidiabetic drug, metformin to calf thymus DNA using multispectroscopic methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Irã, v. 97, p. 406-410, Jul., 2012.

SHANKARAIHAH, N. et al., DNA-binding affinity and anticancer activity of β -carboline–chalcone conjugates as potential DNA intercalators: Molecular modelling and synthesis. **Bioorganic Chemistry**, Índia, v. 59, p. 130-139, 2015.

SHARMA. S. Spectroscopic and structural studies on the interaction of an anticancer β -carboline alkaloid, harmine with GC and AT specific DNA oligonucleotides. **Chemico-Biological Interactions**, Índia, v. 260, p. 256-262, agost., 2016.

SHI, J. et al. Characterization of interaction of calf thymus DNA with gefitinib: Spectroscopic methods and molecular docking. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, China, v.147, p. 47–55, Mar., 2015.

SILVA, C. M. et al. Studies on free radical scavenging, cancer cell antiproliferation, and calf thymus DNA interaction of Schiff bases. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, Brasil, v. 172, p. 129-138, 2017.

SILVA, D.; CORTEZ, C. M.; LOURO, S. R. W. Chlorpromazine interactions to sera albumins A study by the quenching of fluorescence. **Spectrochimica Acta Part A**, Brasil, v. 60, p. 1215–1223, 2004.

SILVA, M. M. et al. Interaction of β -Carbolines with DNA: Spectroscopic Studies, Correlation with Biological Activity and Molecular Docking. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil. vol. 27, p. 1558-1568, 2016b.

SILVA, Marina de Magalhães. **Interação entre compostos bioativos e ctDNA (Calf Thymus): uma abordagem espectroscópica**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL, 2016a.

SILVA, R. E. et al. Interação de complexo de rutênio com albumina de soro bovino para detecção amperométrica de ácido ascórbico. **Química Nova**, Brasil, v. 37, p. 1633-1638, 2014a.

SILVA, P. P. et al. Correlation between DNA interactions and cytotoxic activity of four new ternary compounds of copper(II) with N-donor heterocyclic ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Brasil, v. 132, p. 67–76, 2014b.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Paquistão, v.124, p.1–19, Abr., 2013.

SRIRAM, D. Camptothecin and its analogues: a review on their chemotherapeutic potential. **Natural Product Research**, Índia, v. 19, n. 4, p. 393–412, jun., 2005.

STREKOWSKI, L.; WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: an overview. **Mutation Research**, Estados Unidos, v. 623, p. 3-13, 2007.

STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L.; BERG, J. M. **Bioquímica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

SULEMAN, S. et al. Treatment of malaria and related symptoms using traditional herbal medicine in Ethiopia. **Journal of Ethnopharmacology**, Etiópia, v. 213, p. 262-279, 2018.

SUN, Y. et al. Studies of interaction between two alkaloids and double helix DNA. *Journal of Luminescence*, **China**, v. 156, p. 108–115, agos., 2014.

SURYAWANSHI, V. D. et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Índia, v. 6, p. 56-63, 2016.

TAYEH, N.; RUNGASSAMY, T.; ALBANI, J. R. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, França, v. 50, p. 107–116, mar., 2009.

TIAN, Z. Y. Spectroscopic Study on the interaction between Naphthalimide-Polyamine conjugates and bovine serum albumin (BSA). **Molecules**, China, v. 20, p. 16491-16523, set., 2015.

TOPALĂ, T. et al. Bovine serum albumin interactions with metal complexes. **Clujul Medical**, v. 87, n. 4., 2014.

TORRE, L. A. et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends-an update, **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 25, p. 16-17, dez., 2015.

TSE, W. C.; BOGER, D. L. Sequence-Selective DNA Recognition: Natural Products and Nature's Lessons. **Chemistry & Biology**, California, v. 11, p. 1607–1617, 2004.

TU, L. C. et al. The b-Carboline Analog Mana-Hox Causes Mitotic Aberration by Interacting with DNA. *Chemistry & Biology*, Taiwan, v. 12, p. 1317–1324, dez., 2005.

TYAGI, G.; CHARAK, S.; MEHROTRA, R. Binding of an indole alkaloid, vinblastine to double stranded DNA: A spectroscopic insight in to nature and strength of interaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, India, v.108, p. 48–52, jan., 2012.

VARSHEY, D.B. et al. Supramolecular interactions. **Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials**. 1 ed. Hoboken: Wiley, 2012.

WALKER, N. F.; NADJM, B.; WHITTY, C. J. M. Malaria. **Medicine**, v. 46, p.52-58, jan., 2018.

WINK, M. **Annual plant review: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**. 2 ed., v. 40, Blackwell Publishing L., 2010.

WHEATE, N. J., et al. DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Austrália, v.7, p. 627-648, Jul., 2007.

WU, J. et al. Novel N-(3-carboxyl-9-benzylcarboline-1-yl)ethylamino acids: synthesis, anti-proliferation activity and two-step-course of intercalation with calf thymus DNA. **Molecular BioSystems**, China, v. 3, p. 855–861, out., 2007.

WU, J. et al. A class of novel carboline intercalators: Their synthesis, in vitro anti-proliferation, in vivo anti-tumor action, and 3D QSAR analysis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, China, v. 18, p. 6220–6229, jul., 2010.

XIAO, S. et al. Synthesis and biological evaluation of DNA targeting flexible side-chain substituted β -carboline derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter**, China, v. 11, p. 437-441, nov., 2010.

XIE, Meng-Xia. et al. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. **Biochimica et Biophysica**, China, v. 1760, p. 1184–1191, abr., 2006.

YOU, L.; ZHA, D.; ANSLYN, E. V. Recent Advances in Supramolecular Analytical Chemistry Using Optical Sensing. **Chemical Reviews**, China, v. 115, p. 7840–7892, 2015.

YU, X. et al. Study on the interaction between carbonyl-fused N-confused porphyrin and bovine serum albumin by spectroscopic techniques. **Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, Inglaterra, v.133, p.372–377, 2014.

YU, A. et al. Contribution of Individual Cytochrome P450 Isozymes to the O-Demethylation of the Psychotropic -Carboline Alkaloids Harmaline and Harmine. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, Suíça, v. 305, p. 315–322, 2003.

YUE, Y. et al. Interaction of nobiletin with human serum albumin studied using optical spectroscopy and molecular modeling methods. **Journal of luminescence**, Inglaterra, v.128, p.513–520, Mar., 2008.

ZHANG, G. et al. Interaction of the irisfloreantin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. **Journal of Molecular Structure**, China, v. 891, p. 93-97, mar., 2008.

ZHANG, G. et al. Spectroscopic investigation of the interaction between chrysin and bovine serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, China, v.921, p. 346–351, fev., 2009.

ZHANG, G. et al. Interaction of alpinetin with bovine serum albumin: Probing of the mechanism and binding site by spectroscopic methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 76, p. 410–417, abr., 2010.

ZHANG, G., et al. Multispectroscopic studies on the interaction of maltol, a food additive, with bovine serum albumin. **Food chemistry**, Reino Unido, v.133, p.264–270, Jul., 2012.