



Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)
Campus A.C. Simões, Cidade Universitária, Av. Lourival Melo Mota,
Tabuleiro dos Martins, Maceió, Alagoas, CEP: 57072-970



ALEF DENYS DA SILVA LIMA

**BERENIL COMO SONDA DE MARCAÇÃO DE MODO DE LIGAÇÃO COM
DNA**

Maceió - AL
2019

ALEF DENYS DA SILVA LIMA

**BERENIL COMO SONDA DE MARCAÇÃO DE MODO DE LIGAÇÃO COM
DNA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Isis Martins Figueiredo

Co-orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Maceió - AL
2019



Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)

Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C. Simões,
Maceió-AL, 57072-970, Brasil.

www.iqb.ufal.br // Tel: (82) 3214-1384/1189



ATA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DE TCC - IQB

1. Data da apresentação do TCC: 22/02/2019

2. Aluno / matrícula: ALEF DENYS DA SILVA LIMA

3. Orientador(es) / Unidade Acadêmica: Prof Dr Isis Martins Figueiredo
Prof Dr. Josué C. Caldas Santos

4. Banca Examinadora (nome / Unidade Acadêmica):

ISIS MARTINS FIGUEIREDO	(Presidente)	Nota: 9,0
ANA MARIA QUEIJEIRO LOPEZ	(1º avaliador)	Nota: 10,0
MARIA ESTER DE SA BARRETO BARROS	(2º avaliador)	Nota: 9,0
	(3º avaliador)	Nota: _____

5. Título do Trabalho: BERENIL COMO SONDA DE MARCAÇÃO DE MODO DE LIGAÇÃO COM DNA.

6. Local: SALA DE REUNIOES DO IQB

7. Apresentação: Horário início: 9:05 h Horário final: 9:30 h
Arguição: Horário início: 9:30 h Horário final: 11:00 h

8. Nota final: 9,3

9. Justificativa da nota. Em caso de APROVAÇÃO COM RESTRIÇÕES, indicar as principais alterações que devem ser efetuadas no trabalho para que o mesmo venha a ser aprovado.

Em sessão pública, após exposição do seu trabalho de TCC por cerca de 25 minutos, o candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca por 90 minutos, tendo como resultado:

APROVADO

APROVADO COM RESTRIÇÕES – mediante modificações no trabalho que foram sugeridas pela banca como condicional para aprovação.

NÃO APROVADO.



Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)

Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C. Simões,
Maceió-AL, 57072-970, Brasil.
www.iqb.ufal.br // Tel: (82) 3214-1384/1189



Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo candidato:

Maceió, 22 de Setembro de 2019

Presidente:

1º Avaliador:

2º Avaliador:

3º Avaliador:

Candidato:

João M. D. Siqueira

Luiz

Luana Estan de S. Bonnetto Bonnes

Prof. Denys da Silva Lima

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Valéria e Denilson, por todo o esforço e amor incondicional que me trouxeram até aqui. Sem vocês eu não seria nada, e espero um dia lhes retribuir por todo o apoio que sempre recebi, seja qual fosse a minha decisão!

AGRADECIMENTOS

Seja qual for a entidade espiritual que nos rege, meu primeiro agradecimento vai para o Deus que existe na minha vida e que sempre intercedeu por mim, sinto sua presença e a paz que me cerca, a saúde que me é dada e pelo dom da vida que me foi concedida.

A minha mãe Maria Valéria que acima de tudo e de todos, me deu seu amor, proteção, compreensão e apoio, te amo mais do que tudo! Muito obrigado por todo o esforço na minha criação, serei eternamente grato pela pessoa que me tornei graças à senhora e ao meu amado pai.

Ao meu super-pai, Denilson Lima, por me ensinar o significado da palavra herói, minhas conquistas se refletem em toda sua luta e dedicação. Obrigado por sempre se superar em nome do amor paterno, te amo infinitamente!

A minha irmã Camilla Lima, por todo amor, torcida e por ser minha companheira de vida. Amo você e nunca se esqueça do quanto és especial pra mim!

A toda minha família, por tantos momentos felizes e pelo apoio. Em especial ao meu primo Fábio Oliveira, por incentivar os meus estudos e servir-me de espelho. Obrigado!

Ao meu namorado Ricardo Silvestre, por me mostrar a beleza da vida compartilhada, por segurar a minha mão e me fazer acreditar que o amor vence todas as barreiras. Meu amor, espero te retribuir toda a felicidade que você me proporciona, minhas vitórias são suas também, obrigado por tudo!

Aos meus orientadores prof^a Dr^a Isis Figueiredo e prof. Dr. Josué Carinhanha, por terem sido meus pilares na universidade, sem a sabedoria e dedicação de vocês eu não teria chegado até aqui. Muito obrigado pelo apoio, compreensão, oportunidade e amizade!

A todos os queridos companheiros do LINQA, por todo apoio e companheirismo no nosso laboratório que mais se parece um lar. Me sinto honrado de ter feito parte desse grupo!

A minha querida amiga Marina Magalhães, por ser tão prestativa, acolhedora e sobretudo uma mulher forte e sábia a quem tomarei como exemplo pro resto da vida. Obrigado por ter feito tanto por mim!

Aos meus bons e melhores amigos: Aline Mendonça, Augusto Christoff, Ádila Dantas, Ávila Menezes, Bárbara Dias, Beatriz Nogueira, Erick Hanon, Fillipe Beltrão, Hilda Cavalcante, Laura Beatriz. Vocês foram, são e serão meus alicerces, minhas bússolas e eternos amigos. Sou imensamente grato a cada um de vocês, que em diferentes etapas da minha vida, foram essenciais para o meu crescimento, vocês são a razão da minha felicidade! Muito obrigado por todo amor, companheirismo, lealdade e simplicidade, pois a gente sempre foi feliz com pouco!

A todos os amigos que não estão listados aqui, mas que são tão importantes quanto. O apoio de tanta gente foi fundamental para que hoje eu estivesse aqui, muito obrigado a todos que cruzaram o meu caminho e escolheram ficar!

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

“Aqueles que podem imaginar qualquer coisa, podem criar o impossível”.

Alan Turing.

RESUMO

O DNA está envolvido em diversos processos biológicos importantes e compreender seu modo de ligação à pequenas moléculas é fundamental para o desenvolvimento de fármacos seletivos a este alvo. Uma forma de avaliar estas interações é por meio de estudos de competição do composto de interesse com sondas fluorescentes *off-on*, que não apresentam fluorescência livres, contudo emitem na presença de DNA. Quando o composto a ser avaliado não emite fluorescência ou emite numa faixa espectral $640 < \lambda_{\text{máx}} < 400$ nm, a utilização de sondas comerciais, tais como DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol) (λ_{em} 420-540 nm), Hoeschst 33258 (bis-benzimida) (λ_{em} 410-500 nm) e Tioflavina T (λ_{em} 400-500 nm) para modo *groove* e Brometo de Etídio (λ_{em} 560-640 nm), Acridina Orange (λ_{em} 510-550 nm), Berberina (λ_{em} 500-530 nm) e Tiazol Orange (λ_{em} 500-540 nm) para modo intercalante, se torna adequada. Porém, caso o composto emita entre 400-640 nm o uso destas sondas se torna inadequado devido à presença de interferências espectrais. Assim, a utilização do berenil (aceturato de diminazeno) como sonda de marcação para processos de interação com DNA se torna atraente, uma vez que seu uso como tal ainda não foi explorado e não apresenta fluorescência livre ou ligada ao DNA, o que evita possíveis interferências. Neste trabalho, analisou-se a influência da proporção composto/DNA (1:5; 1:10 e 1:20) e da força iônica (NaCl 0; 25; 50 e 100 mM) em relação a capacidade do BE em deslocar as sondas comerciais, utilizando K_{SV} (constante de Stern-Volmer) como parâmetro de avaliação. Em todos os sistemas avaliados o BE mostrou-se eficiente, deslocando as sondas avaliadas independente da salinidade do meio. Constatou-se a dualidade do modo de ligação do berenil em função de sua concentração no meio, de forma que os ligantes *groove* foram deslocados com até 2,5 μM de berenil, enquanto que para os intercalantes foi preciso em torno de 30,0 μM do mesmo. Desta forma, o berenil se mostrou uma boa alternativa para estudos de interação entre pequenos ligantes e DNA.

Palavras-chave: berenil; interação com DNA; fluorescência molecular; sondas fluorescentes.

ABSTRACT

DNA is involved in several important biological processes and understanding its mode of binding to small molecules is critical for the development of selective drugs at this target. An alternative to evaluate these interactions is through competitive studies of the compound of interest with fluorescent off-on probes, which do not show free fluorescence, but emit in the presence of DNA. When the compound to be evaluated does not emit fluorescence or emits in a spectral range $640 < \lambda_{\text{max}} < 400$ nm, the use of commercial probes, such as DAPI (4',6'-diamino-2-phenyl-indol) (λ_{em} 420-540 nm), Hoeschst 33258 (bis-benzimidazole) (λ_{em} 410-500 nm) and Thioflavin T (λ_{em} 400-500 nm) for groove mode and Ethidium Bromide (λ_{em} 560-640 nm), Acridine Orange (λ_{em} 510-550 nm), Berberine (λ_{em} 500-530 nm) and Thiazole Orange (λ_{em} 500-540 nm) for intercalating mode, becomes suitable. However, if the compound emits between 400-640 nm the use of these probes becomes inadequate due to the presence of spectral interferences. Thus, the use of berenil (diminazene aceturate) as a labeling probe for DNA interaction processes becomes attractive, since its use as such has not yet been explored and because it does not present free or DNA bound fluorescence, avoiding these possible interferences. In this work, the influence of the composite / DNA ratio (1: 5, 1:10 and 1:20) and the ionic strength (NaCl 0, 25, 50 and 100 mM) on the ability of the BE to displace the probes using K_{SV} (Stern-Volmer constant) as the evaluation parameter. In all evaluated systems the BE proved to be efficient, shifting the probes independent of the salinity of the system. The duality of the mode of binding of the berenil was verified as a function of its concentration in the medium, so that the groove binders were displaced with up to 2.5 μM of berenil, whereas for the intercalators it was necessary around 30.0 μM the same. In this way, berenil presents itself as a good alternative for interaction studies between small ligands and DNA.

Keywords: berenil; interaction with DNA; molecular fluorescence; fluorescent probes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura tridimensional do DNA duplex.....	13
Figura 2 – Conformações do DNA dupla fita.....	14
Figura 3 – Modo de ligação covalente.....	15
Figura 4 – Ilustração geral do modo de ligação não-covalente DNA-ligante.....	16
Figura 5 – Estrutura molecular do Hoechst 33258.....	21
Figura 6 – Estrutura molecular do DAPI.....	21
Figura 7 – Estrutura molecular da Tioflavina T.....	22
Figura 8 – Estrutura molecular do Brometo de Etídio.....	22
Figura 9 – Estrutura molecular da Acridina Orange.....	23
Figura 10 – Estrutura molecular da Berberina.....	23
Figura 11 – Estrutura molecular do Tiazol Orange.....	24
Figura 12 – Estrutura do Berenil.....	25
Figura 13 – a), b) e c) Espectros de fluorescência obtidos a partir de adições crescentes de berenil (sondas <i>groove</i> : 0,1; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,50; 2,50 μ M e sondas intercalantes: 0,1; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,50; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 μ M) para HO, TT e EB respectivamente; d), e) e f) curvas de linearização.....	33
Figura 14 – Variação do K_{sv} em função da concentração de DNA para as titulações espectrofluorimétricas com berenil das sondas a) HO, b) TT e c) EB	35
Figura 15 – Variação do K_{sv} em função da concentração de NaCl para as titulações espectrofluorimétricas com berenil das sondas a) HO, b) TT e c) EB	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sondas fluorescentes para estudos DNA-ligante.....	19
Tabela 2 – Parâmetros experimentais otimizados.....	33
Tabela 3 – Constantes de Stern-Volmer das sondas avaliadas.....	35

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A – Adenina

BE – Berenil

C – Citosina

ctDNA- DNA Calf thymus

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EB – Brometo de etídio

F – Fluorescência

G – Guanina

HO – Hoechst 33258

K_{sv} – Constante de Stern-Volmer

T – Timina

TT – Tioflavina T

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1 Importância do DNA	13
1.2 Características gerais do DNA	13
1.3 Modos de ligação DNA-ligante	14
1.3.1 Modo de ligação covalente	15
1.3.2 Modo de ligação não-covalente	15
1.4 Técnicas utilizadas para avaliar interações DNA-ligante	17
1.4.1 Espectroscopia de absorção no UV-Visível	17
1.4.2 Espectroscopia de fluorescência molecular	18
1.5 Sondas fluorescentes	19
1.5.1 Sondas fluorescentes para modo de ligação groove	20
1.5.2 Sondas fluorescentes para modo de ligação via intercalação	22
1.6 Berenil	24
2. Objetivos	27
2.1 Geral	27
2.2 Específicos	27
3. Experimental	29
3.1 Preparação de soluções estoque	29
3.2 Equipamentos utilizados	29
3.3 Procedimentos	30
3.3.1 Cálculo da concentração do DNA (<i>Calf thymus</i>)	30
3.3.2 Interação DNA-ligante por espectrofluorimetria	30
3.3.2.1 Avaliação do efeito da concentração de DNA no complexo DNA-ligante	30
3.3.2.2 Avaliação do efeito da força iônica no meio	31
4. Resultados	32
4.1 Estudos preliminares	32
4.2 Ensaio de competição com berenil	32
4.2.1 Avaliação do efeito da concentração de DNA no meio	32
4.2.2 Avaliação do efeito da força iônica no meio	36
5. Conclusões	38
6. Referências	40

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução Geral

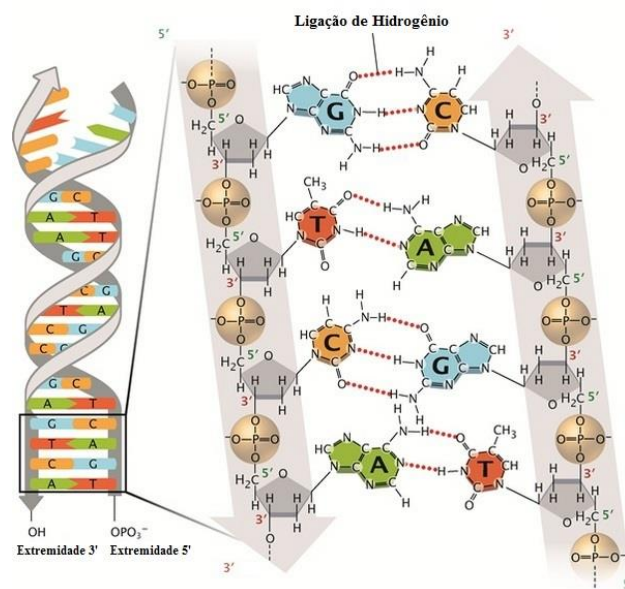
1.1 Importância do DNA

Desde a descoberta de sua estrutura, o DNA (ácido desoxirribonucleico) se tornou um importante objeto de estudo para a ciência. Esta macromolécula está envolvida em diversos processos biológicos, como transcrição e tradução do código genético, reconhecimento celular, regulação da expressão genética por proteínas que se ligam ao DNA, entrada de um vírus numa célula e, principalmente, é alvo primário de diversas moléculas com ações terapêuticas importantes, desde agentes anticâncer a antibióticos (REHMAN, 2015; LEHN, 1996).

1.2 Características gerais do DNA

Para qualquer estudo que envolva o DNA, é necessário primeiro conhecer a sua estrutura, bem como algumas de suas propriedades químicas. De acordo com o modelo tridimensional proposto por Watson e Crick, o DNA possui duas cadeias helicoidais que se complementam em torno do mesmo eixo, formando uma dupla hélice (duplex) de orientação à direita, como mostra a figura 1 (NELSON; COX, 2014).

Figura 1. Estrutura tridimensional do DNA duplex.

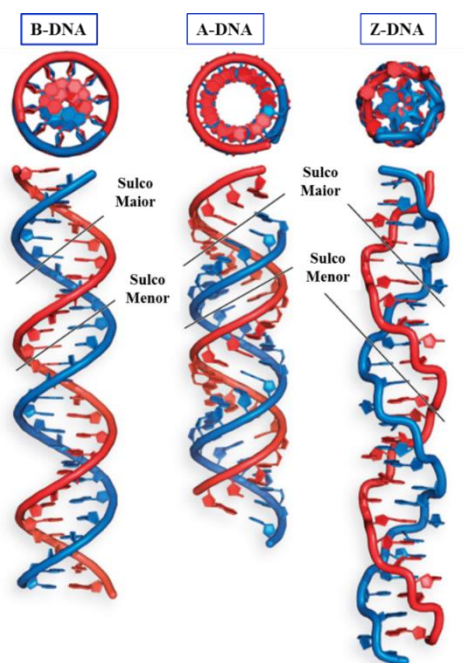


Fonte: PRAY, 2008.

O esqueleto das fitas é constituído externamente de grupos fosfato carregados negativamente (PO₄³⁻) alternados com moléculas de desoxirribose, e pares de bases nitrogenadas empilhados dentro da dupla hélice. Estas bases são subdivididas em dois

grupos: as pirimidinas (citosina e timina) e as purinas (adenina e guanina). No DNA, adenina (A) e timina (T) se ligam através de duas ligações de hidrogênio e guanina (G) e citosina (C) formam três ligações de hidrogênio (figura 1). Esse modelo estabelece a regra de Chargaff, que diz que em qualquer DNA a quantidade de adenina é equivalente à de timina e a quantidade de guanina equivale a de citosina. Devido a possibilidade de rotação das ligações glicídio-fosfato, o DNA pode assumir formas de hélices diferentes, como a A-DNA, a Z-DNA e, como também é conhecido o modelo de Watson e Crick, a forma B-DNA (figura 2). A maior estabilidade para esta última se deve principalmente pelas ligações de hidrogênio entre os pares de bases complementares e as interações de empilhamento das bases (NELSON; COX, 2014).

Figura 2. Conformações do DNA dupla fita.



Fonte: adaptado por COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O' DONNELL, 2012.

Conhecendo melhor a estrutura do DNA e suas principais características, pode-se aprofundar os estudos sobre as interações entre esta macromolécula e pequenos ligantes.

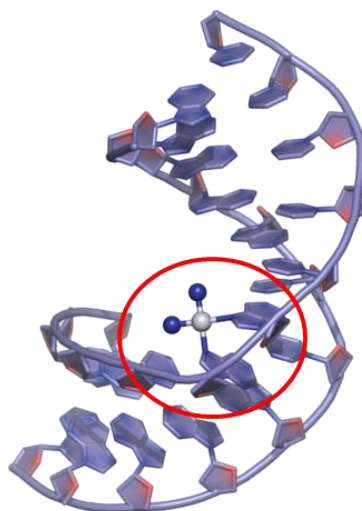
1.3 Modos de ligação DNA-ligante

A compreensão do modo de ligação de moléculas que interagem com o DNA se tornou o foco de muitos pesquisadores, principalmente para o desenvolvimento de sondas moleculares para o DNA e de novos agentes terapêuticos, tais como fármacos anticâncer (LIU, et al., 2015). Estas pequenas moléculas podem se ligar ao DNA de forma covalente e não-covalente, e a elucidação deste modo de ligação é fundamental no processo de interação DNA-ligante (SHAHABADI; HEIDARI, 2012).

1.3.1 Modo de ligação covalente

A interação covalente entre moléculas e o DNA ocorre de forma direta, onde uma espécie altamente eletrofílica reage com os grupos nucleofílicos da macromolécula, formando ligações covalentes (figura 3).

Figura 3. Modo de ligação covalente.



Fonte: retirado de <<https://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions#Platinum-complexes>>

Este tipo de ligação leva a formação de um aduto DNA-ligante irreversível, que inibe atividades como transcrição e tradução genética, levando à morte celular (HASANZADEH; SHADJOU, 2016).

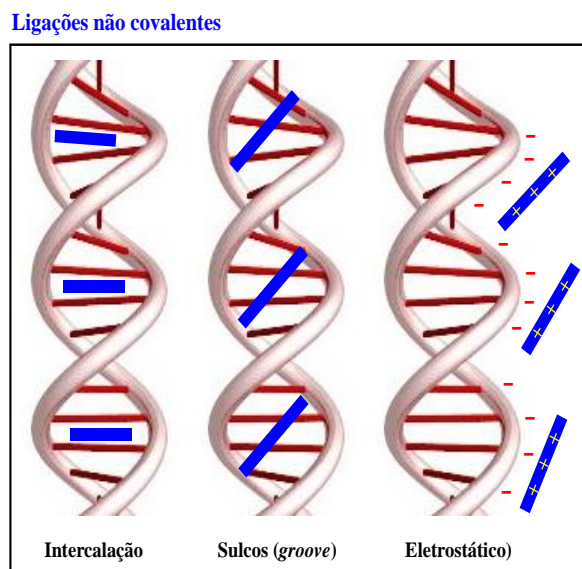
1.3.2 Modo de ligação não-covalente

Pequenas moléculas podem se ligar ao DNA de forma não-covalente, e esta pode ocorrer através de 3 modos: *groove*, intercalação e interações eletrostáticas, como é mostrado na figura 4 (SARWAR, et al., 2015).

Intercalação: é caracterizada pela inserção de moléculas perpendicularmente no DNA, entre os pares de bases, sem formar ligações covalentes (MARTINEZ; CHACON-GARCIA, 2005). Estas moléculas contêm grupos heterocíclicos planares e o complexo formado com o DNA é estabilizado principalmente por interações de empilhamento π - π entre o ligante e os pares de bases, causando fortes perturbações estruturais na macromolécula (SHAIKH; JAYARAM, 2019). Várias forças intermoleculares, como as de van der Waals, ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas, mantêm a estabilidade

de um complexo DNA-intercalante, tornando a macromolécula mais estável do que em sua forma livre (ZHANG, et al., 2016)

Figura 4. Ilustração geral do modo de ligação não-covalente DNA-ligante.



Fonte: adaptado de BARRA; NETTO, 2015.

Groove: ocorre quando a molécula interage diretamente com as bases nitrogenadas nos sulcos, tanto o menor quanto o maior, do DNA (figura 2). Este tipo de interação envolve ligações de hidrogênio ou forças de van der Waals e não causa muitos danos na estrutura da macromolécula (MARTINEZ; CHACON-GARCIA, 2005). O elevado potencial eletrostático negativo dos sulcos do DNA é uma característica importante que possibilita esse modo de ligação (BARONE, et al., 2013). Diferente das moléculas intercalantes, ligantes do tipo *groove* possuem estruturas flexíveis, uma vez que neste tipo de interação as moléculas são “acomodadas” nas ranhuras (sulcos) da dupla hélice. Além disso, estes ligantes geralmente possuem átomos capazes de formar ligação de hidrogênio com os grupos fosfatos presentes no esqueleto do DNA (CHAIRES, 2006).

Interação eletrostática: pequenas moléculas orgânicas que possuem carga positiva (cátions) podem interagir com a cadeia fosfatídica de carga negativa do DNA, por um processo denominado condensação de contra-íons (STREKOWSKI; WILSON, 2007). Neste tipo de interação, há a contribuição entrópica dos contra-íons formados para a energia livre de ligação (MANNING, 1978). Além disso, a interação das cargas depende da concentração dos cátions em solução e geralmente são fracas sob condições fisiológicas (STREKOWSKI; WILSON, 2007).

A determinação do modo de ligação ao DNA de pequenas moléculas é crucial para desvendar sua possível genotoxicidade. O complexo DNA-ligante pode resultar em alterações na expressão genética e influenciar a proliferação celular. Desta forma, entender os mecanismos de ligação DNA-ligante é decisivo na previsão das consequências dessas interações no corpo humano (WILLIAMS, et al., 2012).

1.4 *Técnicas utilizadas para avaliar interações DNA-ligante*

Por seu papel fundamental nos processos biológicos, grandes esforços foram dedicados durante as últimas décadas para o desenvolvimento de metodologias que permitissem não só a quantificação, mas também as interações de moléculas com DNA em diversos tipos de amostras (COSNIER; MAILLEY, 2008). Diversas técnicas foram desenvolvidas dentro desse contexto, como eletroforese e microarranjo de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR), métodos de *blotting*, etc. Contudo, a maioria dessas técnicas necessitavam de transdutores de sinais para transformar a resposta do equipamento em um sinal mensurável e tais transdutores eram comumente reagentes químicos radioativos (GIRARD; LAUGHTON; NIKJOO, 2012).

Para superar esses problemas, métodos não-radioativos baseados em técnicas eletroquímicas e técnicas óticas têm sido bastante desenvolvidos e aprimorados, com destaque para os métodos baseados no fenômeno da fluorescência molecular. Devido à simplicidade e alta sensibilidade da técnica, muitas sondas fluorescentes com princípio “*turn-on*” têm sido desenvolvidas para detecção de DNA, que na presença do ácido nucléico aumenta significativamente sua intensidade de emissão (MURUDKAR, et al., 2014). Nesse estudo foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de absorção UV-Vis e espectroscopia de fluorescência molecular.

1.4.1 Espectroscopia de absorção no UV-Visível

Com esta técnica, dentre outras aplicações, é possível calcular a concentração de espécies a partir do monitoramento de mudanças nas propriedades óticas das mesmas. Particularmente, pode-se calcular a concentração de DNA através da absorção no UV-Vis baseando-se na Lei de Lambert-Beer, que relaciona a absorvância e a concentração de uma solução que é atravessada por um feixe de luz monocromática (SKOOG, et al., 2006). O cálculo da concentração é feito com base no coeficiente de extinção $6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a partir da medida do sinal de absorvância em 260 nm (comprimento de onda

máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) do DNA), após a diluição na proporção de 1:100 (SAVARIZ, et al., 2014).

A razão de absorvância A_{260}/A_{280} é utilizada para garantir a pureza do DNA caso esteja entre 1,8 – 1,9, indicando que o DNA está seguramente livre de proteínas, uma vez que A_{280} se refere ao comprimento de onda de absorção das proteínas (aminoácidos como triptofano, tirosina e fenilalanina)(GLASEL, 1995).

1.4.2 Espectroscopia de fluorescência molecular

Devido, principalmente, a sua alta sensibilidade, ampla faixa de concentração e seletividade, esta técnica é possivelmente a mais usada em estudos de interação DNA-ligante (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). É baseada na absorção de radiação por uma espécie, em um determinado comprimento de onda (λ_{exc}), cujo elétron é excitado para um nível de maior energia. Logo após a excitação, essa energia recebida é perdida devido alguns processos de relaxação não-radioativos, e em seguida o elétron retorna ao seu estado fundamental, emitindo a energia residual na forma de fóton (SKOOG, et al., 2006).

Através da espectroscopia de fluorescência molecular é possível analisar vários parâmetros relacionados à interação DNA-ligante, um deles é o modo de ligação das moléculas. Tal parâmetro é avaliado pelo monitoramento de mudanças espectrais nas propriedades de emissão de fluorescência da espécie na presença e ausência de DNA, realizando ensaios de competição com sondas fluorescentes que possuem seu modo de ligação à macromolécula bem definido (LAKOWICZ, 2006).

Quando livre, o DNA exibe baixa emissão de fluorescência intrínseca, mas ao ser complexado à determinadas sondas moleculares há um aumento significativo na intensidade de emissão de fluorescência. Existe uma variedade de moléculas usadas com esta finalidade, podendo ser citadas Hoechst 33258 (HO), DAPI e Tioflavina T, que possuem modo de ligação preferencial via *groove*, e Brometo de Etídeo, Berberina, Acridina Orange e Tiazol Orange, que são preferencialmente intercalantes (LAKOWICZ, 2006). Desta forma, sabendo o modo de ligação da sonda, a presença de um ligante que tenha o mesmo tipo de interação levará a uma “competição” pelo mesmo sítio de ligação no DNA, e assim a sonda será deslocada da porção em que está complexada, ocasionando uma diminuição na intensidade de fluorescência (SAVARIZ, et al., 2014). Analogamente, caso não haja mudanças espectrais do complexo sonda-DNA, o modo de ligação da

molécula avaliada pode ocorrer por outro mecanismo. A diminuição da intensidade de fluorescência pode ser descrita através da equação de Stern-Volmer:

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

onde F_0 e F são as intensidades da emissão de fluorescência antes e depois da adição do *quencher* (molécula que provoca a diminuição da fluorescência), respectivamente; $[Q]$ é a concentração do *quencher* e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer, que é obtida através do coeficiente angular do gráfico F_0/F versus $[Q]$ (NASCIMENTO, 2017).

1.5 Sondas fluorescentes

Uma metodologia bastante utilizada para avaliar estas interações é o emprego de sondas fluorescentes baseadas no conceito *off-on*, por meio de estudos de competição com o composto de interesse. Esse conceito, também denominado sistema “desligado-ligado”, são preferíveis nesse tipo de estudo devido ao aumento considerável da intensidade de fluorescência das sondas na presença de ácidos nucleicos, sobretudo de DNA (MURUDKAR, et al., 2014). Nesse caso, a sonda não apresenta fluorescência livre, contudo emite na presença de DNA e então o sinal é medido pela mudança no comportamento espectral do complexo DNA-sonda frente ao analito (LIMA, 2017). Quando o composto a ser avaliado não emite fluorescência intrínseca ou emite numa faixa espectral $640 < \lambda_{m\acute{a}x} < 400$ nm, a utilização de sondas fluorescentes bem estabelecidas na literatura se torna adequada (LAKOWICZ, 2006). Alguns exemplos de sondas mais conhecidas estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Sondas fluorescentes para estudos DNA-ligante.

Sonda	Faixa espectral de emissão (nm)
Hoechst 33258	410-500
DAPI	420-540
Tioflavina T	400-500
Brometo de Etídio	560-640
Acridina Orange	510-550
Berberina	500-530
Tiazol Orange	500-540

Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

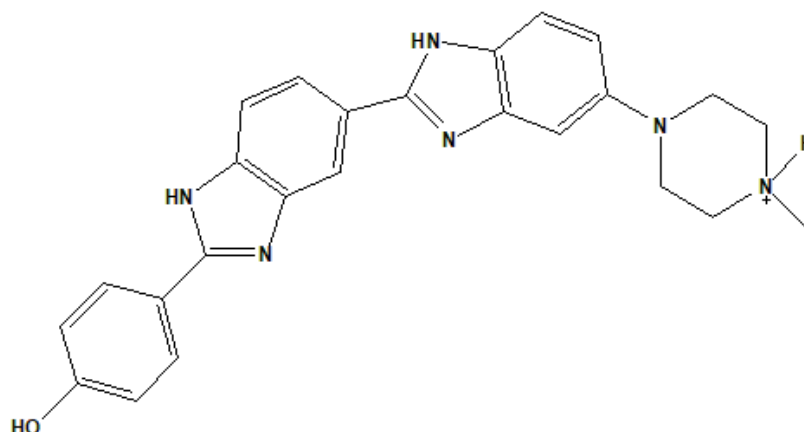
Contudo, caso o composto emita entre 400-640 nm o uso destas sondas se torna inadequado devido a possíveis interferências espectrais.

1.5.1 Sondas fluorescentes para modo de ligação *groove*

Na literatura pode-se encontrar uma grande variedade de moléculas com seus modos de ligação bem estabelecidos. Neste trabalho, as sondas a serem avaliadas foram divididas em dois grupos: as que se ligam ao DNA preferencialmente via sulcos (*groove*) e as sondas intercalantes. Dentre várias possibilidades, nesse estudo foram utilizadas: Hoechst 33258, DAPI e Tioflavina T para modo de ligação via *groove*:

a) Hoechst 33258 (HO): é um derivado bis-benzimidazol (figura 5), bastante utilizado para marcar ácidos nucléicos e que emite fluorescência 20 vezes mais forte quando se liga ao DNA do que comparado, por exemplo, ao brometo de etídio (comumente usado como sonda molecular para modo de ligação intercalante em ensaios de competição) (GUAN, et al., 2006). Esta molécula se liga com grande afinidade ao sulco maior (*groove* maior) do DNA dupla-hélice, com preferência às regiões ricas em pares de bases A-T (DOWNS; WILFINGER, 1983).

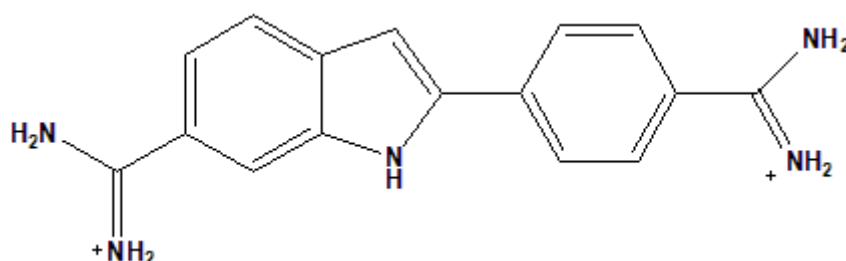
Figura 5. Estrutura molecular do Hoechst 33258.



Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

b) DAPI: esta molécula pertence ao grupo das diamidinas aromáticas (figura 6) e apresenta uma variedade de efeitos biológicos. Além disso, é também muito utilizado como ligante no sulco menor do DNA, com preferência aos pares de bases A-T (FARAHAT, et al., 2016). Apesar do modo de ligação preferencial ser via *groove*, alguns trabalhos reportam a possibilidade de o DAPI interagir via intercalação aos pares de bases G-C, porém em menor proporção (WILSON, et al., 1990).

Figura 6. Estrutura molecular do DAPI.

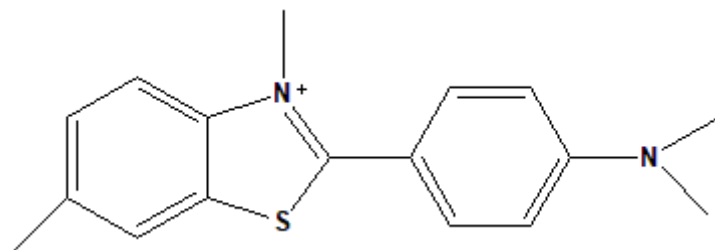


Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

c) Tioflavina T (TT): uma molécula que possui em sua estrutura um núcleo benzotiazólico, contendo um grupo metila ligado ao nitrogênio do anel, conferindo uma carga positiva fixa (figura 7). Dentre várias aplicações, há estudos de interação com DNA monitorados por fluorescência molecular, foco do presente trabalho. Possui baixo rendimento quântico em sistema aquoso, contudo ao interagir com DNA há um aumento considerável na intensidade de emissão de fluorescência (até duas vezes maior que a do DAPI) (LIMA, 2017). De acordo com o trabalho de Murudkar e colaboradores (2014), foi constatado que o a TT se liga ao DNA por dois modos preferenciais: interações eletrostáticas e intercalação, ao contrário de Ilanchelian e

Ramaraj (2004) que constataram a TT se liga preferencialmente por interações eletrostáticas e via *groove*. Apesar dessa inconsistência sobre o modo de ligação, um estudo com enfoque na interação TT-DNA demonstrou que preferencialmente ocorre a ligação no sulco do DNA (LIMA, 2017).

Figura 7. Estrutura molecular da Tioflavina T.



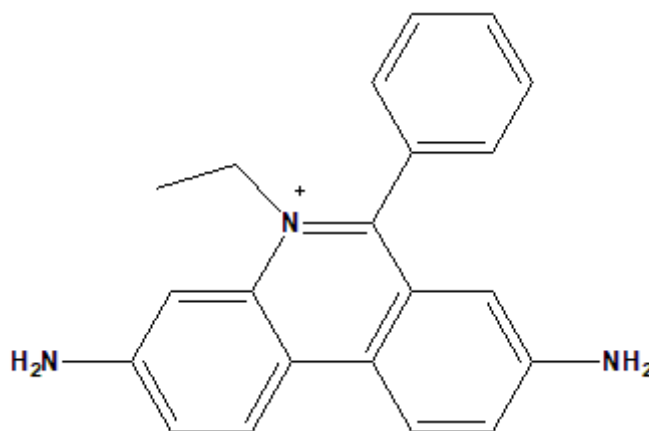
Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

1.5.2 Sondas fluorescentes para modo de ligação via intercalação

Já para avaliar a interação via intercalação, foram escolhidas as seguintes sondas: Brometo de etídio, Acridina orange, Berberina e Tiazol orange.

a) Brometo de etídio (EB): é uma conhecida sonda fluorescente (figura 8) que se intercala no DNA, muito utilizada para marcar ácidos nucleicos em células vivas (VIA; DOGLIA, 2009). Na sua forma livre apresenta baixa emissão de fluorescência, porém quando se intercala ao DNA ocorre um aumento considerável da intensidade de fluorescência.

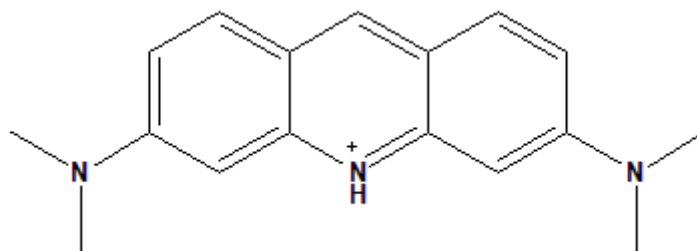
Figura 8. Estrutura molecular do Brometo de Etídio.



Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

b) Acridina Orange: é um conhecido corante orgânico (figura 9) utilizado em diversas áreas, desde engenharia à biologia. Durante décadas tem sido investigada devido às suas extensas aplicações, com destaque para os efeitos carcinogênicos. Possui dois modos de ligação ao DNA conhecidos: interação eletrostática e intercalação entre os pares de bases do DNA (AMADO, et al., 2017). Apresenta baixa emissão de fluorescência quando livre, porém ao intercalar no DNA há um significativo aumento na intensidade do sinal de fluorescência.

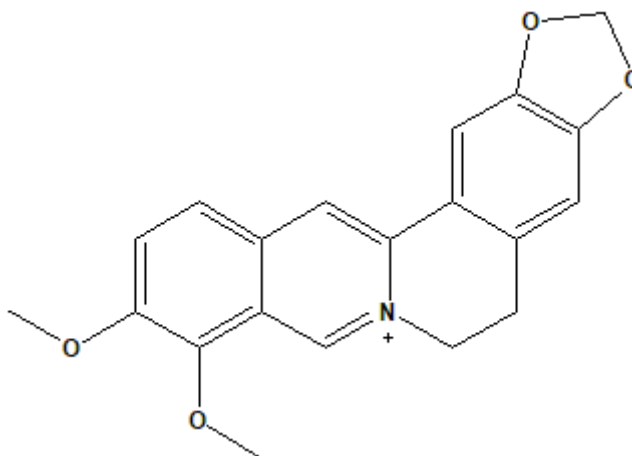
Figura 9. Estrutura molecular da Acridina Orange.



Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

c) Berberina: é uma isoquinolina alcaloide (figura 10) natural de plantas com diversas atividades farmacológicas e biológicas, com destaque para as atividades anticâncer que despertaram o interesse dos laboratórios nessa molécula. Seu modo de ligação ao DNA é bem estabelecido, com maior contribuição do modo intercalante, mas também pode interagir com os sulcos do DNA (BHADRA, et al., 2008). Da mesma forma que as moléculas listadas anteriormente, também emite baixa fluorescência quando livre, contudo ao se ligar ao DNA ocorre o aumento do sinal de emissão.

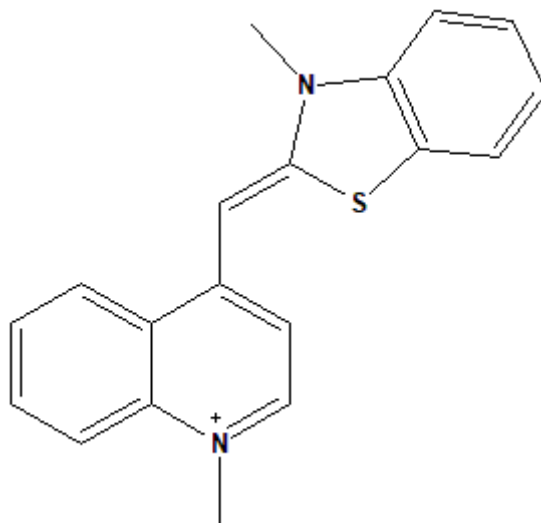
Figura 10. Estrutura molecular da berberina.



Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

d) Tiazol Orange: pertence à classe das cianinas assimétricas (figura 11) e é utilizado como sonda de marcação, que essencialmente apresenta baixa emissão de fluorescência em solução aquosa, contudo possui intensa fluorescência quando interage com ácidos nucleicos. Na literatura é conhecido como agente intercalante, mas também exibe outros modos minoritários de ligação como via *groove* e interação eletrostática (KANG, et al., 2016).

Figura 11. Estrutura molecular do Tiazol Orange.

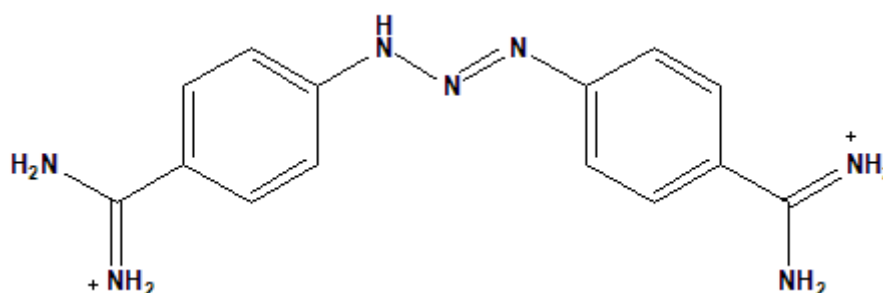


Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

A utilização das sondas fluorescentes comerciais em estudos de interação DNA-ligante se tornou um bom método de avaliação do modo de ligação de pequenas moléculas. Contudo, se a espécie de interesse emite fluorescência na mesma faixa espectral que as sondas disponíveis no mercado, essa metodologia se torna ineficaz devido à interferência da faixa espectral do ligante com a da sonda. Nesse caso, busca-se alternativas para evitar esse tipo de problema, como utilizar moléculas que tenham seu modo de ligação ao DNA conhecido e que não apresentem fluorescência intrínseca ou quando complexado ao DNA, evitando as indesejáveis interferências no sinal.

1.6 Berenil

O Berenil (1,3-bis(4'-amidinofenil)triazeno) (figura 12) pertence à classe das diamidinas aromáticas que se ligam ao DNA e é usado principalmente no tratamento da tripanossomíase bovina (BARCELÓ, et al., 2001). Na presença de DNA forma um complexo supramolecular não-fluorescente, se ligando preferencialmente aos pares de base A-T no sulco menor da macromolécula.

Figura 12. Estrutura do berenil.

Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Apesar da literatura reportar o comportamento do berenil como majoritariamente ligante *groove*, diversos estudos indicam que esta molécula também se intercala nos pares de bases do DNA. Segundo Pilch e colaboradores (1995), o berenil além de apresentar a conhecida forma de interação via *groove*, também pode apresentar propriedades intercalativas quando se complexa ao DNA duplex. Em concordância, Williams e colaboradores (2012) sugeriram que o modo de ligação via intercalação corresponde a 24% do mecanismo geral de ligação do berenil ao DNA. Estruturalmente, o berenil possui uma certa liberdade de torção, o que auxilia na ligação aos sulcos menores da macromolécula, entretanto a combinação do anel benzênico com os átomos de nitrogênio adjacentes e as ligações duplas conjugadas provavelmente fortalece a inserção da molécula entre as bases do DNA. Além disso, as cargas positivas da molécula também indicam a influência de interações eletrostáticas com a cadeia fosfatídica da dupla hélice.

Devido à sua estrutura não-planar, facilidade de torção e a ausência de um sistema de elétrons π conjugado - causando uma fraca interação entre esses elétrons -, o berenil não apresenta emissão de fluorescência, tanto livre como complexado ao DNA. Essa característica, aliada ao fato de que não há trabalhos na literatura que reportem seu uso como sonda molecular para marcar DNA, exhibe uma promissora alternativa do uso desse composto para os estudos de interação DNA-ligante.

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Geral

Avaliar a utilização do Berenil como sonda de marcação para modo de ligação de pequenas moléculas em processos de interação com DNA (Calf thymus) através das técnicas de fluorescência molecular e UV-vis, buscando otimizar as condições experimentais e elucidar uma forma de análise livre de interferências espectrais.

2.2 Específicos

- ❖ Otimizar condições experimentais como: concentração do ligante, do DNA e força iônica;
- ❖ Otimizar condições instrumentais como: *slit* e comprimento de onda de excitação das moléculas;
- ❖ Realizar experimentos de competição com berenil na presença de outras sondas conhecidas, sendo Hoechst 33258, DAPI e Tioflavina T para *groove* menor e Brometo de etídeo, Acridina Orange, Berberina e Tiazol Orange para intercalação, avaliando dois aspectos: o efeito da concentração de DNA e o efeito da força iônica no meio.

Capítulo 3

Experimental

3. Experimental

3.1 Preparação de soluções estoque

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico de pureza, descartando futuras etapas de purificação. As soluções foram preparadas com água ultra-pura (condutividade elétrica $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) obtida a partir do purificador OS10LXE (Gehaka).

Os compostos utilizados nesse estudo foram obtidos da Sigma–Aldrich, USA, e estes são: Aceturato de diminazeno (Berenil), bis-Benzimida H 33258 (Hoechst 33258), Dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), Tioflavina T, Brometo de etídeo, Berberina, Acridina Orange e Tiazol Orange. O DNA foi obtido do timo de bezerro do tipo I e na forma de fibras.

As soluções estoque dos compostos foram preparadas solubilizando 2,0 mg da substância em 4,0 mL de água ultra-pura e posteriormente armazenadas em tubos falcon na geladeira.

Para preparar a solução estoque de ctDNA foram solubilizados aproximadamente 5,0 mg em 15,0 mL de tampão Tris-HCl (10 mM, pH = 7,4).

O tampão (10 mM, pH = 7,4) foi preparado pesando cerca de 0,6 g de tris(hidroximetil)aminometano - TRIS (Vetec, Brasil) e solubilizado em 500,0 mL de água ultra-pura, ajustando o pH para 7,4 com pequenas alíquotas de ácido clorídrico (Merck, Alemanha).

3.1 Equipamentos utilizados

As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas utilizando o espectrofotômetro Shimadzu RF (5301PC, Japão) equipado com uma lâmpada de xenônio, utilizando uma cubeta de quartzo com capacidade para 2,0 mL, transparência na faixa de 220 a 900 nm e com 10 mm de caminho óptico.

As medidas espectrofotométricas foram feitas no espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (AJX-6100PC, Brasil) com dois compartimentos para referência e amostra, utilizando-se cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico e capacidade para 4,0 mL de solução.

As medidas de pH foram executadas em um eletrodo combinado de vidro associado ao pH-metro Gehaka (PG 1800, Brasil). Para a pesagem das massas dos reagentes foram utilizadas as balanças analíticas Mettler Toledo (AG245, Switzerland)

com precisão de $\pm 0,01$ mg e Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de $\pm 0,1$ mg. O tratamento dos dados obtidos dos experimentos foi realizado no software Origin Lab Graphing & Data Analysis 9.0.

3.3 Procedimentos

3.3.1 Cálculo da concentração do ctDNA

A concentração de ctDNA foi calculada a partir da equação de Lambert-Beer, que relaciona a absorvância e a concentração de uma solução que é atravessada por um feixe de luz monocromática. Fez-se a leitura do sinal de absorvância no espectrofotômetro em 260 nm de uma solução diluída 100 vezes, e calculou-se a concentração com base no coeficiente de extinção molar de $6600 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. (NOROOZIFAR, et al., 2011). Apesar de sua pureza analítica, fez-se também a leitura do sinal de absorvância nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm e foi calculada a razão A_{260}/A_{280} para verificar se o ctDNA estava satisfatoriamente livre de proteínas (GLASEL, 1995).

3.3.2 Interação DNA-ligante por espectrofluorimetria

3.3.2.1 Avaliação do efeito da concentração de DNA no complexo DNA-ligante

Nos estudos de interação para avaliar o efeito da concentração de DNA no meio, realizou-se ensaios de competição das sondas avaliadas frente ao berenil. Para isso, fixou-se a concentração de cada sonda em $1 \mu\text{M}$ e do ctDNA (5, 10, 20, 30 e $40 \mu\text{M}$ de excesso) e para cada sistema ctDNA-sonda adicionou-se quantidades crescentes de berenil (para as sondas *groove*: 0,1; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,50; 2,50 μM e para as intercalantes: 0,1; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,50; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 μM), monitorando a variação da intensidade nos espectros de emissão de fluorescência.

3.3.2.2 Avaliação do efeito da força iônica no meio

Para avaliar a interferência da força iônica na interação entre o berenil e o complexo ctDNA-sonda, realizou-se titulações espectrofluorimétricas com berenil, adicionando NaCl (50, 100 e $150 \mu\text{M}$) aos sistemas fixando a proporção [1:10] [sonda-ctDNA].

Capítulo 4

Resultados e discussão

4. Resultados

4.1 Estudos preliminares

Inicialmente, realizou-se a otimização dos parâmetros reacionais (concentração dos ligantes e proporções do complexo ctDNA-sonda) e instrumentais (comprimento de onda de excitação) para os estudos de fluorescência molecular. Para isso, foram realizadas titulações espectrofluorimétricas com ctDNA, excitando cada sonda no comprimento de onda de máxima absorção reportado na literatura, fixando a concentração de cada molécula em 1 μM e variando a concentração de ctDNA no meio de 0 a 40 μM , observando quais proporções apresentavam a melhor resolução para os estudos de competição com o berenil. As condições escolhidas para os ensaios subsequentes estão dispostas na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros experimentais otimizados.

Sonda	λ_{exc} (nm)	[ctDNA] (μM)
Hoechst 33258	353	5; 10; 20
DAPI	358	5; 10; 20
Tioflavina T	415	5; 10; 20
Brometo de Etídio	525	5; 10; 20
Acridina Orange	502	5; 10; 20
Berberina	363	5; 10; 20
Tiazol Orange	500	5; 10; 20

Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Após a otimização das condições experimentais mostradas na tabela 1, foi possível realizar os ensaios de competição com berenil para avaliar seu comportamento frente às diferentes sondas complexadas ao ctDNA.

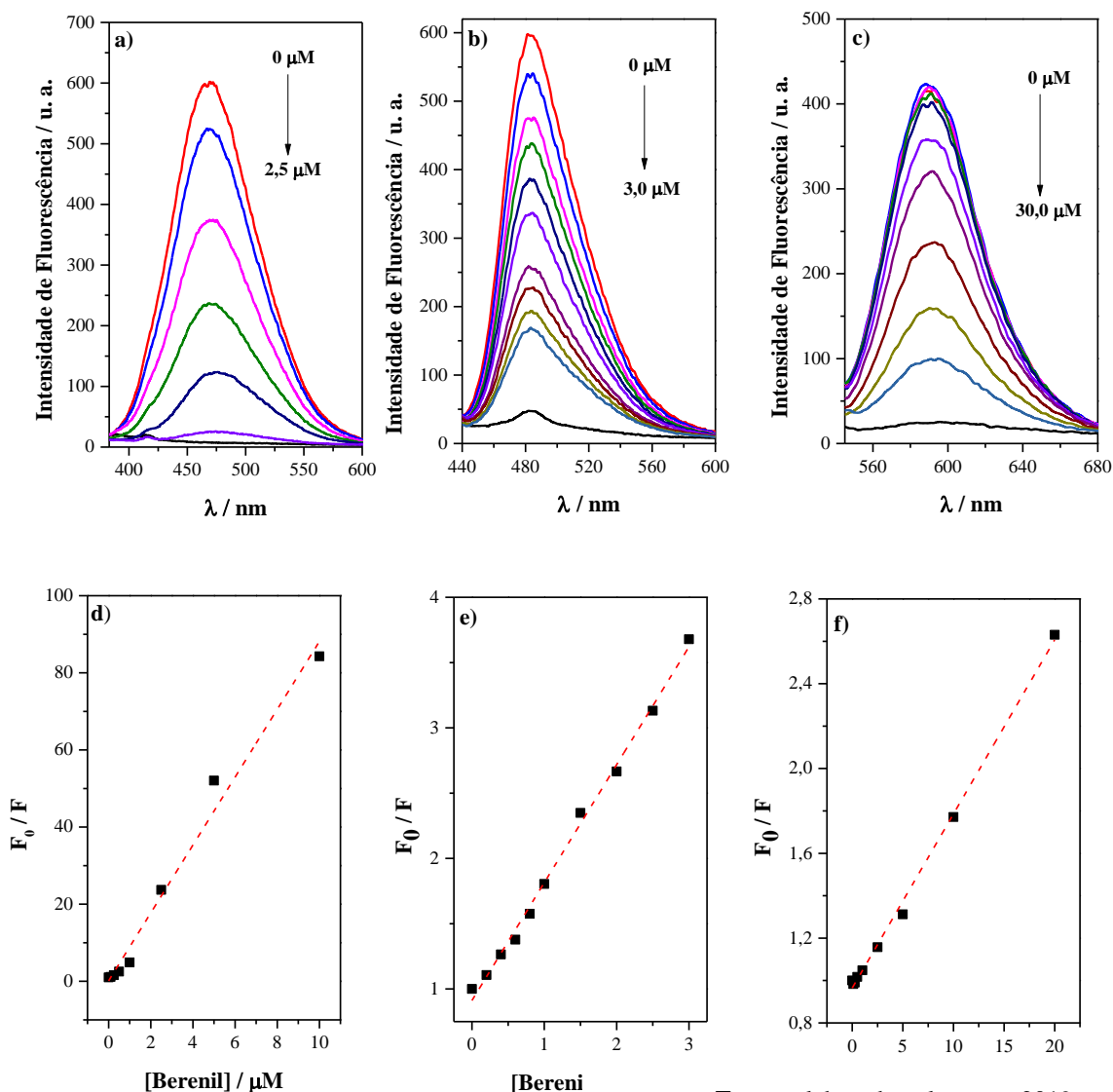
4.2 Ensaios de competição com berenil

4.2.1 Avaliação do efeito da concentração de DNA no meio

Para cada sonda escolhida, fez-se o estudo do efeito da concentração de ctDNA no complexo ctDNA-sonda através de ensaios de competição com o berenil. Uma vez que cada sonda interage de forma diferente com a macromolécula, é possível mensurar a

afinidade do berenil ao ctDNA em função da competição pelos sítios de ligação e observar como a concentração de DNA influencia nestas interações. Os resultados quantitativos foram avaliados através das constantes de Stern-Volmer (equação 1) obtidas pelas curvas de linearização. Além disso, a proporção sonda:ctDNA 1:10 (μM) exibiu um melhor sinal analítico e, como houve similaridade dos resultados entre hoehchst 33258 (HO) e DAPI e entre brometo de etídio (EB) e as demais sondas intercalantes, HO, TT e EB serão utilizados como modelos para apresentação dos resultados. A figura 13 apresenta os espectros de emissão de fluorescência obtidos a partir da adição de quantidades crescentes de berenil aos sistemas avaliados e curvas de linearização.

Figura 13. a), b) e c) Espectros de fluorescência obtidos a partir de adições crescentes de berenil (sondas *grooove*: 0,1; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,50; 2,50 μM e sondas intercalantes: 0,1; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,50; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 μM) para HO, TT e EB respectivamente; d), e) e f) curvas de linearização.



Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

De acordo com as figuras 13a, 13b e 13c, observou-se que ao se adicionar quantidades crescentes de berenil aos sistemas, houve uma diminuição gradativa na intensidade de emissão de fluorescência, visto que a concentração do complexo berenil-ctDNA passou a estar em maior proporção em solução comparado ao complexo sonda-ctDNA. Esse fenômeno indica que houve a interação entre o berenil e o DNA, formando um complexo não fluorescente e uma vez que o berenil não apresenta fluorescência, este é o agente *quencher*. Através das curvas de linearizações (figuras 13d, 13e, 13f e curvas omitidas das sondas similares), calculou-se as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) que estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Constantes de Stern-Volmer das sondas avaliadas.

Sondas	K_{sv} ($\times 10^6$ L mol ⁻¹)
Hoechst 33258	4,00 \pm 0,28
DAPI	1,05 \pm 0,08
Tioflavina T	0,90 \pm 0,02
Brometo de etídio	0,160 \pm 0,004
Acridina orange	0,086 \pm 0,009
Berberina	0,129 \pm 0,009
Tiazol Orange	0,36 \pm 0,06

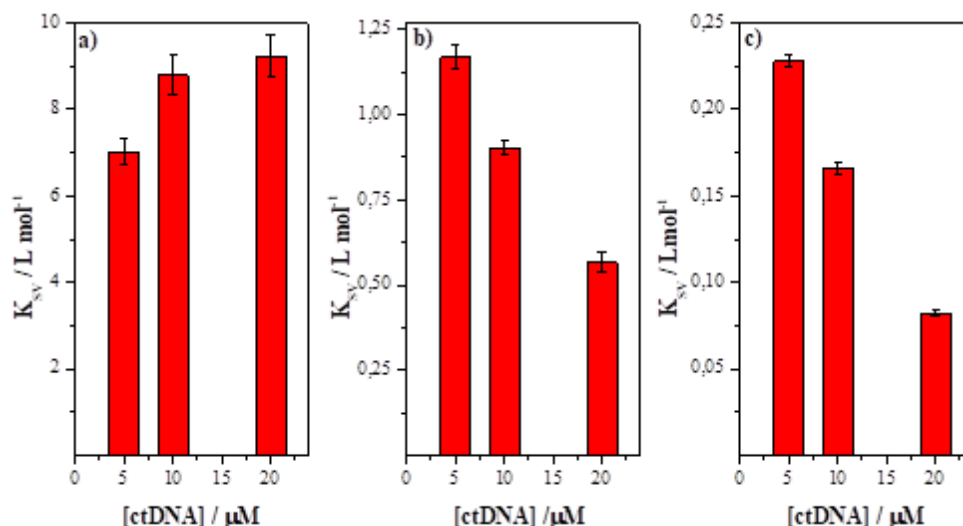
Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

A partir dos dados de K_{sv} mostrados na tabela 3, é possível afirmar que o berenil interagiu com o ctDNA e deslocou todas as sondas avaliadas, uma vez que as intensidades de emissão de fluorescência foram suprimidas totalmente. Esse comportamento ocorre devido à similaridade do modo de ligação do berenil e das moléculas ligadas ao ctDNA, que provoca a competição pelo mesmo sítio de ligação na macromolécula e, ao deslocar as sondas, causa a diminuição do sinal de emissão (HUSAIN, et al., 2013). Tal resultado está em concordância com os estudos de Pilch e colaboradores (1995), que identificaram a possibilidade do berenil interagir com o DNA via *groove* ou por intercalação. Além disso, como é mostrado nos estudos de Williams e colaboradores (2012), a intercalação corresponde a apenas 24% do mecanismo geral de ligação do berenil, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, já que para as sondas *groove* a concentração de berenil necessária para deslocar os ligantes foi em média 3 μ M e para as sondas

intercalantes foi necessária a adição de 30 μM de berenil para que houvesse uma diminuição considerável do sinal de fluorescência.

Para avaliar qualitativamente o efeito da concentração de ctDNA nos sistemas, observou-se a variação do K_{sv} em função do aumento da concentração de ctDNA no meio, como pode ser visto na figura 14.

Figura 14. Variação do K_{sv} em função da concentração de ctDNA para as titulações espectrofluorimétricas com berenil das sondas a) HO, b) TT e c) EB.



Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

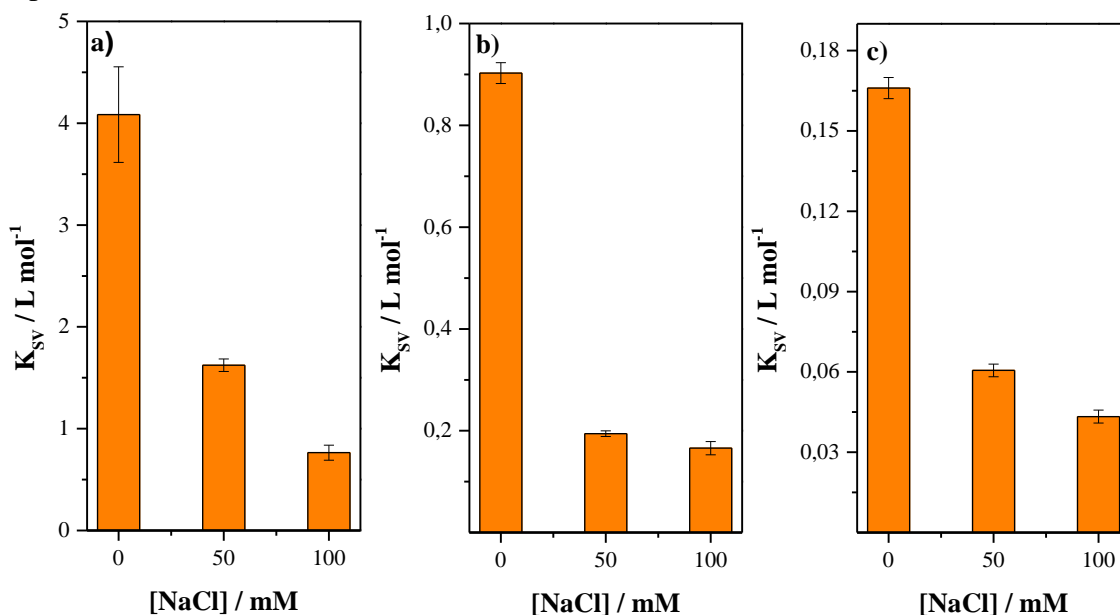
De acordo com a figura 14a, foi observado que os valores de K_{sv} aumentam à medida que a concentração de ctDNA no meio é dobrada. Isso sugere que, para as sondas com modo de ligação preferencial via *groove* (hoechst 33258 e DAPI), o berenil tem mais facilidade em se ligar ao ctDNA e deslocar as mesmas, indicando que uma grande porção da molécula interage de maneira similar com os sulcos da macromolécula. Contudo, como mostra a figura 14b, o comportamento é inverso para a TT, ou seja, quanto maior a presença de DNA, menor a capacidade do berenil em deslocar o ligante. Este fenômeno pode estar relacionado com a menor capacidade intercalante do berenil, uma vez que a TT se liga ao DNA por dois modos de ligação, *groove* e intercalação (MURUDKAR, et al., 2014; Ilanchelian e Ramaraj, 2004), quanto maior a proporção de DNA no meio, mais difícil fica o acesso do berenil aos sítios de ligação já que apenas 24% do seu mecanismo ocorre via intercalação, sendo necessária então uma maior quantidade do agente *quencher* no meio para que haja o deslocamento de todo o ligante complexado. Analogamente, para as sondas intercalantes observou-se um perfil decrescente dos valores de K_{sv} em função

do aumento na proporção de DNA no meio, concordando com os dados anteriores sobre a pequena capacidade intercalante do berenil (WILLIAMS, et al., 2012).

4.2.2 Avaliação do efeito da força iônica no meio

O berenil é um composto dicatiônico (figura 10) e também pode interagir com a cadeia de grupos fosfato do DNA carregados negativamente. Por isso, a presença de sais em solução, como NaCl, podem interferir no processo de interação com o DNA, visto que os íons Na^+ também possuem afinidade pelos grupos PO_4^{3-} da dupla hélice e assim tendem a influenciar no modo de ligação de moléculas como o berenil. Dessa forma, como a proporção [sonda-ctDNA] = [1:10] foi a que apresentou as melhores curvas, fixou-se essas concentrações para cada sonda e realizou-se as titulações com berenil, observando a variação nos valores de K_{sv} quando se adicionava incrementos de NaCl (0, 50 e 100 mM) ao meio. Os resultados estão expressos na figura 15.

Figura 15. Variação do K_{sv} em função da concentração de NaCl para as titulações espectrofluorimétricas com berenil das sondas **a)** HO, **b)** TT e **c)** EB.



Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

De acordo com as figuras 15a, 15b e 15c, observou-se que todas as sondas avaliadas apresentaram uma diminuição nos valores de K_{sv} à medida que se adicionou NaCl aos sistemas, indicando que a força iônica influencia os processos de interação entre o berenil e os complexos sonda-DNA. Contudo, apesar dessa diminuição, o deslocamento dos ligantes ainda foi bastante expressivo, com valores de K_{sv} da ordem de 10^5 , sugerindo que não houve alteração ou impedimento do modo ligação nos ensaios de competição.

Capítulo 5

Conclusões

5. Conclusões

O berenil apresentou resultados satisfatórios frente às sondas comumente utilizadas em estudos de interação DNA-ligante, uma vez que a magnitude dos valores de K_{sv} referentes aos ensaios de competição com tais ligantes foi da ordem de 10^6 L mol^{-1} .

Foi verificada a dualidade no comportamento do berenil quanto ao seu modo de ligação ao DNA, de forma que seu mecanismo de interação está relacionado com sua concentração no meio. Assim, observou-se que para ligantes preferencialmente *groove*, quanto maior a proporção de DNA no sistema, maior é a supressão de fluorescência decorrente da adição de até $3,0 \mu\text{M}$ de berenil, em contraste com o observado para as sondas intercalantes que na presença de maiores excessos de DNA houve a redução dos valores de K_{sv} , sendo 10 vezes maior a concentração necessária para a diminuição efetiva do sinal de emissão. Esses resultados são sustentados por trabalhos anteriores, que descrevem a maior porcentagem do mecanismo de ação do berenil como sendo via *groove* e apenas uma pequena contribuição do modo via intercalação.

A partir da avaliação do efeito da força iônica, através da adição de NaCl ao meio, observou-se que a salinidade no meio interfere na magnitude da supressão de fluorescência, contudo não altera o modo de ligação do berenil frente às sondas.

Dessa forma, o uso do berenil como sonda de marcação para modo de ligação de pequenas moléculas ao DNA é uma alternativa promissora que ainda não foi reportada na literatura, evidenciando assim a importância de trabalhos como esse.

Capítulo 6

Referências

6. Referências

AMADO, A. M. et al. Acridine Orange interaction with DNA: Effect of ionic strength. **Biochimica et Biophysica Acta**, Brasil, v. 1861, p. 900-909, Jan., 2017.

BARCELÓ, F. et al. Heterogeneous DNA binding modes of berenil. **Biochimica et Biophysica Acta**, Espanha, v. 1519, p. 175-184, Abr., 2001.

BARONE, G. et al. DNA-binding of nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes: Structure–affinity relationships, **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, p. 2848-2862, Mar., 2013.

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 de Química**, In press, 2015.

BHADRA, K. et al. Berberine-DNA complexation: New insights into the cooperative binding and energetic aspects. **Biochimica et Biophysica Acta**, Índia, v.1780, p. 1054-1061, Mai., 2008.

CHAIRES, J. B. A Thermodynamic Signature for Drug–DNA Binding Mode, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Estados Unidos da América, v. 453, p. 26-31, Set., 2006.

COSNIER, S.; MAILLEY, P. Recent advances in DNA sensors. **Analyst**, França, v. 133, p. 984-991, 2008.

DOWNS, T. R. and WILFINGER, W. W. Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue. **Analytical Biochemistry**, Estados Unidos da América, v. 131, p. 538-547, Fev., 1983.

FARAHAT, A. A. et al. Synthesis, DNA binding and antitrypanosomal activity of benzimidazole analogues of DAPI. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Estados Unidos da América, v. 26, p. 5907-5910, Nov., 2016.

GIRARD, P. M.; LAUGHTON, C.; NIKJOO, H. Determination of DNA structural detail using radioprobing, **International Journal of Radiation Biology**, Reino Unido, v. 88, p. 123 – 128, Jan., 2012.

GLASEL, J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. **Biotechniques**, Estados Unidos da América, v. 1, p. 62-63, Jan., 1995.

GUAN, Y. et al. Determination of nucleic acids based on the fluorescence quenching of Hoechst 33258 at pH 4.5. **Analytica Chimica Acta**, China, v. 570, p. 21-28, Abr., 2006.

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

HUSSAIN, M. A. et al. Naproxen intercalates with DNA and causes photocleavage through ROS generation. **The FEBS Journal**, Índia, v. 280, p. 6569-6580, Dez., 2013.

ILANCHELIAN. M.; RAMARAJ. E. Emission of thioflavin T and its control in the presence of DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Índia, v. 162, p. 129-137, Jul., 2004.

KANG, B. H. et al. Thiazole Orange as a fluorescent probe: Label-free and selective detection of silver ions based on the structural change of i-motif DNA at neutral pH. **Talanta**, China, v. 156-157, p. 141-146, Mai., 2016.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3.ed. Baltimore: Springer, 2006.

LEHN, J. M. **Química supramolecular conceitos e perspectivas**. Lisboa: Press, 1996.

LIMA, A. R. B. Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de ácidos nucléicos empregando tioflavina t como sonda fluorimétrica baseada no conceito *off-on*. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Alagoas, 2017.

LIU, Y. et al. DNA interaction, localization and cytotoxicity of quinacridone derivatives. **Dyes and Pigments**, China, v. 121, p. 328-335, Jun., 2015.

MANNING, G. S. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 11, p. 179–246, 1978.

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.

MURUDKAR, S. et al. Ultrafast molecular rotor based DNA sensor: An insight into the mode of interaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Índia, v. 295, p. 17-25, Ago., 2014.

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

NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6ª edição, editora Artmed, Porto Alegre 2014.

PILCH, D. S. et al. Berenil binding to DNA Duplexes and RNA Duplex: evidence for both intercalative and minor groove binding properties. **Biochemistry**, v. 34, p. 9962-9976, 1995.

PRAY, L. A. Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. **Nature Education**, Reino Unido, v. 1, n. 1, 2008. Disponível em:< <http://www.nature.com/scitable/topicpage/discovery-of-dna-structure-and-function-watson-397>> Acessado em: 27 de janeiro de 2019.

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

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

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.

SHAIKH, S. A.; JAYARAM, B. **DNA Drug Interaction**. Disponível em: <<http://www.scfbio-iitd.res.in/doc/preddicta.pdf>> Acessado em: 28 de Janeiro de 2019.

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.

SKOOG, D. A, WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana. São Paulo: Thomson, 2006.

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

VILLA, A. M and DOGLIA, S. M. Ethidium Bromide as a vital probe of mitochondrial DNA in carcinoma cells. **European Journal of Cancer**, Itália, v. 45, p. 2588-2597, Jul., 2009.

WILLIAMS, A. K. et al. Determination of the drug-DNA binding modes using fluorescence-based assays. **Analytical biochemistry**, v. 422, p. 66-73. Mar., 2012.

WILSON, W. D. et al. DNA sequence dependent binding modes of 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI). **Biochemistry**, Estados Unidos da América, v. 29, p. 8452-8461, Mai., 1990.

ZHANG, R. et al. Synthesis and DNA-binding properties of novel DNA cyclo-intercalators containing purine-glucuronic acid hybrids. **Carbohydrate Research**, China, v. 429, p. 48-53, Abr., 2016.