



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



EDUARDO SAMPAIO DA SILVA

**TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS APLICADAS NO MAPEAMENTO DE
INTERAÇÕES ENTRE DERIVADOS BENZIMIDAZOIS E BENZOTIAZOIS E
*ctDNA (Calf thymus)***

Maceió - AL
2018

EDUARDO SAMPAIO DA SILVA

**TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS APLICADAS NO MAPEAMENTO DE
INTERAÇÕES ENTRE DERIVADOS BENZIMIDAZOIS E BENZOTIAZOIS E
*ctDNA (Calf thymus)***

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
Bacharelado em Química.

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

Coorientadora: Msc. Marina de Magalhães Silva

Maceió - AL
2018



ATA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DE TCC - IQB

1. Data da apresentação do TCC: 12/07/2018

2. Aluno / matrícula: EDUARDO SAMPAYO DA SILVA

3. Orientador(es) / Unidade Acadêmica:
ISIS MARTINS FIGUEIREDO (IQB)
MSC. MARINA DE MABALHAES SILVA (COORIENTADORA)

4. Banca Examinadora (nome / Unidade Acadêmica):

<u>ISIS MARTINS FIGUEIREDO</u>	(Presidente)	Nota: <u>9,5</u>
<u>JULIO COSME SANTOS DA SILVA</u>	(1º avaliador)	Nota: <u>9,5</u>
<u>WANDER GUSTAVO BOTERO</u>	(2º avaliador)	Nota: <u>9,5</u>
<u>MSC. MARINA DE MABALHAES SILVA</u>	(3º avaliador)	Nota: <u>9,5</u>

5. Título do Trabalho:
TECNICAS ESPECTROSCOPICAS APLICADAS NO Mapeamento DE INTERAÇÕES ENTRE DERIVADOS BENZIMIDAZÓIS E BENZOTIAZÓIS E CT DNA

6. Local: Sala de Reuniões IQB

7. Apresentação: Horário início: 14:00 Horário final: 14:30
Arguição: Horário início: 14:30 Horário final: 16:00

8. Nota final: 9,5

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 30 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, 12 de julho de 2018

Presidente: Jm M Jguera
1º Avaliador: Julio C.S. de Silva
2º Avaliador: Boto
3º Avaliador: Marina de Aguiar Silva
Candidato: Eduardo Simão

*Dedico este trabalho à minha amada e
querida avó Luiza Ferreira Silva (in
memorian), por ter sempre me dado
amor e carinho e fazer enxergar sempre
o lado mais engraçado das situações,
sejam elas quais fossem.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a DEUS, por todo o amor, carinho, confiança e saúde depositados a mim. Obrigado por me fazer encarar de frente -sempre com perseverança- e vencer as barreiras impostas pela vida!

A minha mãe, Leonice Ferreira, por ter dado todo o amor e carinho que um filho necessita durante todos esses anos; por sua paciência e compreensão em algumas situações, principalmente minha escolha de fazer a graduação em outro estado. Obrigado por todo o apoio!

Ao meu pai, Erisberto Sampaio, por ter sempre amado e cuidado de mim, me protegido e nunca ter deixado faltar nada, não só para mim, como para toda a família. Obrigado por ter me educado e me tornado uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos, Jéssica e Júnior, por serem companheiros em todas as horas; nas brincadeiras e até mesmos nas brigas, que duravam alguns minutos, mas nada que nos afastasse.

A minha prima Josefa Ferreira, por ter me acolhido em sua casa durante minha graduação, por me motivar e cuidar de mim como uma mãe.

A minha orientadora, Profa. Dra. Isis Martins, e aos professores do laboratório, professores Josué Carinhonha e Daniela Anunciação, por todo o ensinamento e experiência transmitidos. Obrigado pela oportunidade e confiança depositadas em mim.

Aos meus amigos e colegas de pesquisa do LINQA (Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica): Alef, Amanda, Ari, Aryanna, Camila, Dayanne, Emerson, Fátima, Francisco, Jaelson, Janaína, Karlly, Karolayne, Marina, Mayara, Thamila e Woodland. Em especial, destaco Amanda e Karol, que me acompanharam durante toda a graduação e sempre serviram de exemplo e motivação para nunca desistir no meio do caminho.

Também dedico especial gratidão a minha coorientadora Marina e a Dayanne, pois sem as duas acho que nem 1/3 deste trabalho seria entregue. Obrigado por tudo, vocês foram minha inspiração para seguir com este trabalho, tiraram minhas dúvidas (minhas professoras particulares) e me ensinaram desde o princípio com toda a paciência.

Agradeço também aos amigos ainda não citados Alice, Allana, Iago, Izabela, João Wiktór e Natali que fizeram essa árdua trajetória da Universidade ser mais leve. Vou levar vocês para toda a vida; como diz a Alice: “nossa família!”.

As amigas de São Paulo, que mesmo distante estão sempre na minha lembrança, Amanda, Crisllan, Gabriele e Hivana. Nos conhecemos desde crianças, estudamos juntos e agora acompanhamos as vitórias de cada um, com grande satisfação. Obrigado!

Ao professor Ângelo de Fátima e seu grupo de pesquisa, por ceder os compostos avaliados.

A Universidade Federal de Alagoas, UFAL, e ao Instituto de Química e Biotecnologia, IQB, por ter me acolhido e tornar possível o sonho de me formar na área que sempre me despertou interesse.

E por último, e não menos importante, gostaria de agradecer ao meu professor de Química do Ensino Médio, Professor Izaias (vulgo Zaza), que fez despertar em meu íntimo o amor por essa ciência tão linda e instigante que é a Química!

“Creio que a verdade é perfeita para a matemática, a química, a filosofia, mas não para a vida. Na vida contam mais a ilusão, a imaginação, o desejo, a esperança”.

Ernesto Sábato

RESUMO

Benzimidazóis e benzotiazóis constituem duas classes de compostos heterociclos caracterizados pela presença de um anel benzênico fundido a um núcleo imidazol e tiazol, respectivamente. As subunidades benzimidazólica e benzotiazólica estão presentes na estrutura química de alguns insumos agrícolas e fármacos, sendo em muitos casos a responsável pelas propriedades biológicas destes compostos. O mapeamento dos processos de interações entre pequenas moléculas e DNA é um parâmetro importante para compreender os mecanismos moleculares de ação do fármaco, o que contribui para o desenvolvimento de novas drogas DNA-alvo. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a interação de compostos derivados benzimidazóis e benzotiazóis com *ctDNA* (*Calf thymus*), para compreender o modo de ligação desses compostos empregando as técnicas de espectroscopia de fluorescência molecular e de absorção no UV-Visível. Nos estudos por UV-vis e fluorescência molecular pôde-se caracterizar o mecanismo de *quenching* como sendo estático. Os valores de K_b variaram de 0,34 a $60,1 \times 10^4$ L mol⁻¹, confirmando que ocorreu a interação entre os compostos e a macromolécula. O número de sítios foi aproximadamente igual a unidade, e os valores de ΔH , ΔS e ΔG foram negativos, indicando que as principais forças envolvidas nas interações são, principalmente, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, e o processo foi espontâneo. O modo de ligação foi avaliado através dos ensaios com iodeto de potássio (KI), brometo de etídio (BE) e berenil. Nesta avaliação, foi sugerido que o processo de interação predominante ocorre via *groove*, uma vez que os valores de K_{SV} foram sistematicamente superiores na presença de *ctDNA*. Além disso, por estudos de competição com BE não se observou redução da intensidade de fluorescência; e para o ensaio com berenil percebeu-se diminuição do valor de K_b na presença da sonda, indicando a redução da interação *ctDNA*-ligante. Desta forma, esses compostos interagem com o *ctDNA* de maneira similar ao berenil, corroborando com os resultados obtidos com o teste de KI e o ensaio de BE, que excluem o modo de ligação ser via intercalação. Os valores de K_b foram correlacionados com GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) da atividade antiproliferativa de sete culturas de células tumorais. Verificou-se duas faixas de correlação onde r^2 variou de -0,98628 (leucemia, K-562) a +0,96617 (côlon, HT-29), com exceção para ovário resistente (NCI-H460) onde só foi observado uma faixa linear ($r^2 = -0,88213$). Desta forma, o mecanismo de ação preferencial pode estar associado à interação com DNA; e os derivados benzimidazóis e benzotiazóis podem ser possíveis fármacos anticâncer.

Palavras-chave: benzimidazóis; benzotiazóis; DNA; interações moleculares; técnicas espectroscópicas.

ABSTRACT

Benzimidazoles and benzothiazoles are two classes of heterocycle compounds characterized by the presence of a benzene ring fused to an imidazole and thiazole nucleus, respectively. The benzimidazole and benzothiazolic subunits are present in the chemical structure of some agricultural inputs and drugs, and in many cases are responsible for the biological properties of these compounds. The mapping of the interaction processes between small molecules and DNA is an important parameter to understand the molecular mechanisms of action of the drug, which contributes to the development of new target DNA drugs. Thus, the aim of the work was to value the interaction of benzimidazole and benzothiazol derivative compounds with *ct*DNA (*Calf thymus*), to understand the bond of these compounds using molecular fluorescence spectroscopy and UV-Visible absorption techniques. In the studies by UV-vis and molecular fluorescence it was possible to characterize the *quenching* mechanism as being static. K_b values ranged from 0.34 to $60.1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, confirming that the interaction between the compounds and the macromolecule occurred. The number of sites was approximately equal to unity and the values of ΔH , ΔS and ΔG were negative, indicating that the main forces involved in the interactions are mainly hydrogen bond and van der Waals forces, and the process was natural. The mode of bond was valued by potassium iodide (KI), ethidium bromide (BE) and berenyl assays. In this valuation, it was suggested that the predominant interaction process occurs via *groove*, since the K_{SV} values were systematically higher in the presence of *ct*DNA. Besides that, by competition studies with BE, no reduction in fluorescence intensity was observed; and for the test with berenil, realized a decrease of the K_b value in the presence of the probe, indicating the reduction of the *ct*DNA-binder interaction. Therefore, these compounds interact with *ct*DNA in a similarly to berenil, corroborating with the results obtained with the KI test and the BE test, which exclude the bond mode via intercalation. K_b values were correlated with GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) of the antiproliferative activity of seven tumor cell cultures. There were two correlation ranges where r^2 ranged from -0.98628 (leukemia, K-562) to +0.96617 (colon, HT-29), except for resistant ovary (NCI-H460) where only one linear range ($r^2 = -0.88213$). Thus, the mechanism of preferential action may be associated with interaction with DNA; and benzimidazoles and benzothiazoles may be possible anticancer drugs.

Keywords: benzimidazoles; benzothiazoles; DNA; molecular interactions; spectroscopic techniques.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Etapas envolvidas no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos.....	15
Esquema 2 - Influência das substituições em derivados benzimidazóis e benzotiazóis para a atividade antitumoral.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de Watson-Crick para a estrutura do DNA (duplex). (a) Representação esquemática, mostrando as dimensões da hélice. (b) Representação em bastão mostrando o esqueleto e o empilhamento de bases. (c) Modelo de volume atômico.....	17
Figura 2 - Complementaridade das cadeias no DNA duplex.....	18
Figura 3 - Comparação das conformações B-DNA, A-DNA e Z-DNA.....	19
Figura 4 - Estruturas do DNA de três e quatro fitas. (a) Pareamento de bases no triplex de DNA: o pareamento de Hoogsteen em cada caso é exibido em vermelho. (b) Vista lateral de uma hélice tripla de DNA, contendo duas fitas com poli- (T) e uma poli- (A). (c) Padrão do pareamento de bases na estrutura tetraplex da guanossina. (d) Quatro tetrapletes sucessivos de uma estrutura tetraplex G.....	21
Figura 5 - Modelo genérico do modo de ligação covalente DNA-ligante.....	22
Figura 6 - Modelo genérico para o modo de ligação não-covalente DNA-ligante.....	24
Figura 7 - (a) Etapas do processo de ação de fármacos tendo o DNA como alvo biológico até a cura de diversas patologias. (b) Mecanismo de resistência do DNA a fármacos nos processos de mutação.....	26
Figura 8 - Denominações de alguns efeitos causados pelas mudanças de posição da banda de absorção do DNA ao interagir com compostos.....	28
Figura 9 - Representação do mecanismo de <i>quenching</i> estático (a) Diagrama de Jablonski para o processo de <i>quenching</i> estático. (b) Representação genérica de um sistema na presença de um <i>quencher</i> Q.....	32
Figura 10 - Representação do processo de <i>quenching</i> dinâmico ou colisional. (a) Níveis de energia (diagrama de Jablonski) para o processo de <i>quenching</i> dinâmico. (b) Representação geral de um sistema na ausência (1) e na presença de um <i>quencher</i> Q (2)	34
Figura 11 - Estruturas químicas das sondas para intercalação Brometo de etídio (BE) e Acridina Orange e das sondas para <i>groove</i> Hoechst 33342 e DAPI.....	37
Figura 12 - Estrutura geral dos benzimidazóis (X = NH) e dos benzotiazóis (X = S)	39
Figura 13 - Estruturas químicas dos fármacos omeprazol, riluzol, tiabendazol e etoxzolamida.....	40

Figura 14 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	45
Figura 15 - Tipos de tratamento para o câncer. (a) Cirurgia. (b) Radioterapia. (c) Quimioterapia.....	46
Figura 16 - Estruturas químicas dos quimioterápicos nocodazol e bendamustina e do derivado benzotiazol <i>phortress</i>	49
Figura 17 – Estruturas dos compostos derivados benzotiazóis (XA) e benzimidazóis (XB) avaliados.....	55
Figura 18 - Resultados obtidos para avaliação da interação DNA-ligante por fluorescência molecular. (a) Perfil espectral do composto 15A (5,0 μM) com adições crescentes de <i>ctDNA</i> (0; 5; 12,5; 25; 50; 62,5; 75; 87,5; 100; 125; 150; 200 e 250 μM , curvas a→m respectivamente). (b) Gráfico de Stern-Volmer para o composto 15A (processo de <i>quenching</i>). (c) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação do composto 15A com <i>ctDNA</i> . Condição: pH=7,4 (tampão Tris 10 mM) a 30°C.....	57
Figura 19 - Espectro de absorção do composto 15A (5,0 μM), <i>ctDNA</i> (50,0 μM) e 15A- <i>ctDNA</i> . Condição: pH = 7,40 (tampão Tris 10 mM) a 30°C.....	64
Figura 20 - Representação do teste de iodeto de potássio. (a) Espectro do composto 15A livre, do composto 15A com KI e do composto 15A com KI e <i>ctDNA</i> . (b) Gráficos e valores de K_{SV} para o composto 15A com KI na ausência e presença de <i>ctDNA</i> . (c) Comparação dos valores de K_{SV} na ausência e na presença de <i>ctDNA</i> para todos os compostos avaliados.....	66
Figura 21 - Espectro do ensaio de competição de BE para o composto 15A (40,0 μM). Concentração do BE e <i>ctDNA</i> foram 2,0 e 10,0 μM , respectivamente. Condição: pH = 7,40 (tampão Tris 10 mM) e $\lambda_{exc} = 535 \text{ nm}$ a 30°C.....	68
Figura 22 - Ensaio com berenil. (a) Espectros de fluorescência obtidos a partir da adição de <i>ctDNA</i> (0, 10, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 μM , curvas a→g respectivamente) ao composto 15A (10,0 μM) na presença de berenil (10,0 μM). (b) Curvas de linearização para o cálculo de K_b do composto 15A na presença e na ausência de berenil. (c) Gráfico da razão entre o valor de K_b no ensaio sem berenil e K_b' no ensaio com berenil para todos os compostos avaliados.....	69
Figura 23 - Gráfico de correlação linear de GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) vs. $\log K_b$ a 95% de intervalo de confiança (linhas verdes)	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas e ajustadas ^a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária *	44
Tabela 2 - Valores de comprimentos de onda máximos dos compostos avaliados na forma livre.....	56
Tabela 3 - Parâmetros de interação do <i>ctDNA</i> com derivados benzotiazóis (XA) e benzimidazóis (XB).....	59
Tabela 4 - Parâmetros de interação do <i>ctDNA</i> com derivados benzotiazóis (XA) e benzimidazóis (XB) em diferentes temperaturas.....	62
Tabela 5 - Variação da máxima absorção entre os compostos derivados benzimidazóis e benzotiazóis avaliados (5,0 μM) e <i>ctDNA</i> (50,0 μM) livres e o complexo <i>ctDNA</i> -composto. Condição: pH = 7,40 (tampão Tris 10 mM) a 30°C.....	65
Tabela 6 - Valores das constantes de ligação dos compostos avaliados com <i>ctDNA</i> na presença e ausência de berenil.....	70
Tabela 7 - Valores de GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e índice de seletividade (IS) dos compostos derivados benzotiazóis e benzimidazóis avaliados frente a 7 linhagens de células tumorais humanas.....	72
Tabela 8 - Coeficientes de correlação (r^2) determinados frente às linhagens celulares testadas.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - Adenina

BE – Brometo de etídio

C - Citosina

ctDNA – DNA *Calf thymus*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DMSO - Dimetilsulfóxido

G – Guanina

GI₅₀ - Concentração mínima do composto capaz de gerar 50% de inibição do crescimento

HTS – *High-throughput screening*

IC₅₀ - Concentração do composto capaz de inibir 50% da atividade em questão

INCA – Instituto Nacional do Câncer

K_b - Constante de ligação

KI – Iodeto de potássio

K_{SV} - Constante de Stern-Volmer

NCE – Novas entidades químicas

P&D – Pesquisa e Desenvolvimento

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RNA - Ácido ribonucleico

T – Timina

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

UV – Ultravioleta

μM - Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Química supramolecular e química medicinal</i>	14
1.2 <i>Características gerais do DNA</i>	16
1.3 <i>Modo de ligação DNA-ligante</i>	21
1.3.1 Modo de ligação covalente	22
1.3.2 Modo de ligação não-covalente	23
1.4 <i>Importância de estudos de interação DNA-ligante</i>	25
1.5 <i>Interação DNA-ligante in vitro</i>	26
1.5.1 Técnicas empregadas para interações DNA-ligante	26
1.5.1.1 Espectroscopia no UV-Visível	27
1.5.1.1.1 Parâmetros importantes no estudo por UV-visível	29
1.5.1.2 Espectroscopia de Fluorescência Molecular	30
1.5.1.2.1 Parâmetros importantes no estudo por fluorescência	30
1.5.2 Mecanismo de <i>quenching</i>	31
1.5.2.1 Constantes de ligação (K_b)	35
1.5.3 Avaliação do modo de ligação	35
1.5.3.1 Ensaio com iodeto de potássio (KI)	36
1.5.3.2 Ensaio de competição	36
1.5.3.3 Parâmetros termodinâmicos	37
1.6 <i>Derivados Benzimidazóis e Benzotiazóis</i>	38
1.6.1 Os derivados benzimidazólicos	40
1.6.2 Os derivados benzotiazóis	41
1.6.3 Relação estrutura-atividade	41
1.7 <i>Doenças tendo como alvo biológico o DNA</i>	42
1.7.1 Câncer	43
1.7.2 Tipos de tratamento para o câncer	45
1.7.3 Atividade antiproliferativa de benzimidazóis e benzotiazóis	47
2. OBJETIVOS	50
2.1 <i>Geral</i>	50
2.2 <i>Específicos</i>	50
3. EXPERIMENTAL	51
3.1 <i>Reagentes e Soluções</i>	51

3.2 Equipamentos utilizados	52
3.3 Procedimentos	52
3.3.1 Determinação da concentração do DNA (<i>Calf thymus</i>)	52
3.3.2 Interação <i>ctDNA</i> -ligante por espectrofluorimetria e UV-visível	52
3.3.3 Estudo realizado com iodeto de potássio (KI)	53
3.3.4 Ensaio de competição com brometo de etídio (BE) e berenil	53
3.3.5 Tratamento dos dados	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 Estudos preliminares	54
4.2 Avaliação por meio de espectroscopia de emissão de fluorescência	57
4.2.1 Estudo dos parâmetros termodinâmicos	61
4.3 Espectroscopia de absorção no UV-visível: avaliação do mecanismo de quenching.....	63
4.4 Avaliação do modo de ligação composto- <i>ctDNA</i>	65
4.4.1 Teste com iodeto de potássio	66
4.4.2 Ensaio com brometo de etídio	67
4.4.3 Ensaio com berenil	69
4.5 Correlação bioanalítica	71
5. CONCLUSÃO	77
5.1 Perspectivas	78
6. REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Química supramolecular e química medicinal*

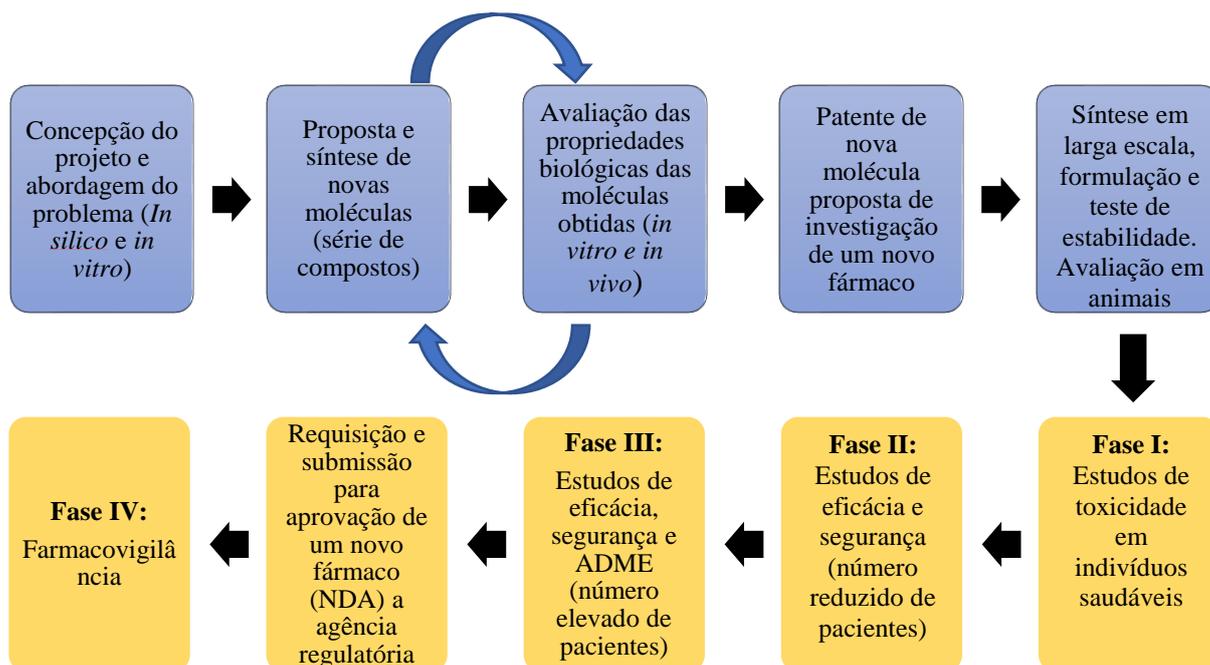
A "química além da molécula" é um conceito moderno elaborado pelo químico francês Jean-Marie Lehn, em 1978, para química supramolecular. Se na química molecular a base está pautada na ligação covalente (compartilhamento de elétrons), a química supramolecular aborda as interações intermoleculares (não-covalentes) que englobam as características químicas, físicas e biológicas de espécies químicas mais complexas que as moléculas simples (BAZZICALUPI, et al., 2014). Assim, a química supramolecular tem maior complexidade, com sistemas polimoleculares organizados e mantidos por interações não covalentes, como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas, entre outras. Essas interações são importantes nos processos biológicos entre substratos e proteínas receptoras, reconhecimento celular, regulação da expressão genética pelas proteínas ligadas ao DNA, reações enzimáticas e, principalmente a interação entre o DNA e os fármacos (LEHN, 1996).

O processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos tem importância significativa na Química Medicinal, que se caracteriza por seu relevante caráter multidisciplinar, abrangendo diversas especialidades, tais como química orgânica, bioquímica, farmacologia, informática, biologia molecular e estrutural, entre outras. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (da sigla inglesa IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry), a química medicinal é uma disciplina com base em química, envolvendo a invenção, a descoberta, o planejamento, a identificação, a preparação e a interpretação do mecanismo de ação molecular de compostos biologicamente ativos. Além da descoberta de moléculas bioativas, a química medicinal também incorpora os estudos do metabolismo e das relações entre a estrutura química e atividade (WERMUTH, 2003). Assim, fica claro o estabelecimento de interfaces fundamentais entre as ciências médicas, físicas, computacionais, biológicas, farmacêuticas e químicas.

A P&D de fármacos, conforme ilustrado no Esquema 1, é dividido em duas grandes fases: (i) descoberta (também conhecida como pré-clínica ou pesquisa básica) e (ii) desenvolvimento (ou clínica) (LOMBARDINO; LOWE, 2004). Nos estágios iniciais da fase de descoberta, as pesquisas se concentram geralmente na identificação e otimização de moléculas pequenas capazes de representar novas entidades químicas (NCE, do inglês *New*

Chemical Entities) com potencial de desenvolvimento clínico. A validação do alvo molecular selecionado é fundamental por uma série de razões que envolvem desde o estabelecimento de sua relevância no processo fisiopatológico em estudo até a caracterização do impacto de sua modulação seletiva no tratamento ou na cura de doenças ou disfunções em humanos (GUIDO, et al., 2010).

Esquema 1. Etapas envolvidas no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos.



Fonte: adaptado de GUIDO et al., 2010.

As moléculas bioativas (ou ligantes, do inglês *hits*) podem ser identificados a partir de triagens reais (biológicas ou bioquímicas, por exemplo) ou virtuais (computacionais) de produtos naturais, compostos sintéticos ou coleções combinatórias, ou ainda mediante planejamento racional. Ressalta-se, contudo, que, em todos os casos, as propriedades biológicas devem ser verificadas experimentalmente, sendo necessário a criação de ensaios padronizados e validados de alta qualidade. Os compostos otimizados são escolhidos como compostos líderes (do inglês *lead compounds*) para posterior desenvolvimento de NCE candidatas a fármacos (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008).

Com o auxílio de métodos da química medicinal é possível explorar o imenso espaço químico delineando o trabalho de identificação, seleção e otimização de moléculas capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com o alvo molecular selecionado, o qual

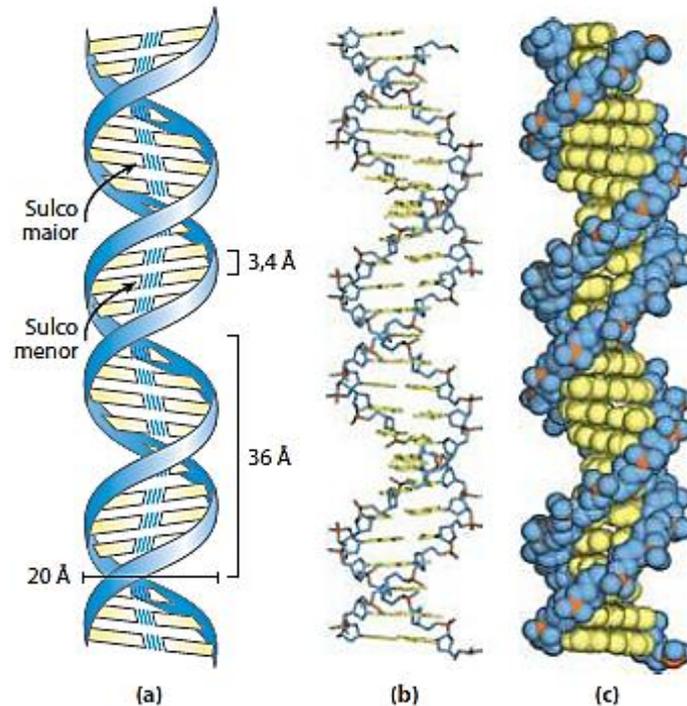
representa o espaço biológico. Várias estratégias podem ser empregadas para a investigação do espaço químico-biológico, tais como: a aplicação de filtros moleculares, o emprego de triagens biológicas automatizadas em alta escala (HTS, do inglês *high-throughput screening*) e o uso da triagem virtual (VS, do inglês *virtual screening*) (ZARAGOZA, 2012).

A seletividade de um medicamento é uma de suas características fundamentais, e o DNA, ácido desoxirribonucleico, é o principal alvo para fármacos anticâncer. Pequenas moléculas que interagem com o DNA podem ser potentes fármacos antitumorais, antibióticos e antivirais (GIBSON, 2012).

1.2 Características gerais do DNA

O ácido desoxirribonucleico, DNA, é um polímero biológico que carrega a informação genética nas células e que contém as instruções para a síntese de proteínas (SOLOMONS; FRYHLE, 2012). Foi inicialmente observado, isolado e caracterizado pelo bioquímico e médico suíço Johan Friedrich Miescher em 1869, que tentava estabelecer a composição química das células. Mas apenas em 1953 sua estrutura foi elucidada por James Watson e Francis Crick, que afirmaram que a molécula de DNA tem a forma de uma dupla hélice tridimensional (NELSON; COX, 2014), como é verificado na Figura 1.

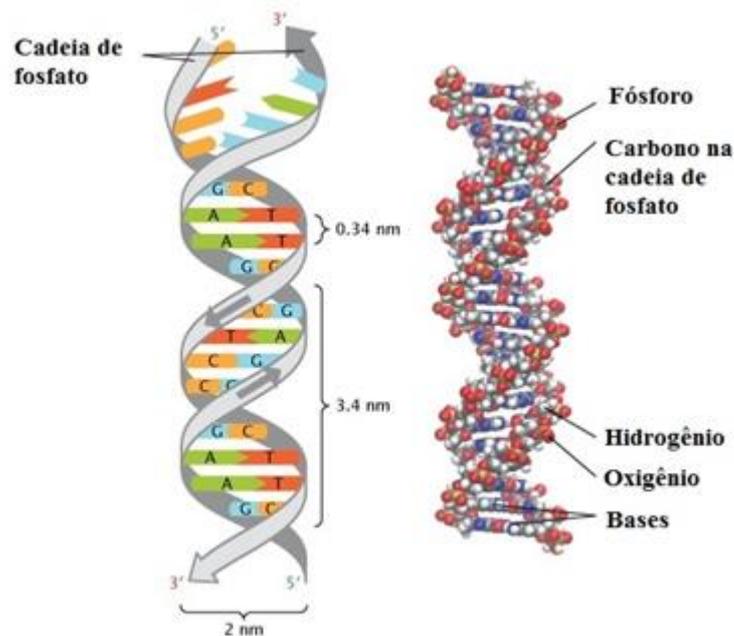
Figura 1. Modelo de Watson-Crick para a estrutura do DNA (duplex). (a) Representação esquemática, mostrando as dimensões da hélice. (b) Representação em bastão mostrando o esqueleto e o empilhamento de bases. (c) Modelo de volume atômico.



Fonte: adaptado de NELSON; COX, 2014.

O modelo proposto por Watson e Crick é constituído por uma série de nucleotídeos, tendo esses, três componentes: um grupo de açúcar ribose ou açúcar desoxirribose (no caso do ácido RNA e DNA, respectivamente); grupos fosfatos (PO_4^{3-}), que atribuem carga negativa ao DNA e as bases nitrogenadas, onde as fitas da macromolécula estão empilhadas no interior da dupla hélice. As bases são ainda classificadas em duas categorias: as purinas, adenina (A) e guanina (G), cada uma com dois anéis condensados; e as pirimidinas, citosina (C), timina (T) e uracila (U), cada uma com um anel simples. As purinas sempre se ligam as pirimidinas, respectivamente, , como ilustrado na Figura 2: a (A) de uma fita sempre forma duas ligações de hidrogênio com a (T) da outra, enquanto a (G) forma três ligações de hidrogênio com a (C) da fita complementar. Portanto, ao longo da hélice os pares de bases são sempre AT (ou TA) e CG (ou GC) (NAKAMOTO; TSUBOI; STRAHAN, 2008; NELSON; COX, 2014). A composição do DNA segue a regra de Chargaff, que afirma que a quantidade de (A) é equivalente à de (T) e a quantidade de (C) é equivalente à quantidade de (G), isto significa que o número total de purinas (A+G) é geralmente igual ao total de pirimidinas (C+T) (PRAY, 2008).

Figura 2. Complementaridade das cadeias no DNA duplex.

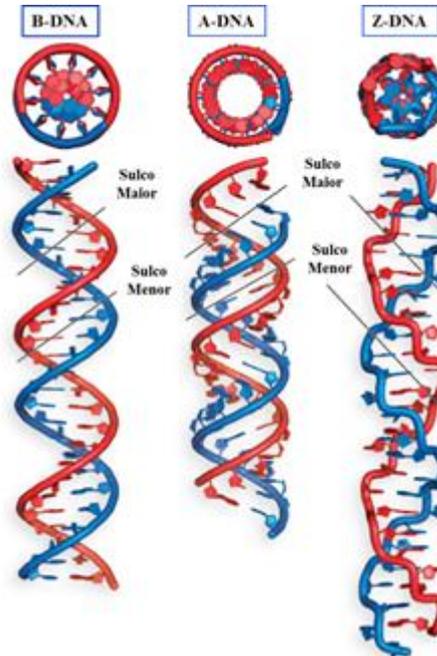


Fonte: adaptado de PRAY, 2008.

O DNA de dupla fita é antiparalelo, onde a extremidade 5' (grupo fosfato) de uma fita está emparelhado com a extremidade 3' (grupo hidroxila) de sua fita complementar, como exibido na Figura 2, ou vice-versa. Variações estruturais (isoformas) são vistas no DNA duplex e dependem do meio onde o mesmo encontra-se, podendo assumir três conformações: A-DNA, B-DNA e Z-DNA (Figura 3). A estrutura mais estável para uma molécula de DNA é a forma B, de sequência aleatória sob condições fisiológicas, sendo, desta forma, o ponto de referência padrão em qualquer estudo das propriedades do DNA; a estrutura possui 10,5 pares de bases para uma volta completa na hélice, além de sua rotação seguir o sentido horário (NELSON; COX, 2014). De acordo com Nakamoto e colaboradores (2008), três fatores principais estabilizam a conformação B-DNA e a fazem adquirir, termodinamicamente, maior estabilidade frente às outras duas conformações: a deslocalização de elétrons- π na parte interna das bases nitrogenadas, que estabiliza o empilhamento vertical das bases; as forças eletrostáticas entre os grupos fosfato e os cátions solvatados (Na^+ , K^+ , M^{2+} , entre outros); e as ligações de hidrogênio entre os pares de bases complementares, que conferem uma estrutura estável e bem definida (MIRKIN, 2008). A hidratação também contribui para a estabilidade da conformação, e quanto maior a umidade

do ambiente mais bem definida e estável é sua estrutura (NAKAMOTO; TSUBOI; STRAHAN, 2008).

Figura 3. Comparação das conformações B-DNA, A-DNA e Z-DNA.



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

A isoforma A-DNA é favorecida em muitas soluções que são relativamente livres de água e raramente sob condições fisiológicas normais; sua hélice é mais larga e o número de bases por volta helicoidal é 11, contra 10,5 da isoforma anterior, B-DNA, entretanto é mais curta. O plano dos pares de bases nessa estrutura está inclinado em cerca de 20° relativo ao eixo da hélice. Essas mudanças estruturais aprofundam o sulco maior enquanto fazem o sulco menor mais superficial (Figura 3) (NELSON; COX, 2014). Sua importância biológica ainda não está clara e não há ocorrências diretas de sua presença em organismos vivos, contudo algumas interações entre fármacos ou proteínas com o DNA mostram que esse pode obter conformação A-DNA (PRAY, 2008).

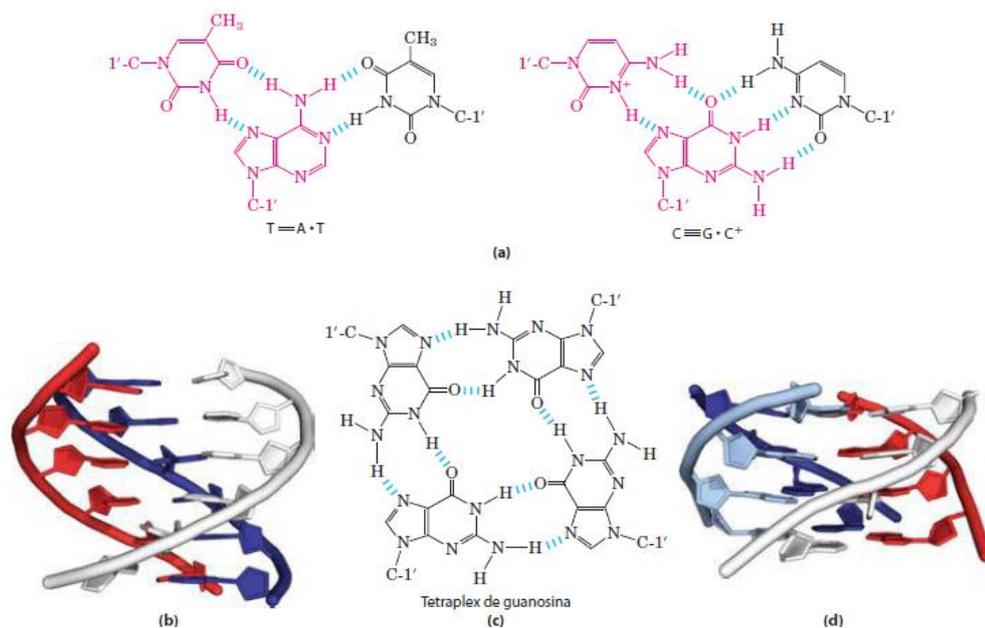
Já a estrutura Z-DNA é um afastamento das outras duas, sua conformação é alongada e fina (12 pares por volta helicoidal); possui a rotação da hélice no sentido anti-horário; o sulco maior é pouco aparente enquanto o sulco menor é estreito e profundo (Figura 3); e é encontrada em meios de alta salinidade (elevada força iônica) (ALMEIDA, et al., 2005; MIRKIN, 2008; NELSON; COX, 2014). Essa isoforma é evidenciada (algumas pequenas

extensões) em células de bactérias e em eucariotos, podendo ter um papel na regulação da expressão de alguns genes ou em recombinação genética (NELSON; COX, 2014).

Segundo Cox e colaboradores (2012), algumas estruturas não usuais de DNA envolvem três ou até quatro cadeias/fitas de DNA (Figura 4). Elas são importantes devido à sua tendência de formação durante os processos de replicação, recombinação e transcrição. O DNA triplex (Figura 4b) constitui uma das estruturas não usuais, sendo formada de maneira mais rápida em sequências longas contendo apenas pirimidinas ou apenas purinas em determinada fita, mas algumas contendo duas fitas de pirimidinas e uma de purinas, e vice-versa. Essa formação com fitas triplas é permitida pelo pareamento de Hoogsteen (não Watson-Crick), que se baseia na possibilidade de formar ligações de hidrogênio. Os nucleotídeos podem formar ligações de hidrogênio adicionais com grupos funcionais ancorados no sulco maior, por exemplo, um resíduo de citidina (se protonado) pode parear com o resíduo de guanina de um par nucleotídico GC (ou CG), e uma timina pode parear com a adenosina de um par AT (ou TA) (Figura 4a).

Além do DNA triplex, quatro fitas de DNA também podem parear formando um quadruplex (ou tetraplex). Isso ocorre facilmente apenas para sequências de DNA com uma proporção muito alta de resíduos de guanina (tetraplex de guanosina (tetraplex G), Figuras 4c e 4d), capazes de se auto-empilhar. A formação desse quaduplex é cineticamente rápida e termodinamicamente estável sob condições fisiológicas, principalmente na presença de cátions potássio K^+ (CHAMBERS, 2015). Essas estruturas não usuais do DNA também são sugeridas como alvos promissores na quimioterapia, pois a aplicação dos fármacos DNA-alvo seletivos ao DNA triplex ou quadruplex têm mostrado menos efeitos colaterais no tecido saudável (SEFEROGLU; MAHMOUD; IHMELS, 2016).

Figura 4. Estruturas do DNA de três e quatro fitas. **(a)** Pareamento de bases no triplex de DNA: o pareamento de Hoogsteen em cada caso é exibido em vermelho. **(b)** Vista lateral de uma hélice tripla de DNA, contendo duas fitas com poli- (T) e uma poli- (A). **(c)** Padrão do pareamento de bases na estrutura tetraplex da guanosina. **(d)** Quatro tetrapletes sucessivos de uma estrutura tetraplex G.



Fonte: adaptado de NELSON; COX, 2014.

Ficando clara a compreensão das principais características do DNA, temos que ele é de fundamental importância para os organismos e para os estudos de novos medicamentos combatentes a algumas doenças, tendo como principal alvo a macromolécula. Compostos com potencial atividade biológica podem interagir de diferentes maneiras com o DNA, fazendo-se relevante o conhecimento dos diferentes tipos de interação DNA-ligante para a P&D de novos fármacos.

1.3 Modo de ligação DNA-ligante

Estudos de ligações entre pequenas moléculas e DNA têm sido considerado muito importante para o desenvolvimento de sondas moleculares de DNA e novos reagentes terapêuticos (SHAHABADI; HEIDARI, 2012). Inúmeros experimentos biológicos têm mostrado o DNA como principal alvo intracelular de fármacos anticâncer, e que interações DNA-ligante podem ocasionar danos em células cancerosas, impedindo sua divisão celular

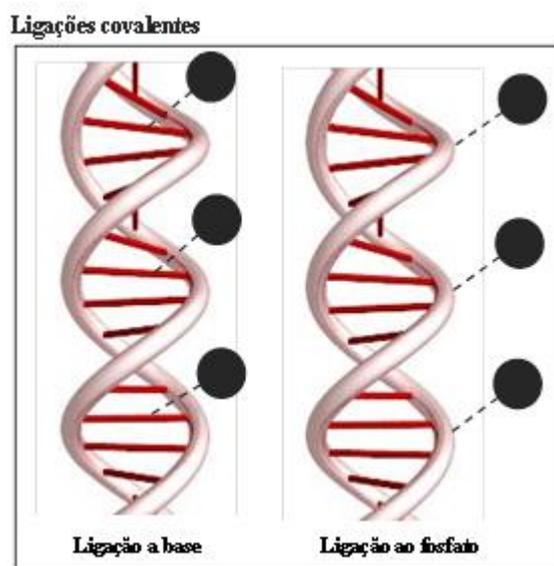
e resultando em morte celular (ARJMAND, et al., 2012; SILVA, 2016; NASCIMENTO, 2017).

Uma das abordagens utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos anticâncer é o estudo do modo de ligação entre compostos bioativos e DNA, onde busca-se a elucidação de quais sítios da molécula do DNA os compostos irão interagir preferencialmente. Essas pequenas moléculas podem interagir com o DNA por ligações covalentes ou não-covalentes (SHAHABADI; HEIDARI, 2012).

1.3.1 Modo de ligação covalente

A irreversibilidade é uma característica do modo de ligação covalente, que leva a uma completa inibição do DNA com conseqüente morte celular (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). A interação acontece por meio de ligações diretas entre o composto ligante, altamente eletrofílico, e os grupos nucleofílicos do DNA, a citar os grupos fosfatos na pentose e/ou as bases nitrogenadas (HASANZADEH; SHADJOU, 2016); como exibe a Figura 5. Um exemplo de composto que interage desse modo com o DNA é a cisplatina [*cis*-diclorodiaminoplatina(II)], tradicional composto usado para ligar-se covalentemente com os nitrogênios das bases do DNA deslocando assim o cloreto.

Figura 5. Modelo genérico do modo de ligação covalente DNA-ligante.



Fonte: adaptado de BARRA; NETTO, 2015.

Agentes alquilantes de diferentes classes, como as mostardas nitrogenadas, os metanossulfonatos; nitrosureias; triazinas e etilenoaminas são outros exemplos que interagem covalentemente com o DNA, e também impedem e/ou inibem o ciclo celular (processos de replicação), assim como a separação das duas fitas da dupla hélice (BOER; CANALS; COLL, 2009; PUYO; MONTAUDON; POURQUIER, 2014).

1.3.2 Modo de ligação não-covalente

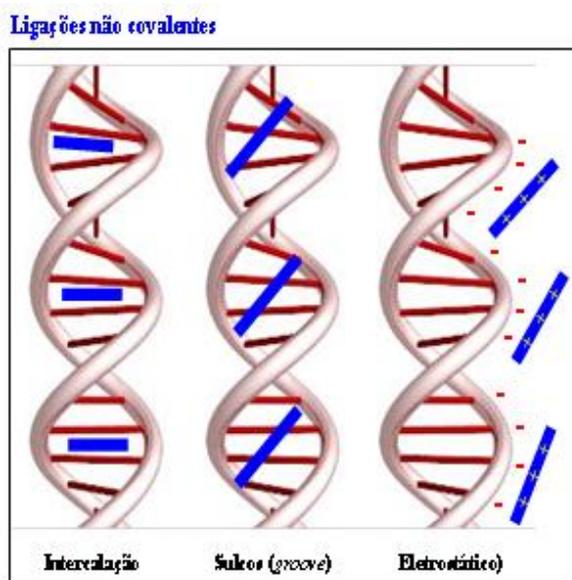
Diferentemente do modo de ligação covalente, o modo de ligação não covalente é reversível, e a espécie que interage com o DNA pode influenciar na conformação, provocar tensão torsional e bloquear o processo de interação DNA-ligante nos processos biológicos (SILVESTRI; BRODBELT, 2012). Existem três diferentes modos de ligação reversíveis: intercalação; interações nos sulcos (*groove*) ou interações eletrostáticas (SARWAR, et al., 2015), como ilustrado na Figura 6.

Intercalação: ocorre quando moléculas (poli)aromáticas planas se interpõem entre os pares de base consecutivos do DNA (Figura 6). Um complexo DNA-ligante formado através de intercalação é estabilizado por interações π - π entre o intercalante e o DNA, levando a uma forte perturbação em sua estrutura (SHAIKH; JAYARAM, 2018).

A intercalação de um ligante entre os pares de bases do DNA reverte-se em uma alteração substancial na estrutura do ácido nucleico, provocando enrijecimento, alongamento e desenovelamento parcial da dupla hélice do DNA. Assim, o esqueleto do DNA perde sua estrutura de dupla fita original, alterando os ângulos de torção envolvendo os grupos açúcar-fosfato para acomodar o ligante aromático e resultando na separação dos pares de bases no sítio de intercalação (HASANZADEH; SHADJOU, 2016; WHEAT, et al., 2007).

Dessa maneira, as conformações estruturais promovidas pela interação das bases do DNA e o composto intercalante realizam um papel importante, prevenindo a replicação da macromolécula e, conseqüentemente, inibindo o rápido crescimento de células cancerosas, quando utilizado no tratamento terapêutico. Alguns núcleos de intercaladores clássicos são os antracenos, as antraquinonas, as elipticinas, as acridinas, as fenantrolinas e as fenantridinas (WHEAT, et al., 2007).

Figura 6. Modelo genérico para o modo de ligação não-covalente DNA-ligante.



Fonte: adaptado de BARRA; NETO, 2015.

Interações nos sulcos (*groove*): ocorre entre o ligante e as bases nitrogenadas nos sulcos maior ou menor do DNA por meio de ligações de hidrogênio ou forças de van der Waals, sem geralmente causar distorção na cadeia da macromolécula (SARWAR, et al., 2015). O *sulco menor* é resultado da depressão entre as duas fitas complementares e têm um sítio de ligação menor (0,6 nm), susceptível ao ataque de moléculas menores. Já o sulco maior é consequência da depressão existente entre os giros adjacentes da hélice, e graças ao seu tamanho (1,2 nm) oferece fácil passagem a ligantes volumosos (Figura 6) (POLICARPI, 2008; KHAN, et al., 2012).

As ligações no sulco menor, normalmente possuem vários anéis aromáticos não condensados, tais como benzeno, pirrol ou furano, unidos por ligações que possuem capacidade de torção, facilitando a promoção de interações por van der Waals. Também esses compostos conseguem formar ligações de hidrogênio preferencialmente com as bases adenina e timina (ZHANG; HUANG, 2007). Geralmente, moléculas que interagem pelo modo não-covalente *groove*, com vários anéis aromáticos heterocíclicos, possuem uma liberdade rotacional, com estruturas mais flexíveis como os clássicos *groove binders* berenil e Hoescht 33342 (BARONE, et al., 2013). Além desses, outros ligantes clássicos que apresentam interação *via groove* são distamicina, netropsina e DAPI (SALVIA, 2013).

Interações eletrostáticas: ocorrem ao longo do exterior da hélice do DNA, entre pequenas espécies catiônicas e a cadeia de fosfato carregado negativamente do DNA. Essas interações dependem da concentração de sais disponíveis em solução e geralmente são fracas sob pH fisiológico. Entretanto, são altamente contribuintes para energia livre de ligação de moléculas altamente carregadas (STREKOWSKI; WILSON, 2007).

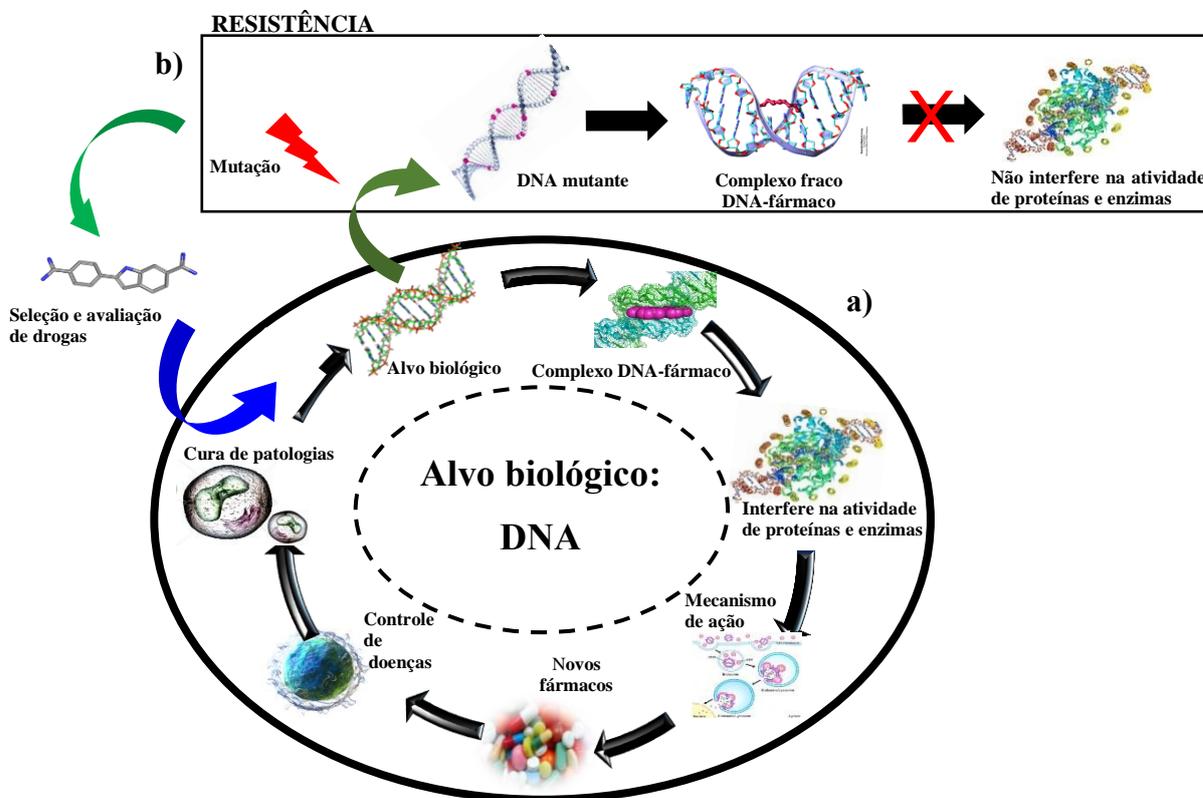
1.4 Importância de estudos de interação DNA-ligante

A macromolécula DNA tem particular importância em processos biológicos, pois carregam as informações e fazem o transporte do código genético, indispensável para sínteses de enzimas e proteínas, via processos de tradução e transcrição (KOOLMAN; ROEHM, 2005). Um dos principais temas tratados durante os últimos anos foram estudos de mecanismo de ligação entre o DNA e pequenas moléculas (DORRAJI; JALALI, 2013; ZHAO, et al., 2014; HASSAN; RAUF, 2015; SILVA, 2016; NASCIMENTO, 2017). Sendo o ácido nucleico o principal alvo intracelular para um grande número de medicamentos, as interações DNA-ligante são de fundamental interesse (RAUF, et al., 2005).

Como mostra a Figura 7a, o ligante modelo ao interagir com a biomolécula forma um complexo supramolecular, o qual pode interferir na atividade de várias enzimas e proteínas de interesse na manutenção da função e estrutura celular. Logo, a compreensão do mecanismo de ação de novos fármacos em nível molecular leva ao desenvolvimento de medicamentos mais eficazes para o controle e/ou até mesmo a cura de diversas patologias (REHMAN, et al., 2015).

A compreensão do mecanismo de resistência dos fármacos usados no controle de diversas neoplasias também se faz necessário, pois constitui um problema responsável pelo insucesso do tratamento, por exemplo, na quimioterapia. Existem dois tipos de resistência: a resistência primária, que ocorre antes do tratamento com fármaco; e a resistência adquirida, que pode ser adquirida ao longo do tempo de exposição. Nesse último, pode ocorrer resistência a múltiplas drogas, que pode estar relacionada a uma série de fatores, ainda não compreendidos, como mutação do DNA, aumento na reparação do DNA, aspectos relacionados ao metabolismo e incapacidade de sofrer apoptose. Enfim, algumas células possuem resistência que levam à redução da afinidade do fármaco pelo alvo biológico, formando um complexo supramolecular fraco (Figura 7b), o qual não interfere na atividade de proteínas e enzimas, e as doenças sem a cura desejada (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010; PAXTON, 2012).

Figura 7. (a) Etapas do processo de ação de fármacos tendo o DNA como alvo biológico até a cura de diversas patologias. (b) Mecanismo de resistência do DNA a fármacos nos processos de mutação.



Fonte: adaptado de SILVA, 2016.

O alto nível de toxicidade ou falta de eficiência de alguns fármacos utilizados no tratamento de doenças que possuem o DNA como alvo biológico fazem com que o estudo de novos medicamentos promissores seja indispensável e as interações DNA-ligante sejam claramente entendidas para formulação desses fármacos.

1.5 Interação DNA-ligante *in vitro*

1.5.1 Técnicas empregadas para interações DNA-ligante

Inúmeras são as técnicas instrumentais e métodos utilizados para o estudo de interações entre pequenas moléculas e o DNA, cada uma possuindo sua particularidade na determinação de parâmetros específicos e sendo selecionadas de acordo com o objetivo do estudo. Entre elas, podemos citar: espectroscopia de absorção UV-Visível, espectroscopia vibracional, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), calorimetria, dicroísmo circular, eletroquímico, eletroforese (capilar e em gel), espectrometria de massa, difração de raios-

X, espectroscopia Raman, espectroscopia de emissão de fluorescência, *docking* molecular, infravermelho (IV), entre outros. Essas técnicas são importantes ferramentas para caracterizar a natureza do complexo supramolecular formado (DNA-ligante) e as consequências da interação sobre a estrutura do DNA (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Neste trabalho foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de absorção de UV-visível e espectroscopia de emissão de fluorescência para avaliação da interação entre compostos bioativos e o *ct*DNA (*Calf thymus*), considerando as mais relevantes informações que essas técnicas podem nos dar quanto a interação entre o DNA e os ligantes *in vitro*.

1.5.1.1 Espectroscopia no UV-Visível

A espectroscopia de absorção no UV-Visível é uma técnica usada para análises qualitativas e quantitativas (SKOOG, et al., 2015). É também simples e muito efetiva tanto no estudo de interação entre moléculas ligantes e o DNA quanto na estabilidade dessas interações. Contudo, a precisão da técnica é falha quando o ligante e nucleotídeo absorvem radiação na mesma região. Como as medidas são baseadas na diminuição da radiação eletromagnética pela espécie absorvente, se DNA, ligante e complexo formado apresentarem comprimentos de onda de máxima absorção próximos, uma espécie pode influenciar na obtenção do sinal analítico da outra, resultando em interferência espectral e imprecisão nas medidas realizadas. Com isso, a aplicação da técnica de UV-Vis para avaliação da interação de ligantes com DNA mostra variações mais acentuadas quando o ligante absorve preferencialmente no visível (SILVA, 2016).

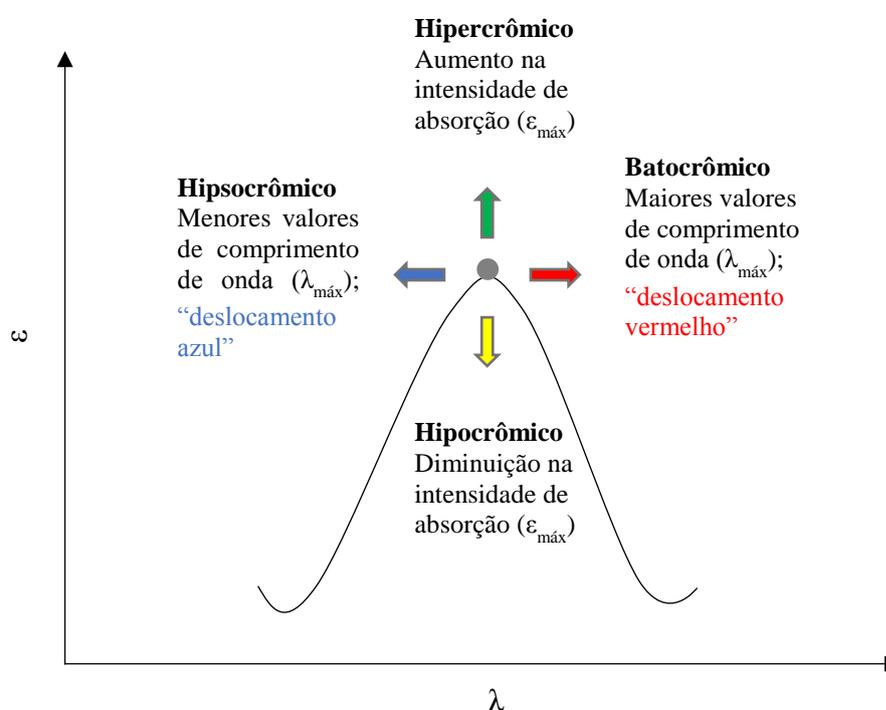
O espectro de absorção do DNA revela uma banda característica na região do UV, possuindo um máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) em 260 nm, graças às transições eletrônicas provenientes dos grupos cromóforos (grupos funcionais orgânicos insaturados que absorvem na região do ultravioleta ou visível) presentes nas bases nitrogenadas da macromolécula. A probabilidade dessas transições é alta e, portanto, a absorvância molar (ϵ) tem ordem de grandeza $10^4 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; todavia podem ocorrer pequenas variações no máximo de absorção e na absorvância se o pH ou força iônica do tampão mudar (GONZÁLEZ-RUIZ, et al., 2011).

A espectroscopia no UV-Vis também permite determinar a concentração molar do DNA, utilizando como base a Lei de Lambert-Beer, que estabelece uma relação entre a medida da absorvância e a concentração de uma solução que atravessa um feixe de luz

monocromática (SKOOG, et al., 2015). O cálculo da concentração usa como coeficiente de extinção $6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a partir da leitura do sinal de absorvância em 260 nm após diluição na proporção 1:100 (SAVARIZ, et al., 2014). Para assegurar que o DNA está livre de proteínas ou compostos utilizados na sua purificação ou conservação (fenol, por exemplo), emprega-se a razão das absorvâncias A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} , onde a proporção deve estar no intervalo 1,8-2,0 para ser satisfatório (GLASEL, 1995; SAVARIZ, et al., 2014). Vale ressaltar que as absorvâncias são analisadas nesses comprimentos de onda pois o DNA e as proteínas absorvem em 260 e 280 nm, respectivamente.

Algumas mudanças de posição da banda de absorção podem suceder quando compostos interagem com o DNA. Isso causa alguns efeitos como maiores ou menores valores de comprimentos de onda e aumento ou diminuição da intensidade de absorção, como observa-se na Figura 8:

Figura 8. Denominações de alguns efeitos causados pelas mudanças de posição da banda de absorção do DNA ao interagir com compostos.



Fonte: reproduzido de NASCIMENTO, 2017.

Segundo Sirajuddin e colaboradores (2013), a diminuição da distância entre o composto e as bases nitrogenadas da macromolécula, na intercalação, causa o efeito hipocrômico, o que é coerente com a interação de elétrons π dos compostos e das bases do DNA. Conseqüentemente, o nível de energia das transições eletrônicas $\pi - \pi^*$ diminui, resultando em efeito batocrômico. Já na interação DNA-ligante por atração eletrostática, mudanças conformacionais e estruturais no DNA, após a interação, são originados como consequência do efeito hipercrômico. Esse efeito ainda é intensificado pela presença de cátions que interagem com os grupos fosfatos da cadeia do DNA e também pelo contato externo ou parcial da hélice desenrolada do mesmo, que possuem mais bases expostas e menos ligações de hidrogênio.

1.5.1.1.1 Parâmetros importantes no estudo por UV-visível

A utilização da técnica de UV-visível permite determinar alguns parâmetros importantes no estudo de interação DNA-ligante, necessários para compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de interação. Esses parâmetros são obtidos por meio da análise do sinal de absorvância, analisando sua intensidade e deslocamento para valores maiores ou menores de comprimento de onda (NASCIMENTO, 2017).

Baseando-se na variação da absorvância, é possível determinar a constante de ligação (K_b) através da equação 1, mostrada abaixo, fundamentada na equação de Benesi-Hildebrand (BENESI; HILDEBRAND, 1949; SHAHABADI; HADIDI, 2012):

$$\frac{1}{A-A_0} = \frac{1}{A_\infty-A_0} + \frac{1}{K_b(A_\infty-A_0)} \times \frac{1}{[L]} \quad (\text{Equação 1})$$

onde A é a absorvância do DNA adicionado em diferentes concentrações, A_0 é a absorvância do DNA livre em 260 nm, A_∞ é a absorvância do complexo DNA-ligante, $[L]$ equivale a concentração do ligante e K_b é a constante de ligação, obtida pelo inverso do coeficiente angular (*slope*) do gráfico $\frac{A_0}{A-A_0}$ vs. $\frac{1}{[DNA]}$ (JU, et al., 2011).

Outra forma de verificar se ocorreu formação de complexo é através da absorvância do DNA, do composto e do complexo. Quando o somatório das absorvâncias do DNA (A_{DNA}) e do ligante ($A_{ligante}$) é diferente do valor da absorvância do complexo ($A_{complexo}$), pode-se afirmar que há formação de complexo DNA-ligante, uma vez que o coeficiente de absorvância molar do complexo é diferente do coeficiente do ligante e do DNA livres ($A_{DNA} + A_{ligante} \neq A_{complexo}$) e devido a não observância do efeito aditivo da lei de Beer,

resultando que o complexo formado tem coeficiente de absorvidade molar maior ou menor que os compostos isolados (WU, et al., 2011).

1.5.1.2 Espectroscopia de Fluorescência Molecular

A fluorescência é um processo de fotoluminescência no qual átomos ou moléculas são excitados por absorção de radiação eletromagnética. O excesso de energia adquirido pelas espécies excitadas é então liberado como fótons, e elas relaxam até o estado fundamental. Uma das características mais atrativas da fluorescência molecular está na sua sensibilidade intrínseca, a qual é, frequentemente, de uma a três vezes maior do que a da espectroscopia de absorção; outra vantagem são as faixas lineares de concentração dos métodos de fluorescência, que são consideravelmente mais largas que aquelas na espectroscopia de absorção (SKOOG, et al., 2015).

Devido às vantagens mencionadas no parágrafo anterior, a espectroscopia de fluorescência molecular é, muito provavelmente, a técnica mais utilizada nos estudos de interação DNA-ligante. Em geral, compostos aromáticos que contêm grupos funcionais com baixa energia de transição $\pi - \pi^*$ possuem intensa fluorescência se comparados com moléculas pequenas como hidrocarbonetos alifáticos, carbonilas ou compostos bastante conjugados e não aromáticos. Compostos com dupla ligação altamente conjugada também têm alguma fluorescência, mas em menor intensidade que os sistemas aromáticos. Salienta-se que as alterações na fluorescência se referem ao ligante livre ou complexo formado com o DNA, uma vez que a macromolécula não manifesta fluorescência (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; REHMAN, et al., 2015).

1.5.1.2.1 Parâmetros importantes no estudo por fluorescência

Estudos relacionados à variação da intensidade do sinal em função de titulações fluorimétricas permitem obter informações, tais como: o mecanismo de *quenching* (estático, dinâmico ou ambos); constante de ligação (K_b); os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG); número de sítios de ligação (n), que fornece a estequiometria da interação (DNA:ligante); os tipos de forças intermoleculares presentes no processo de interação e o modo de ligação preferencial (GONZÁLEZ-RUIZ, et al.; 2011; ZHAO, et al., 2014; SILVA, 2016). A adição de DNA pode levar ao aumento de fluorescência em alguns casos; então, é relevante salientar que o mecanismo de *quenching* só é analisado quando ocorre diminuição na fluorescência.

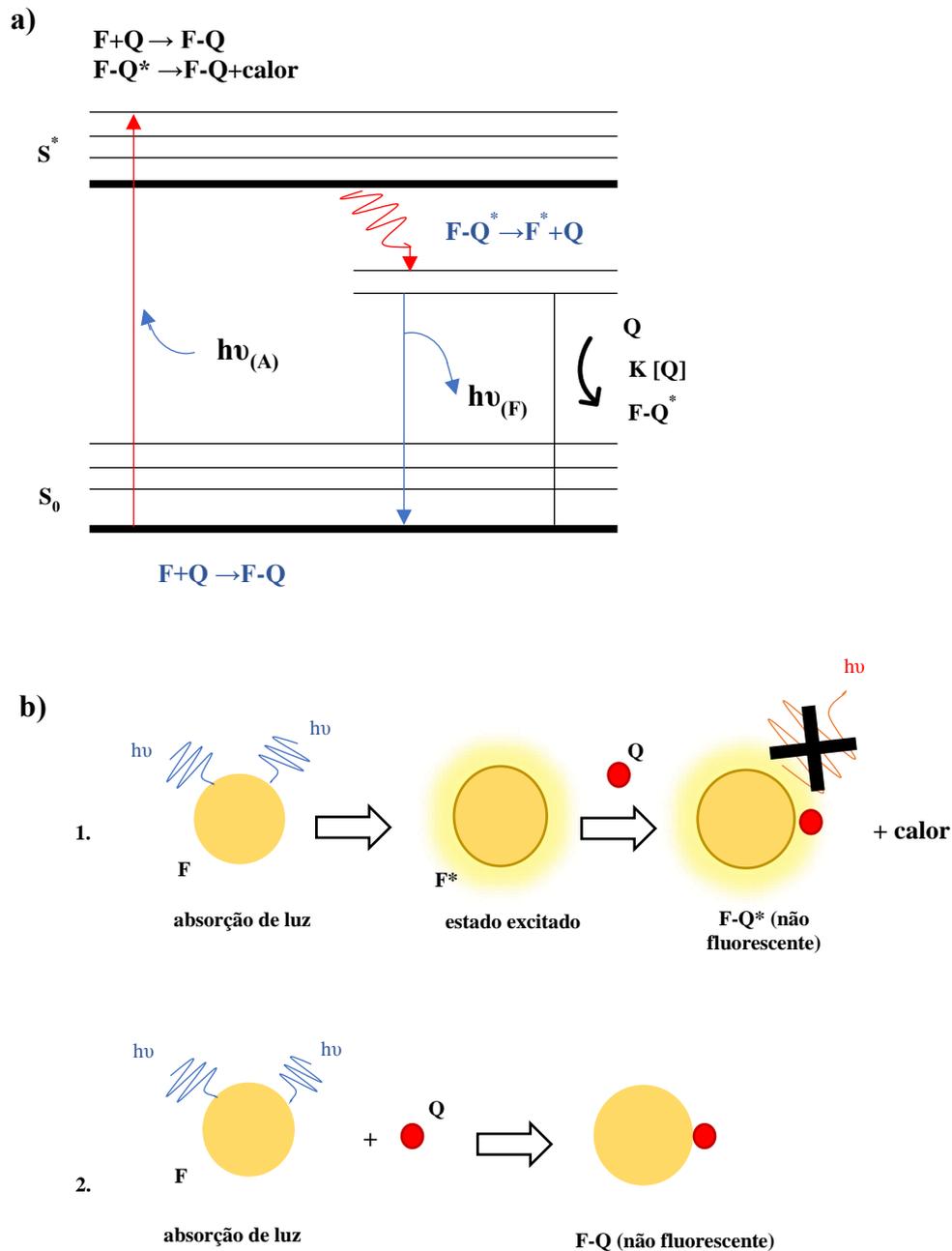
1.5.2 Mecanismo de *quenching*

Interações moleculares envolvendo transferência de energia, rearranjos moleculares, reações no estado excitado e/ou na formação de complexo no estado fundamental e extinção por colisão são algumas das possíveis consequências da diminuição de intensidade de fluorescência de uma amostra, sendo esse mecanismo denominado *quenching*. O processo de *quenching* é proporcionado pela presença de uma espécie responsável pela desativação do fluoróforo (substância de interesse no estado excitado), denominada espécie *quencher*, que inibe a emissão de fluorescência por um caminho não radioativo (LAKOWICZ, 2006).

São vários os tipos de mecanismos de *quenching*, entre os quais destacam-se dois principais: *quenching* estático e *quenching* dinâmico (ou colisional); e também, em algumas situações, ambos ocorrendo. Esquemáticamente, esses mecanismos podem ser representados pela transferência de energia da espécie excitada (F^*) e uma espécie *quencher* (Q), que levam a desativação do fluoróforo (F) no estado excitado ou fundamental (Figuras 9a e 10a) (MOLINA-BOLÍVAR, et al., 2014).

O *quenching* estático é o processo em que o fluoróforo no estado excitado forma, ao entrar em contato com a espécie *quencher*, um complexo não-fluorescente (F-Q) no estado fundamental, ocasionando a desativação radioativa do fluoróforo, liberação de calor e com isso redução do sinal analítico (ZHAO, et al., 2014; MOLINA-BOLÍVAR, et al., 2014). A Figura 9 exhibe esse mecanismo:

Figura 9. Representação do mecanismo de *quenching* estático (a) Diagrama de Jablonski para o processo de *quenching* estático. (b) Representação genérica de um sistema na presença de um *quencher* Q.



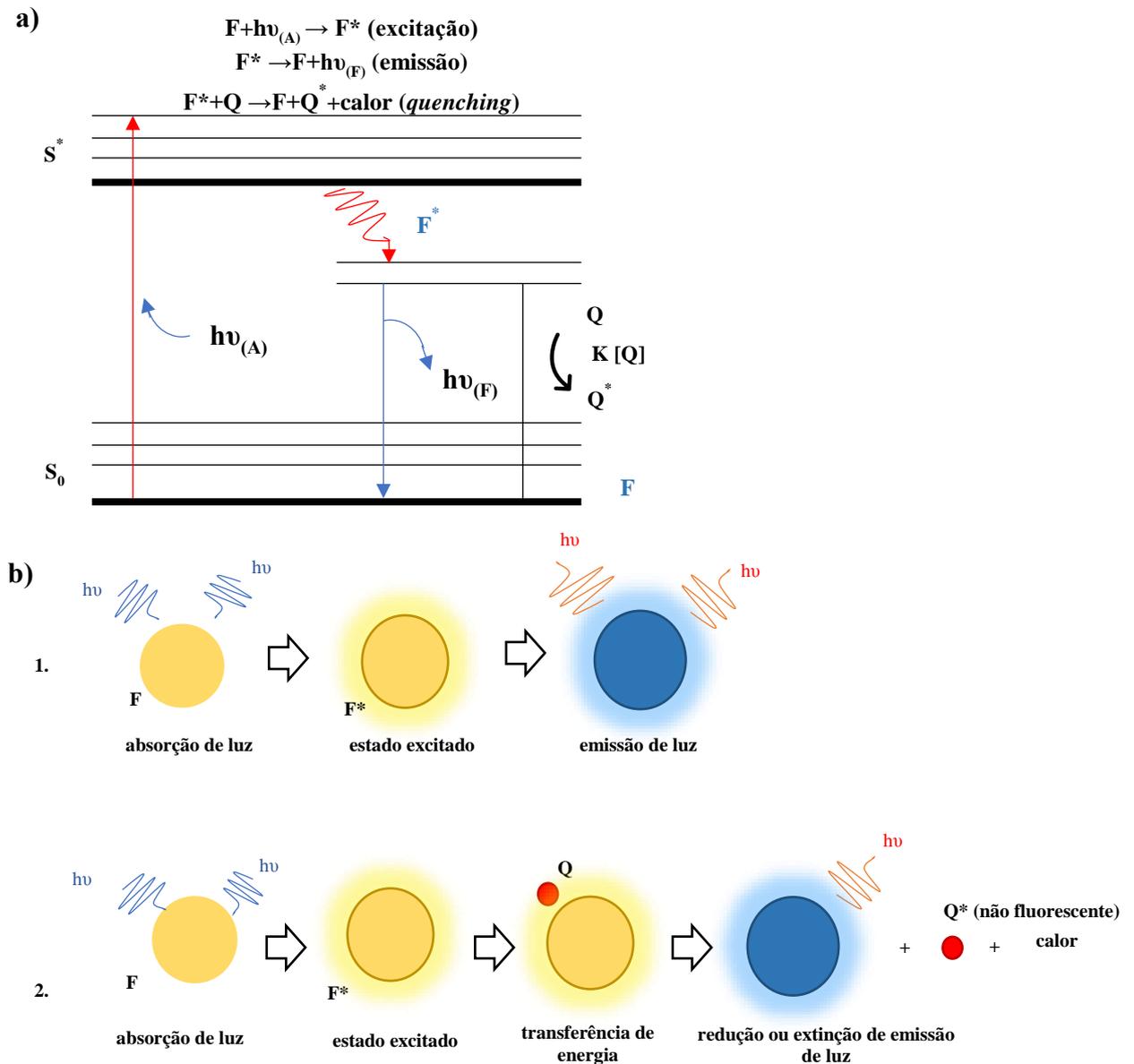
Fonte: adaptado de DANTAS, 2015.

Já o *quenching* dinâmico é resultante da colisão difusional entre o *quencher* e o fluoróforo, sendo que esse transfere energia para aquele no estado excitado, resultando em

desativação radioativa do fluoróforo e redução do sinal de fluorescência (Figura 10) (LAKOWICZ, 2006).

Os dois mecanismos podem coexistir, porém podem ser distinguidos por meio de sua viscosidade, de seus tempos de vida fluorescente ou pela diferença da dependência de temperatura (MANSOURI, et al., 2013). O aumento da temperatura reduz a estabilidade dos complexos e com isso diminui-se os valores das constantes de *quenching* estático. Em contrapartida, altas temperaturas ocasionam maiores quantidades de *quenching* colisional, aumentando assim a constante de *quenching* com a temperatura no caso do *quenching* dinâmico (MOLINA-BOLÍVAR, et al., 2014).

Figura 10. Representação do processo de *quenching* dinâmico ou colisional. **(a)** Níveis de energia (diagrama de Jablonski) para o processo de *quenching* dinâmico. **(b)** Representação geral de um sistema na ausência (1) e na presença de um *quencher* Q (2).



Fonte: adaptado de DANTAS, 2015.

A diminuição da intensidade de fluorescência pode ser quantificada através da equação de Stern-Volmer:

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

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência antes e depois da adição do *quencher*, respectivamente; K_q é a constante de velocidade de *quenching* bimolecular difusional ($2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), τ_0 é o tempo de vida médio (10^{-8} s), $[Q]$ é a concentração *quencher* (DNA) e K_{SV} é a constante de *quenching*, obtida por meio do coeficiente angular do gráfico F_0/F versus $[Q]$ (JUNIOR; NOVO, 2014).

O estudo por UV-vis também fornece informações sobre o tipo de *quenching* avaliado através de experimentos em diferentes temperaturas e determinando-se os valores das constantes (K_{SV}). O processo de *quenching* dinâmico não altera o estado fundamental, apenas o estado excitado, e com isso não há alterações no espectro molecular de absorção do complexo formado ($A_{\text{complexo}} = A_{\text{DNA}} + A_{\text{composto}}$). Contudo, no *quenching* estático haverá mudanças nos perfis e na intensidade dos respectivos espectros (WU, et al., 2011).

1.5.2.1 Constantes de ligação (K_b)

Não só a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) é determinada pelo estudo de espectroscopia de fluorescência molecular. Também é possível determinar a constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n), o qual refere-se a estequiometria do complexo supramolecular formado. A constante de ligação é um valor quantitativo que avalia a magnitude da interação entre o ligante e a macromolécula relacionando a variação da intensidade de fluorescência do complexo com o aumento da concentração do DNA; pode ser calculada pela equação 3:

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (\text{Equação 3})$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do ligante, respectivamente; $[L]$ é a concentração do ligante; K_b é a constante de ligação e n é o número de sítios de ligação; esses dois últimos são obtidos a partir da curva de $\log \frac{(F_0 - F)}{F}$ vs. $\log [ctDNA]$.

1.5.3 Avaliação do modo de ligação

Além dos parâmetros já citados, o modo de ligação do ligante ao interagir com o DNA pode ser determinado, recorrentemente, pela espectroscopia de fluorescência molecular. Mudanças espectrais nas propriedades de emissão do ligante na presença e ausência do ácido nucleico fazem com que o modo de ligação seja analisado sob duas

estratégias: testes com pequenas moléculas ou íons que agem como supressores de fluorescência, a citar o iodeto de potássio, como também a competição de sondas fluorescentes (LAKOWICZ, 2006; SARWAR, et al., 2015).

1.5.3.1 Ensaio com iodeto de potássio (KI)

Segundo Lakowicz (2006), muitas moléculas ou íons podem atuar como *quencher*s dinâmicos, como por exemplo aminas, oxigênio, halogênios e moléculas deficientes em elétrons como acrilamida. Nos halogênios, o processo de *quenching* ocorre devido ao acoplamento orbital-spin e conversão intersistema para o estado tripleto.

O ensaio com iodeto de potássio, KI, é um exemplo do estudo do modo de ligação. O íon iodeto interage com o ligante quando esse está desimpedido. Com isso, a constante de Stern-Volmer é empregada como parâmetro de indicação de acessibilidade do íon iodeto ao fluoróforo, na presença e ausência de DNA. Quando o modo de ligação da interação DNA-ligante ocorre via intercalação as moléculas do ligante, presentes na dupla hélice do DNA, estão impedindo os íons iodeto se aproximarem da macromolécula, diminuindo assim o valor de K_{SV} . Contrariamente, nos modos de ligação via *groove* ou eletrostático, os ligantes estão mais livres fazendo o inibidor aniônico dispor maior sítio de interação e, conseqüentemente, aumentar o valor da constante de Stern-Volmer (LING, et al., 2008; REHMAN, et al., 2015).

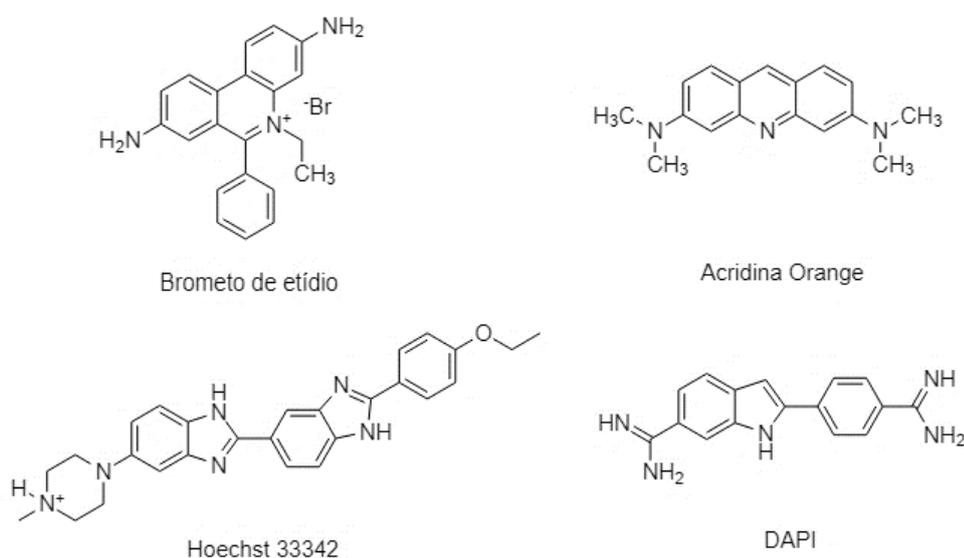
1.5.3.2 Ensaio de competição

O uso de sondas fluorescentes também é uma importante ferramenta na determinação do modo de ligação já que o DNA apresenta baixa fluorescência quando isolado; contudo, um aumento na emissão de fluorescência é perceptível quando o ácido nucleico está, na forma complexada, em contato com estabelecida sonda. As sondas mais empregadas são brometo de etídio (BE) e acridina orange para o modo de ligação via intercalação; Hoechst 33342 e DAPI para o modo de ligação via *groove*. O brometo de etídio, BE, é uma sonda que pouco fluoresce, mas, em solução com o DNA tem sua intensidade de fluorescência aumentada. Como a ligação situa-se entre os pares das bases nitrogenadas da macromolécula, a intercalação é o modo de ligação dessa interação (macromolécula-sonda) (LAKOWICZ, 2006).

Através de ensaios de competição com BE, é possível estudar o modo de ligação DNA-ligante. Sabendo que o BE é um intercalante conhecido, a presença de um ligante que interaja da mesma forma leva à "competição"/"disputa" pelo mesmo sítio da molécula

levando um deslocamento de BE intercalado entre os pares de bases, resultando uma diminuição na intensidade de fluorescência (SAVARIZ, et al., 2014). Quando não há alterações espectrais do complexo DNA-BE, o modo de ligação deve-se manifestar preferencialmente via outro mecanismo (*groove* ou eletrostático), e pode ser analisado por outras sondas, conforme citado anteriormente, como DAPI e Hoechst 33342 (BASU; KUMAR, 2013; NASCIMENTO, 2017). As estruturas químicas das sondas citadas acima são ilustradas na Figura 11:

Figura 11. Estruturas químicas das sondas para intercalação Brometo de etídio (BE) e Acridina Orange e das sondas para *groove* Hoechst 33342 e DAPI.



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

1.5.3.3 Parâmetros Termodinâmicos

Parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação de ligantes com o DNA podem ser determinados por espectroscopia de fluorescência molecular, inclusive por outras técnicas. Forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, e ligações de hidrogênio são as principais interações não covalentes, sendo importantes no desempenho na interação DNA-ligante (HAQ, 2002; SILVA, 2016).

Os complexos formados entre DNA e os ligantes é avaliado a diferentes temperaturas e viabiliza a determinação dos parâmetros termodinâmicos como variação de

entalpia (ΔH) e de entropia (ΔS) por meio da aplicação da equação de Van't Hoff mostrada abaixo:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad (\text{Equação 4})$$

onde K_b representa a constante de ligação, T a temperatura em Kelvin (K) e R a constante do gás ideal ($8,314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Já o valor da energia livre de Gibbs, ΔG , pode ser calculado tal em função dos valores de ΔH e ΔS (Equação 5), tal quanto pelo valor da constante de ligação (Equação 6).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equação 5})$$

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad (\text{Equação 6})$$

Pelos dados de variação de entropia (ΔS) e entalpia (ΔH), o modo preferencial de ligação pode ser classificado da seguinte maneira (SHAHABADI; HADID, 2012):

- a) $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ preferencialmente forças hidrofóbicas;
- b) $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio;
- c) $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$, preferencialmente interações eletrostáticas.

De forma geral, a intercalação de ligantes na dupla hélice do DNA é estabilizada por interações de van der Waals e hidrofóbicas, ao passo que as moléculas ligantes nos sulcos do DNA interagem, especialmente por meio de interações hidrofóbicas (REHMAN, et al., 2015; SILVA, 2016). Vale ressaltar que a espontaneidade do processo de interação pode ser avaliada pela energia livre de Gibbs (ZHANG, et al., 2009).

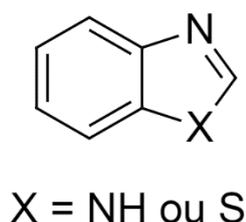
1.6 Derivados benzimidazois e benzotiazois

A química e o estudo biológico de compostos heterocíclicos tem sido um campo interessante por muito tempo na química medicinal. Um número de derivados heterocíclicos contendo átomos de nitrogênio e enxofre servem como estruturas únicas e versáteis para o planejamento experimental de fármacos (PATEL; SHAIKH, 2010).

Benzimidazois e benzotiazois constituem duas classes de compostos heterocíclicos caracterizados estruturalmente pela presença de um anel benzênico unido a um núcleo imidazol e tiazol, respectivamente (Figura 12) (ARAÚJO, 2015). As subunidades benzimidazólica e benzotiazólica se fazem presentes na estrutura de alguns insumos

agrícolas e fármacos (alguns, inibidores de atividade ureolítica) e uma variedade de produtos naturais, sendo em muitos casos a responsável pelas atividades biológicas observadas, a citar como antiviral, antiprotozoária, anti-inflamatória, antibacteriana, antidepressivo, antiulcerativo, anticâncer, antiparkinson, inibidores de quinases, entre outros (BACHHAV, et al., 2011; KHOSRAVI; KAZEMI, 2012).

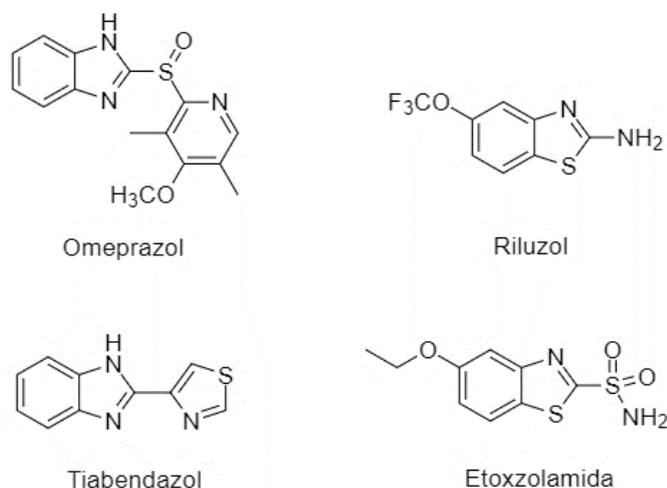
Figura 12. Estrutura geral dos benzimidazois (X = NH) e dos benzotiazóis (X = S).



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Vários fármacos comerciais tem em sua constituição um desses dois relevantes grupos farmacofóricos, do qual citam-se: o omeprazol, utilizado para o tratamento de infecções causadas pela bactéria *Helicobacter pylori*; o riluzol, usado no tratamento de esclerose amiotrófica lateral; o tiabendazol, um anti-helmíntico e antifúngico; e a etoxzolamida, utilizada no tratamento de glaucoma, de úlceras duodenais e usada como diurético (SANTOSH, et al., 2011; KUMAR, et al., 2012; MOHAMMADI, et al., 2014). As estruturas dos fármacos citados acima estão exibidas na Figura 13:

Figura 13. Estruturas químicas dos fármacos omeprazol, riluzol, tiabendazol e etoxzolamida.



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

1.6.1 Os derivados benzimidazólicos

A atenção pela classe de compostos dos benzimidazóis teve início na década de 1950, com a descoberta do *N*-ribosil-dimetilbenzimidazol, que se complexa ao cobalto da vitamina B12 (DUBEY; SANYAL, 2010). Tal fato resultou, em 1961, na descoberta do tiabendazol (Figura 13), que foi o primeiro benzimidazol comercializado durante quarenta anos e amplamente utilizado até os dias de hoje como anti-helmíntico e antifúngico (SANTOSH, et al., 2011). Com a comercialização desse primeiro, estimulou-se outros químicos de todo o mundo a projetar e sintetizar outros benzimidazóis para o rastreamento da atividade anti-helmíntica, todavia, menos de 20 deles alcançaram uso comercial; sendo elaborados por empresas farmacêuticas e relatados apenas na literatura de patentes (TOWNSEND; WISE, 1990).

Em geral, os compostos benzimidazólicos e os carbamatos de benzimidazol são materiais cristalinos com pontos de fusão bastante elevados e relativamente pouco solúveis em água. Após administração, os benzimidazóis são extensivamente metabolizados em mamíferos. O composto original é geralmente de curta duração e metabolizado predominantemente no plasma, tecidos e excretas. Devido à limitada solubilidade em água, como retratado anteriormente, a classe dos benzimidazóis pode ter uma grande diferença na absorção e na sua eficácia resultante (DUBEY; SANYAL, 2010).

1.6.2 Os derivados benzotiazóis

Um dos mais importantes compostos heterocíclicos e de grande interesse científico hoje em dia são os derivados benzotiazóis. Eles são amplamente encontrados na química bioorgânica e medicinal com aplicação na descoberta de fármacos (GUPTA; RAWAT, 2010). A busca pela explicação do agradável odor do 2-fenil-benzotiazol, um composto orgânico com um átomo de enxofre, incentivou pesquisadores no final do século XIX a sintetizar derivados benzotiazóis (BOGERT; MEYER, 1922).

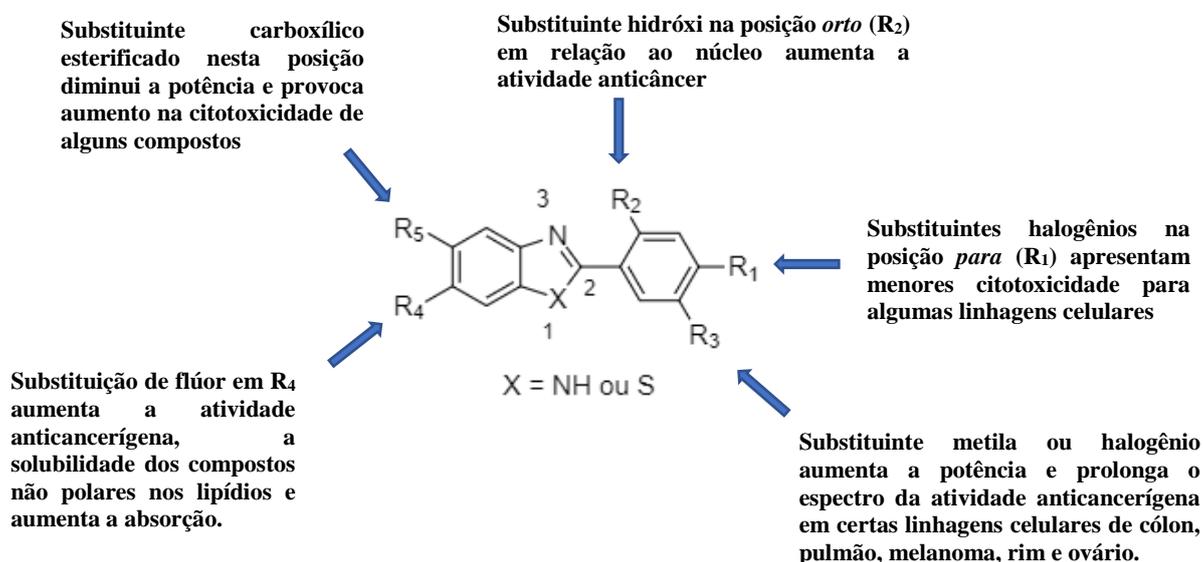
Algumas mudanças estruturais podem ser realizadas, como a adição de grupos ou radicais para tender ao aumento das atividades biológicas, e, portanto, os compostos derivados apresentarem atividade *in vitro* mais promissora (XIANG, et al., 2012; SHI, et al., 2012), incluindo efeitos anti-HIV, antibacterianos, antitumorais e neuroprotetores (MOHAMMADI, et al., 2014).

1.6.3 Relação estrutura-atividade

Na química medicinal a relação estrutura-atividade compreende os "efeitos que a estrutura química de um composto pode causar durante sua interação com o receptor biológico" (ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010).

A substituição de um átomo de hidrogênio por um determinado substituinte (como um halogênio ou grupos alquilas, nitro, ciano, carboxilato, entre outros) pode modificar a potência, duração e a natureza do efeito farmacológico de uma molécula. As modificações produzidas pela introdução de um substituinte podem atingir várias propriedades da molécula, tais como hidrofobicidade, a densidade eletrônica e a conformação estrutural, cuja análise pode orientar novas sínteses (CECHINEL-FILHO; YUNES, 2001). No Esquema 2 pode se observar a relação entre a substituição em diferentes posições na estrutura dos derivados benzimidazóis e benzotiazóis e sua atividade antitumoral. As influências dos substituintes foram relatadas na literatura (MCCRACKEN; LIPKOWITZ; 1990; YADAV; GANGULY, 2015; ARAÚJO, 2015).

Esquema 2. Influência das substituições em derivados benzimidazois e benzotiazóis para a atividade antitumoral.



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Baseado nisso, o grupo de pesquisa do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais tem sintetizado e avaliado diversos compostos derivados benzimidazois e benzotiazóis, com diferentes substituintes na posição 2 do núcleo imidazólico e/ ou tiazólico. Desta forma, o presente trabalho estuda quatorze compostos (7 pares de compostos benzotiazóis e benzimidazois), com suas atividades biológicas previamente estabelecidas pelo mesmo grupo de pesquisa, e sua interação com *ctDNA*.

1.7 Doenças tendo como alvo biológico o DNA

Diversas doenças que possuem o DNA como alvo biológico no organismo podem ser estudadas através do entendimento da estrutura e função do mesmo, bem como pela interação de fármacos com a macromolécula. Dentre essas doenças, podem-se destacar a leishmaniose, uma doença parasitária, e o câncer, uma doença que gera mutação genética nos organismos.

1.7.1 Câncer

Segundo o Instituto Nacional de Câncer, INCA, o câncer "é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos". O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Na verdade, a palavra câncer de origem latina (*cancer*) significando "caranguejo" deve ter sido empregada em analogia ao modo de crescimento penetrante, que pode ser comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção (BRASIL, 1971). Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas (INCA, 2018; ALMEIDA, et al., 2005).

Informações sobre a ocorrência de câncer e seu desfecho são requisitos essenciais para programas nacionais e regionais para o controle da doença, além de pautar a agenda de pesquisa sobre câncer (STEWART; WILD, 2014). A estimativa mundial revela que, em 2012, ocorreram 14,1 milhões de casos novos de câncer (exceto câncer de pele não melanoma) e 8,2 milhões de óbitos. Houve um pequeno predomínio do sexo masculino tanto na mortalidade (57%) quanto na incidência (53%), sendo, de modo geral, as maiores taxas de incidência observadas nos países desenvolvidos (América do Norte, Japão, Austrália, entre outros); taxas intermediárias verificadas na América Latina, Leste Europeu e Sudeste Asiático (inclusive China) e taxas menores em grande parte da África e no Sul e Oeste da Ásia (incluindo Índia). Os tipos de câncer mais predominantes nos países desenvolvidos estão associados à urbanização e ao desenvolvimento, como câncer de pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto; nos países de baixo e médio desenvolvimento a ocorrência de tipos de câncer relacionados a infecções (como colo do útero, estômago, esôfago e fígado) ainda é alta. Além disso, apesar da baixa incidência, a mortalidade representa quase 80% dos óbitos de câncer no mundo (FERLAY, et al., 2013).

Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências foram encontradas na mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo de útero (7,9%) e estômago (4,8%) (FERLAY, et al., 2013).

No Brasil, estima-se para o biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer anualmente. Esse número já leva em consideração o câncer de pele não

melanoma, o qual corresponde a 28,3% dos novos casos da doença (170 mil casos). O cálculo global corrigido para o sub-registro, segundo Mathers et al. (2003), aponta a ocorrência de 640 mil novos casos. Essas estimativas refletem o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina e cólon e reto entre os mais incidentes, contudo ainda apresenta altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago (INCA, 2018). A Tabela 1 exibe as estimativas de casos novos de câncer segundo sexo e localização primária no Brasil; já a Figura 14 mostra a distribuição dos dez diferentes tipos de câncer mais incidente para o ano de 2018 no Brasil, por sexo:

Tabela 1. Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas e ajustadas^a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	68.220	66,12	67,82	15.720	70,76	66,31	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	59.700	56,33	51,29	19.920	80,33	63,98
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.370	15,43	17,11	4.620	18,66	17,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	18,16	16,97	4.520	20,33	21,05	12.530	11,81	9,22	3.710	15,06	11,44
Cólon e Reto	17.380	16,83	20,03	5.630	25,34	25,16	18.980	17,90	18,40	6.820	27,49	20,84
Estômago	13.540	13,11	14,98	3.240	14,55	10,95	7.750	7,32	5,96	2.210	8,92	5,34
Cavidade Oral	11.200	10,86	11,22	2.770	12,38	12,03	3.500	3,28	2,86	1.010	3,89	2,80
Laringe	6.390	6,17	6,31	1.540	6,86	8,44	1.280	1,20	0,96	420	1,30	0,92
Bexiga	6.690	6,43	7,79	1.920	8,59	9,20	2.790	2,63	2,21	890	3,42	2,61
Esôfago	8.240	7,99	6,73	1.450	6,46	7,04	2.550	2,38	1,67	540	1,85	1,38
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.150	5,79	4,80	2.140	8,46	6,54
Linfoma de Hodgkin	1.480	1,43	1,14	550	2,19	1,93	1.050	0,96	0,92	400	1,33	1,19
Linfoma não Hodgkin	5.370	5,19	5,42	1.480	6,59	6,81	4.810	4,55	4,19	1.520	6,10	5,44
Glândula Tireoide	1.570	1,49	1,50	500	1,87	1,76	8.040	7,57	5,88	2.490	10,01	7,02
Sistema Nervoso Central	5.810	5,62	5,49	1.340	6,10	6,55	5.510	5,17	5,17	1.400	5,63	4,70
Leucemias	5.940	5,75	5,51	1.480	6,69	6,58	4.860	4,56	4,29	1.190	4,72	4,59
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	6.600	6,22	5,44	2.370	9,46	7,46
Pele Melanoma	2.920	2,82	2,69	800	3,34	3,31	3.340	3,16	2,15	880	3,42	2,74
Outras Localizações	41.480	40,17	35,26	9.470	42,62	43,45	36.230	34,17	29,04	8.920	36,00	28,39
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	214.970	208,32	217,27	52.410	235,91	226,91	202.040	190,61	191,78	61.450	247,95	199,05
Todas as Neoplasias Malignas	300.140	290,86	-	69.430	312,52	-	282.450	266,47	-	78.680	317,47	-
Todas as Neoplasias Malignas Corrigidas para Sub-Registro	324.580	314,55	-	-	-	-	310.300	292,74	-	-	-	-

*População padrão mundial (1960). / *Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: reproduzido de INCA, 2018.

Figura 14. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens 	Mulheres 	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, 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%			Traqueia, 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%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: adaptado de INCA, 2018.

O câncer também é inicialmente classificado pelo tipo de célula originária. Como exemplo, temos o carcinoma que é originado de células epiteliais presentes no revestimento dos órgãos, e o tipo mais comum de câncer; e a leucemia, também conhecida como "câncer do sangue", originada na medula óssea (encarregada pela produção de glóbulos brancos) e que causa uma elevada concentração de glóbulos brancos (ALMEIDA, et al., 2005). Há outros tipos de câncer, e cada uma recebe o tratamento mais adequado de acordo com sua classificação.

1.7.2 Tipos de tratamento para o câncer

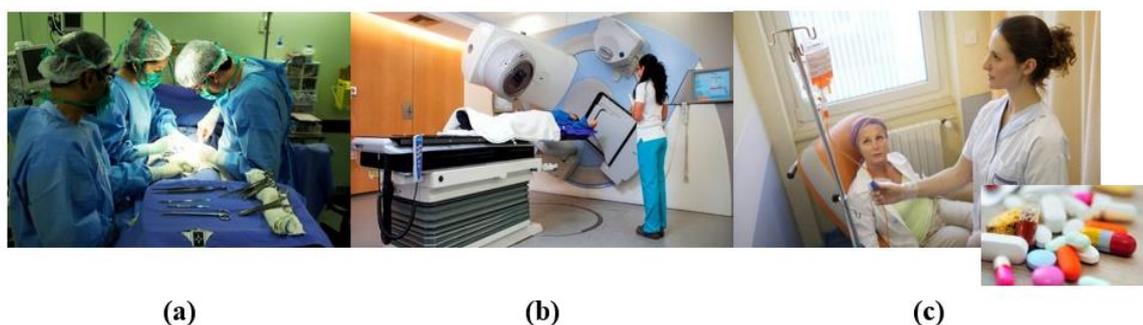
Os principais tipos de tratamentos para o câncer são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Há casos em que duas modalidades de tratamento podem ser combinadas para um melhor resultado, que consiste na erradicação do câncer.

Cirurgia: Geralmente é utilizada em tratamento de tumores sólidos que ocupam determinada área. Por ser um tratamento local apenas parte do corpo é atingida pela doença. A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástase (casos em que o câncer já está mais evoluído e espalhado pelo corpo); no caso da leucemia, por exemplo, costuma-se utilizar outros tipos de terapia, como o transplante de medula (MURAD; KATZ, 1996). Alguns fatores adversos como dores, fastio, dificuldade de locomoção e uma recuperação mais demorada podem desmotivar o uso desse tratamento (INCA, 2018; ALMEIDA, et al., 2005).

Radioterapia: Tratamento no qual se utilizam radiações para destruir um tumor ou impedir que suas células aumentem. Estas radiações não são vistas, e durante a aplicação o paciente não sente nada. Mesmo que sejam usados os sensibilizadores (que diminuam os efeitos colaterais) o tratamento por radiação é sujeito a severas limitações; e os efeitos colaterais mais frequentes são fadiga, irritação cutânea e inapetência (INCA, 2018; ALMEIDA, et al., 2005).

Quimioterapia: Tratamento que usa compostos químicos (medicamentos e/ou agentes quimioterápicos) para combate ao câncer. Eles são aplicados, em sua maioria, na veia, podendo também ser dados por via oral, intramuscular, subcutânea, tópica e intratecal. Os medicamentos se misturam com o sangue e são levados a todas as partes do organismo, destruindo as células doentes que estão formando o tumor e impedindo, também, que elas se espalhem pelo corpo. Entretanto, grande parte dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, atingindo tanto as células cancerosas quanto as saudáveis, especialmente as células de rápido crescimento como as do sistema gastrointestinais, imunológico e capilares, o que explica a perda de cabelo, maior suscetibilidade às infecções e náuseas como efeitos colaterais (INCA, 2018; NASCIMENTO, 2017).

Figura 15. Tipos de tratamento para o câncer. (a) Cirurgia. (b) Radioterapia. (c) Quimioterapia.



Fonte: adaptado de VENTURA, 2017; LUZ, 2018 e LAPRENSA, 2016.

Os agentes antineoplásicos possuem diferentes alvos de ação, e em muitos deles o mecanismo de ação está associado à interação com DNA, que é considerado um alvo importante na busca de fármacos para o tratamento do câncer. A importância clínica dos agentes antineoplásicos induz a necessidade de estudos sistemáticos, o que primeiramente

deveria ser feito com o uso de classificações químicas, levando-se em conta os diferentes grupos funcionais presentes na estrutura das moléculas dos agentes anticancerígenos. Dentre os agentes antineoplásicos que interagem com o DNA, destacam-se os agentes alquilantes, principalmente as mostardas nitrogenadas, que foram as pioneiras no tratamento quimioterápico (NASCIMENTO, 2017; SILVA, et al., 2012; ALMEIDA, et al., 2005). Podem ser citados ainda alguns derivados dos benzimidazóis e benzotiazóis, que possuem atividade antiproliferativa frente a algumas linhagens celulares de cânceres humanos, sendo então possíveis candidatos a fármacos anti-câncer.

1.7.3 Atividade antiproliferativa de benzimidazóis e benzotiazóis

As células cancerígenas são produtos de uma série complexa de transformações celulares iniciando-se, muitas vezes, por mutações ou por rearranjos do DNA que desestabilizam o fenótipo celular anterior (CSERMELY, et al., 2015). Esta transformação celular e multiplicação desordenada possibilitam o crescimento do tumor e a metástase na sua forma maligna (WANG, et al., 2015).

Hanahan e Weinberg (2000) sugeriram seis mudanças essenciais na fisiologia celular que juntamente prescrevem o crescimento maligno: autossuficiência para o crescimento celular; insensibilidade aos inibidores de crescimento; evasão da morte celular programada (apoptose); potencial replicativo ilimitado; estímulo do crescimento de vasos sanguíneos para o fornecimento de nutrientes e invasão de tecidos e órgãos.

Isso tudo estimulou, nas últimas décadas, pesquisadores a desenvolver fármacos anticâncer com a finalidade de controlar o aumento dessa doença tão devastadora. Desde 1960, quando se observou a atividade antitumoral de complexos com metais de transição, como a *cis*-diamina-dicloroplatina (II) (cisplatina), até os dias mais atuais, com complexo de rutênio (III) (NAMI-A) em fase de estudos pré-clínicos e apresentando atividade antitumoral para o tratamento de câncer de pulmão (ZHU; ZHOU, 2015; RADEMAKER-LAKHAI, et al., 2004), inúmeros estudos são desenvolvidos buscando auxiliar no design de novos ligantes com propriedades seletivas de ligação e atividades biológicas melhoradas. Entre esses ligantes destacam-se os benzimidazóis e benzotiazóis.

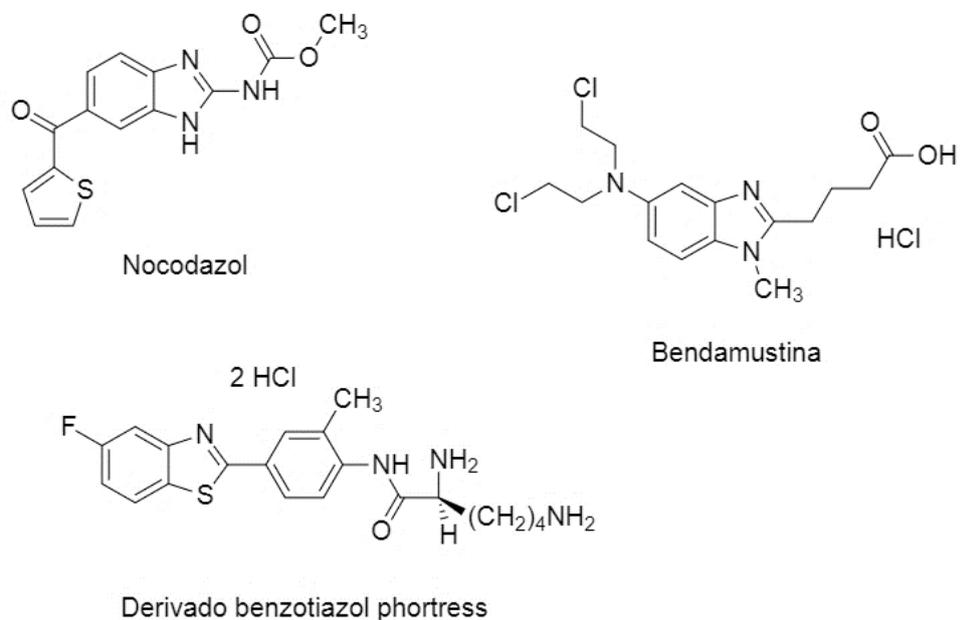
Os heterociclos benzimidazólicos e benzotiazólicos são importantes compostos bioativos de origem natural ou sintética (SUNG, et al., 2013; SANTOSH, et al., 2011; COBAN, et al., 2009). Já se conhece que os benzimidazóis são inibidores da cinesina mitótica (KSP), do fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1), da enzima 17 α -hidroxilase/17,20 liase e da DNA topoisomerase I, os quais são importantes alvos para o desenvolvimento de

fármacos anticâncer (KARPINSKA, et al., 2011). Os benzotiazóis são inibidores da enzima tirosina quinase (HUTCHINSON, et al., 2002), um receptor de superfície celular com alta afinidade por polipeptídios relacionados aos fatores de crescimento, como hormônios e citosinas, evidenciando um importante papel no desenvolvimento de vários tipos de câncer (BHUVA; KINI, 2010).

Coban e colaboradores (2009) sintetizaram benzimidazóis e avaliaram suas atividades antiproliferativas frente à três linhagens de células de câncer. Lindgren e colaboradores (2014) realizaram estudos de modelagem molecular de dezessete derivados do (*E*)-2-benzotiazóis-hidrazonas. Esses compostos foram sintetizados e avaliados *in vitro* frente a três linhagens de células de câncer: HL-60 (leucemia), MDAMB-435 (câncer de mama) e HCT-8 (câncer de cólon). Dezessete derivados benzotiazóis foram sintetizados por Caleta e colaboradores (2004) e testados *in vitro* frente a quatro linhagens de células tumorais malignas: carcinoma de cólon (SW620), carcinoma de laringe (Hep2), melanoma (HBL) e carcinoma de colo de útero (HeLa).

Enfim, vários estudos têm demonstrado a atividade antiproliferativa de benzimidazóis e benzotiazóis. Além dos derivados em estudo, alguns benzimidazóis já são usados como quimioterápicos clínicos, como o nocodazol e a bendamustina (Figura 16), por exemplo, utilizados no tratamento de leucemia linfocítica crônica (PARK, et al., 2012; HALLEK, et al., 2015), que é a forma mais recorrente de leucemia nos países ocidentais (BAUMANN, et al., 2014). Outro derivado, este benzotiazol, *phortress* (Figura 16) usado no tratamento de câncer de mama, ovário e rim, já está em estudo clínico (FICHTNER et al., 2004).

Figura 16. Estruturas químicas dos quimioterápicos nocodazol e bendamustina e do derivado benzotiazol *phortress*.



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Assim, o desenvolvimento de novos agentes antitumorais se faz necessário para obter compostos que minimizem ou solucionem os efeitos colaterais dos fármacos utilizados atualmente, além de vencer a frequente resistência das células cancerígenas frente aos quimioterápicos (FOO; MICHOR, 2014). Desta forma, benzimidazóis e benzotiazóis constituem uma promissora classe de substâncias para a descoberta de novos antitumorais.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a interação entre compostos sintéticos derivados dos benzimidazóis e benzotiazóis com *ctDNA* (DNA *Calf thymus*) por meio de métodos espectroscópicos, buscando o entendimento do mecanismo de ação dos compostos sintetizados para indicar o modo de interação DNA-ligante e, assim, otimizar a atividade antitumoral destas moléculas.

2.2 Específicos

- Determinar os parâmetros relativos à interação entre os derivados benzimidazóis e benzotiazóis e *ctDNA*: constante de ligação (K_b), número de sítios (n) e parâmetros termodinâmicos: entalpia, entropia e energia livre de Gibbs (ΔH , ΔS e ΔG , respectivamente) através de métodos espectroscópicos;
- Avaliar as principais forças envolvidas no processo de interação;
- Estudar o mecanismo de *quenching*;
- Realizar testes com o iodeto de potássio e ensaios de competição com brometo de etídio (BE) e berenil para estudar o modo de ligação DNA-ligante em diferentes concentrações de DNA;
- Correlacionar os valores das constantes de ligação (K_b) obtidas com os valores de IC_{50} em busca de relação entre interação com *ctDNA* e o mecanismo de ação da atividade antiproliferativa.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados nos experimentos são de grau analítico de pureza. As soluções foram preparadas com água ultrapura com resistividade específica de 18,2 M Ω cm, a partir de um sistema de purificação Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, USA; Gehaka modelo Master All e modelo OS10LXE, Brasil).

Os compostos orgânicos usados nesse estudo foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do Professor Doutor Ângelo de Fátima, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, com participação de sua aluna de doutorado Débora Pereira Araújo, e cujas rotas sintéticas e caracterização espectroscópicas já foram estabelecidas. Foi empregado nos estudos de interação o DNA (*Calf thymus*, *ctDNA*) tipo I na forma de fibras (Sigma-Aldrich, USA); este é extraído do tecido do timo de bezerro de gênero não especificado e através de um método que fornece uma mistura de DNA de dupla fita e fita simples, contudo prevalece a forma da dupla fita.

As soluções estoque dos compostos benzimidazóis e benzotiazóis foram preparadas pela solubilização de cerca de 1,0 mg do composto em 2,0 mL do solvente dimetilsulfóxido - DMSO (Sigma Aldrich, USA), e posteriormente armazenadas sob refrigeração a 4°C em tubos criogênicos.

Para o preparo da solução estoque do DNA *Calf thymus* (*ctDNA*) foi aferido aproximadamente 2,5 mg do *ctDNA* e solubilizado em 25,0 mL de tampão Tris (10 mM, pH=7,4) e deixado sob agitação contínua por 24 hs. Para garantir uma maior homogeneidade da solução, a mesma foi levada a um banho de ultrassom (Quimis modelo Q335D, Brasil) por 30 minutos.

O tampão (10 mM e pH=7,4) foi preparado pela pesagem de 1,2114 g de tris(hidroximetil)aminometano TRIS (Vetec, Brasil; Synth, Brasil) e solubilizado em 1000 mL de água ultrapura. O ajuste do potencial hidrogeniônico (pH) foi realizado com soluções de ácido clorídrico, HCl (Dinâmica, Brasil).

A solução estoque de iodeto de potássio, KI (0,2 mol L⁻¹) foi preparada medindo-se 1,66 g de KI (Synth, Brasil) e solubilizando em 50,0 mL de água ultrapura. Para o preparo da solução estoque de brometo de etídio (2,0 mM) foi aferido a massa de 0,0016 g do brometo de etídio (Sigma Aldrich, USA) e solubilizado com água ultrapura em tubo criogênico (2,0 mL). E por fim, a solução estoque de berenil (2,0 mM) foi preparada pesando 0,0023 g do berenil (Sigma Aldrich, USA) e solubilizando em água ultrapura (2,0 mL). Todas as diluições posteriores foram feitas no tampão Tris.

3.2 Equipamentos utilizados

Nos estudos de interação empregando os derivados benzimidazois e benzotiazóis, as medidas espectrofluorimétricas foram realizadas em um espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) equipado com uma lâmpada de xenônio, utilizando uma cubeta de polimetil metacrilato com capacidade para 2,0 mL, transparência na faixa de 220 a 900 nm e com 1,00 cm de caminho óptico.

As medidas espectrofotométricas foram executadas no espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (AJX-6100PC, Brasil) com dois compartimentos para referência e amostra, utilizando-se cubetas de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico e capacidade para 4,0 mL de solução.

Para as medidas 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 Mettler Toledo (AG245, Switzerland) com precisão de $\pm 0,01$ mg e balança analítica eletrônica Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de $\pm 0,1$ mg. O banho de ultrassom utilizado no preparo da solução estoque de DNA foi o Quimis (Q335D, Brasil).

3.3 Procedimentos

3.3.1 Determinação da concentração do DNA (*Calf thymus*)

A concentração do *ctDNA* foi determinada por meio da Lei de Lambert-Beer, que estabelece uma relação entre a absorvância e a concentração de uma solução que é atravessada por um feixe de luz monocromática. Fez-se a aferição do sinal de absorvância no comprimento de onda em 260 nm no espectrofotômetro, após uma diluição em tampão Tris na proporção de 1:100. Calculou-se a concentração com base no coeficiente de extinção molar de $6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; e para avaliar se a solução de *ctDNA* estava livre de proteínas determinou-se a razão do sinal de absorvância a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), obtendo valores entre 1,8-2,0 (SAVARIZ, et al., 2014).

3.3.2 Interação *ctDNA*-ligante por espectrofluorimetria e UV-visível

A avaliação da interação *ctDNA*-ligante com espectrofluorímetro foi empregada para observar a variação da intensidade do sinal de fluorescência, em que se manteve constante a concentração dos compostos em $5,0 \mu\text{M}$ e fez-se a titulação com o aumento progressivo da quantidade de *ctDNA*, variando a concentração de $5,0 \mu\text{M}$ a $250,0 \mu\text{M}$. Já no estudo de UV-visível, consideraram-se os sinais de absorvância do composto na presença

e na ausência de *ctDNA*, bem como a absorvância do *ctDNA* na forma livre. Manteve-se constante a concentração dos compostos em 5,0 μM e variou-se a concentração de *ctDNA* em 5,0 μM e 50,0 μM (DANTAS, 2015; SILVA, 2016).

3.3.3 Estudo realizado com iodeto de potássio (KI)

Nesta avaliação do modo de ligação dos compostos com o *ctDNA*, manteve-se constante a concentração dos compostos derivados benzimidazois e benzotiazois e aumentou-se a concentração de iodeto de potássio (5,0 a 150,0 mM) na presença e ausência de *ctDNA*, verificando-se então se ocorreu a diminuição do sinal de fluorescência (SARWAR, et al., 2015; NASCIMENTO, 2017).

3.3.4 Ensaio de competição com brometo de etídio (BE) e berenil

Nesse ensaio foi mantido constante a concentração de brometo de etídio (2,0 μM) e de *ctDNA* (10,0 μM) e aumentou-se progressivamente a concentração dos compostos, de 2,0 μM a 80,0 μM .

Para o ensaio de competição utilizando o berenil como sonda, manteve-se constante a concentração dos compostos (10,0 μM) e do berenil (10,0 μM), e aumentou-se a concentração de *ctDNA*, de 10,0 μM a 400 μM .

3.3.5 Tratamento dos dados

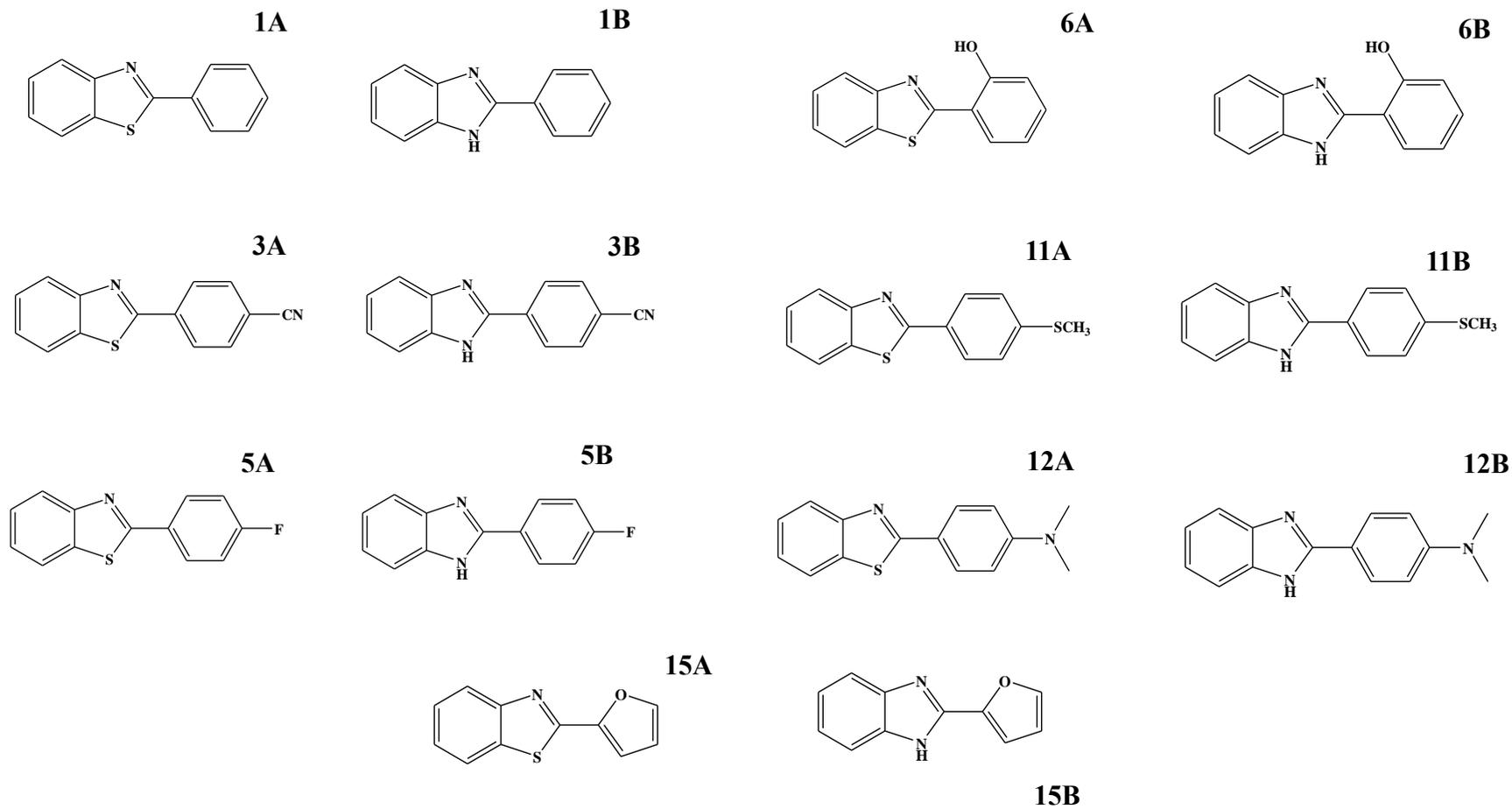
Após a aquisição dos dados, todos os resultados foram tratados empregando o programa Origin Lab Graphing & Data Analysis versão 9.0 (Northampton, USA) e o Excel 2010 (Microsoft Office), onde foi possível obter informações para o cálculo dos parâmetros de ligação dos compostos ao *ctDNA* (DANTAS, 2015; SILVA, 2016; NASCIMENTO, 2017).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos preliminares

Para a síntese dos compostos utilizados neste trabalho, o grupo do Prof. Ângelo de Fátima variou os aldeídos utilizados, empregando grupos doadores e retiradores de densidade eletrônica, heteroaromáticos e não aromáticos como mostrado na Figura 17. A interação destes compostos com *ct*DNA foi avaliada por meio de técnicas espectroscópicas.

Figura 17. Estruturas dos compostos derivados benzotiazóis (XA) e benzimidazóis (XB) avaliados.



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

O mesmo grupo de pesquisa realizou, previamente, estudos de atividade antiproliferativa. Os compostos foram testados frente a sete linhagens celulares e os valores de Concentração mínima do composto capaz de gerar 50% de inibição do crescimento (GI_{50}) serão apresentados posteriormente (ARAÚJO, 2015).

Pela sua potente atividade biológica antitumoral e promissora afinidade com o *ctDNA* comprovada por sua constante de ligação (K_b), o composto 15A foi usado como modelo para apresentação dos resultados.

Primeiramente, determinou-se o comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$) usando a espectroscopia de UV-Vis (Tabela 2). Usualmente é possível correlacionar o $\lambda_{m\acute{a}x}$ e o comprimento de excitação dos compostos na espectroscopia de fluorescência molecular. Determinou-se o comprimento de onda de máxima absorção dos compostos na presença e na ausência de DNA, para em seguida, através dessas informações, realizar o estudo de fluorescência molecular.

Tabela 2. Valores de comprimentos de onda máximos dos compostos avaliados na forma livre.

Composto	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
1A	300
1B	298
3A	297
3B	300
5A	288
5B	314
6A	315
6B	298
11A	319
11B	317
12A	342
12B	313
15A	320
15B	307

Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

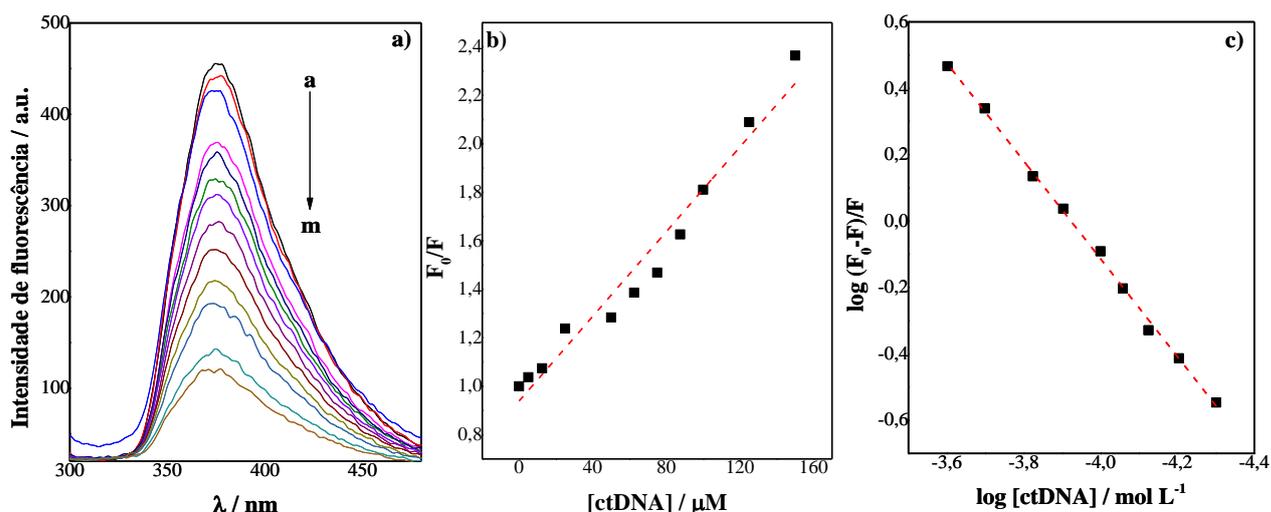
Observando a Tabela 2 verifica-se que os valores de comprimento de onda de máxima absorção para os derivados benzimidazois e benzotiazois compreende-se entre 290

~ 345 nm aproximadamente. Com base nessas informações foi possível avaliar a interação DNA-ligante por meio de realizações de ensaios.

4.2 Avaliação por meio de espectroscopia de emissão de fluorescência

Todos os compostos avaliados apresentaram emissão na faixa de 345 a 445 nm quando excitados entre 260-280 nm. Em função da capacidade de fluorescer, os compostos derivados benzimidazois e benzotiazois foram titulados com *ctDNA*. Nota-se que ao adicionar o *ctDNA* ao sistema ocorreu uma redução do sinal de intensidade de fluorescência dos compostos, indicando, qualitativamente, que os compostos na forma livre estão interagindo com a macromolécula, formando o complexo supramolecular benzimidazol-*ctDNA* e/ou benzotiazol-*ctDNA*, o qual não é fluorescente. A Figura 18 apresenta o perfil espectral obtido para o composto 15A a partir de adições crescentes de *ctDNA* e as curvas de linearização para os cálculos dos parâmetros de ligação.

Figura 18. Resultados obtidos para avaliação da interação DNA-ligante por fluorescência molecular. **(a)** Perfil espectral do composto 15A (5,0 μM) com adições crescentes de *ctDNA* (0; 5; 12,5; 25; 50; 62,5; 75; 87,5; 100; 125; 150; 200 e 250 μM , curvas a→m respectivamente). **(b)** Gráfico de Stern-Volmer para o composto 15A (processo de *quenching*). **(c)** Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação do composto 15A com *ctDNA*. Condição: pH=7,4 (tampão Tris 10 mM) a 30°C.



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Conforme revela a figura 18a, a diminuição progressiva na intensidade do sinal de fluorescência é um indicativo de que houve interação entre o composto e o *ctDNA*, uma

vez que este não apresenta fluorescência e funciona como uma molécula *quencher*. Resultados similares foram obtidos pelos demais compostos derivados benzimidazóis e benzotiazóis avaliados.

Quantitativamente, é possível determinar as constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e a constante de ligação (K_b) em virtude da variação na fluorescência. O valor de K_{SV} é calculado através da Equação 2, já descrita anteriormente. A constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) do complexo supramolecular formado entre os compostos avaliados e o *ctDNA* foi determinado a partir de uma titulação fluorimétrica de acordo com a Equação 3 e da curva de $\log \frac{(F_0 - F)}{F}$ vs. $\log[ctDNA]$, também mencionadas previamente. As Figuras 18b e 18c exibem os perfis das curvas para o composto 15A a partir da linearização das equações (2) e (3), respectivamente. Os resultados obtidos dos parâmetros de ligação para todos os compostos avaliados estão apresentados na Tabela 3 a seguir:

Tabela 3. Parâmetros de interação do *ct*DNA com derivados benzotiazóis (XA) e benzimidazóis (XB).

Compostos	Constante Stern-Volmer		Parâmetros de ligação		
	K_{sv} ($\times 10^3 L mol^{-1}$)	r	K_b ($\times 10^4 L mol^{-1}$)	n	r
1A	10,02 \pm 0,43	0,9936	0,62 \pm 0,01	0,93 \pm 0,05	0,9907
1B	10,08 \pm 0,35	0,9952	9,33 \pm 0,01	1,25 \pm 0,03	0,9972
3A	11,31 \pm 0,4	0,9921	0,78 \pm 0,01	0,96 \pm 0,04	0,9934
3B	8,29 \pm 0,55	0,9871	0,34 \pm 0,01	0,90 \pm 0,04	0,9950
5A	5,25 \pm 0,38	0,9865	2,04 \pm 0,01	1,15 \pm 0,09	0,9802
5B	7,91 \pm 0,30	0,9936	1,69 \pm 0,01	1,09 \pm 0,02	0,9981
6A	8,32 \pm 0,58	0,9836	0,36 \pm 0,01	0,89 \pm 0,08	0,9729
6B	7,13 \pm 0,24	0,9951	25,7 \pm 0,01	1,40 \pm 0,03	0,9977
11A	12,6 \pm 0,54	0,9927	0,38 \pm 0,01	0,87 \pm 0,05	0,9908
11B	10,4 \pm 0,34	0,9952	2,82 \pm 0,01	1,11 \pm 0,04	0,9950
12A	9,63 \pm 0,39	0,9926	2,88 \pm 0,01	1,12 \pm 0,04	0,9948
12B	9,61 \pm 0,35	0,9947	15,8 \pm 0,01	1,31 \pm 0,03	0,9980
15A	8,74 \pm 0,56	0,9821	60,1 \pm 0,1	1,47 \pm 0,02	0,9990
15B	10,1 \pm 0,4	0,9932	20,4 \pm 0,1	1,34 \pm 0,02	0,9988

Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Com base na Tabela 3, os valores das constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) variaram de 5,25 a $12,6 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$, indicando que ocorreu interação entre os derivados benzimidazóis e benzotiazóis e o *ct*DNA (MALTAS, 2014). Adicionalmente, a magnitude da interação foi analisada pelos valores das constantes de ligação (K_b), que variaram de 0,34 a $60,1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ apontando alta afinidade com o *ct*DNA.

De modo geral, os pares de compostos 15A e 15B apresentaram as maiores constantes de ligação ($60,1$ e $20,4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, respectivamente), o que pode estar relacionado com a presença do anel (não condensado) furano no substituinte, provocando interações por forças de van der Waals e também ligações de hidrogênio preferencialmente com as bases nitrogenadas adenina, A e timina, T do DNA (ZHANG; HUANG, 2007). Os demais compostos avaliados, substituídos com radical fenil, exibiram valores de K_b que variaram de 0,34 a $25,7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, dependendo de qual grupo está presente nesse radical. Por exemplo, os pares 12A e 12B possuem o grupo $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ e apresentam altos valores de constantes de ligação o que pode estar relacionado a maior polaridade que esse grupo causa na molécula e possibilitando a formação de ligação de hidrogênio com os pares das bases nitrogenadas da macromolécula, bem como a presença de uma carga positiva a partir da protonação do grupo em função do valor de pH do meio que os experimentos foram conduzidos (pH=7,40).

A literatura retrata que a presença de grupos positivos na estrutura da molécula conduz uma maior interação entre o ligante e o DNA. Moléculas como brometo de etídio (BE), azul de metileno, tioflavina T e Hoechst 332585[®] reforçam este fato, uma vez que apresentam uma carga positiva e forte interação com DNA (NAFISI, et al., 2007; CHOI, et al., 2006; ILANCHELIAN; RAMARAJ, 2004).

Em contrapartida, as menores constantes de ligação foram dos compostos 3B e 6A, que possuem o grupo $-\text{CN}$ e $-\text{OH}$ na posição orto, respectivamente. Este fato pode ser atribuído em parte à densidade eletrônica negativa do substituinte ciano, um grupo desativador moderado, e ao impedimento estérico do grupo hidróxi do ligante adjacente, o que causa diminuição da afinidade com o *ct*DNA, pois os grupos fosfatos possuem densidade eletrônica de carga negativa, podendo diminuir a interação desses compostos nos sulcos da macromolécula (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Contudo, deve-se considerar que o composto 6B apresentou um valor significativo de K_b o qual pode estar relacionado à presença de mais um átomo de nitrogênio na estrutura e maior possibilidade de formar ligações de hidrogênio (intramolecular nesse caso). Tal

comportamento- maiores valores de K_b para os derivados benzimidazois- foi observado para os pares de compostos 1, 6, 11 e 12.

Além disso, ao analisar os valores de n na Tabela 3, verifica-se que o número de sítios de ligação foi próximo à unidade, sugerindo a razão estequiométrica como 1:1 (*ctDNA*:ligante).

4.2.1 Estudo dos parâmetros termodinâmicos

Em razão dos seus maiores valores de K_b e de suas estruturas, selecionou-se os quatro pares de compostos derivados benzotiazóis e benzimidazóis 1A e 1B; 6A e 6B; 12A e 12B e 15A e 15B para o estudo dos parâmetros de interação com *ctDNA* nas temperaturas de 22, 30 e 37°C. A Tabela 4 apresenta as constantes de ligação K_b bem como os valores dos parâmetros termodinâmicos variação de entalpia (ΔH), variação de entropia (ΔS) e variação de energia livre de Gibbs (ΔG) para os compostos avaliados:

Tabela 4. Parâmetros de interação do *ct*DNA com derivados benzotiazóis (XA) e benzimidazóis (XB) em diferentes temperaturas.

Compostos	Temperatura (°C)	Parâmetros de ligação	Parâmetros termodinâmicos		
		K_b ($\times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$)	ΔG^0 (kJ mol^{-1})	ΔH^0 (kJ mol^{-1})	ΔS^0 ($\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
1A	22	$1,88 \pm 0,1$	-22,8		
	30	$0,62 \pm 0,01$	-18,1	-222,6	-675,0
	37	$0,0312 \pm 0,0001$	-13,3		
1B	22	$12,554 \pm 0,001$	-25,9		
	30	$9,33 \pm 0,01$	-22,9	-153,8	-432,2
	37	$0,733 \pm 0,001$	-19,9		
6A	22	$0,413 \pm 0,001$	-21,1		
	30	$0,36 \pm 0,01$	-19,4	-90,1	-233,0
	37	$0,078 \pm 0,001$	-17,8		
6B	22	$87,13 \pm 0,01$	-29,5		
	30	$25,7 \pm 0,01$	-27,9	-95,5	-223,1
	37	$15,17 \pm 0,01$	-26,4		
12A	22	$273,6 \pm 0,1$	-22,5		
	30	$2,88 \pm 0,01$	-16,9	-258,8	-798,3
	37	$2,448 \pm 0,001$	-11,4		
12B	22	$32,23 \pm 0,01$	-24,2		
	30	$15,8 \pm 0,01$	-23,6	-51,2	-91,1
	37	$12,64 \pm 0,01$	-22,9		
15A	22	$124,36 \pm 0,01$	-35,6		
	30	$60,1 \pm 0,1$	-35,2	-54,2	-62,6
	37	$46,17 \pm 0,01$	-34,8		
15B	22	$228,6 \pm 0,1$	-28,8		
	30	$20,4 \pm 0,1$	-25,4	-171,3	-481,4
	37	$14,08 \pm 0,01$	-22,1		

Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

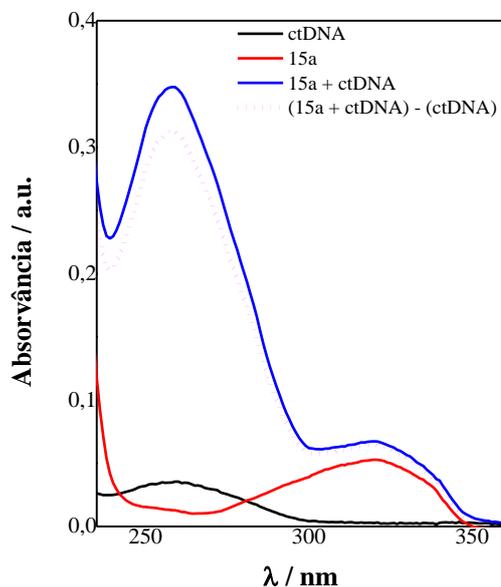
Os parâmetros termodinâmicos foram determinados por meio das Equações 4 (equação de Van't Hoff), 5 e 6, indicadas anteriormente. De acordo com a Tabela 4, todos os compostos derivados benzimidazóis e benzotiazóis avaliados nas diferentes temperaturas apresentaram variação de entalpia negativa ($\Delta H < 0$) e variação de entropia negativa ($\Delta S < 0$), indicando que as forças envolvidas no processo de interação entre esses compostos e o *ctDNA* são, preferencialmente, ligação de hidrogênio e forças de van der Waals (SHAHABADI; HADID, 2012).

Além disso, os valores relativos do parâmetro termodinâmico para energia livre de Gibbs (ΔG) foram todos negativos, apontando que o processo de interação entre os derivados benzimidazóis e benzotiazóis estudados e a macromolécula ocorre espontaneamente.

4.3 Espectroscopia de absorção no UV-visível: avaliação do mecanismo de quenching

A espectroscopia de absorção no UV-visível também é empregada para avaliação do mecanismo de *quenching* dominante no processo de interação, o qual pode ocorrer de várias formas, destacando-se o *quenching* dinâmico (colisional) e estático (formação de complexo) em estudos de interação com DNA (LAKOWICZ, 2006). Através dos espectros de absorção do *ctDNA*, do composto livre e do complexo formado, apresentado na Figura 19, é possível analisar o tipo de *quenching*.

Figura 19. Espectro de absorção do composto 15A (5,0 μM), *ctDNA* (50,0 μM) e 15A-*ctDNA*. Condição: pH = 7,40 (tampão Tris 10 mM) a 30°C.



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Os valores de máxima absorção do composto 15A e *ctDNA* estão localizados a 320 e 260 nm, respectivamente. Também se nota que ao adicionar *ctDNA* à solução dos compostos derivados benzimidazois e benzotiazois ocorreu um aumento na absorvância, caracterizando um efeito hipercrômico e indicando que sucedeu uma interação da molécula com o *ctDNA*, corroborando com os resultados de fluorescência molecular.

Como alguns trabalhos na literatura retratam (NOROOZIFAR, et al., 2011; SILVA, 2016; NASCIMENTO, 2017), o modo de ligação *ctDNA*-ligante é avaliado por meio da Equação 7:

$$A_{\text{complexo}} \approx A_{\text{ctDNA}} + A_{\text{composto}} \quad (\text{Equação 7})$$

onde A_{complexo} é a absorvância máxima do complexo formado entre o *ctDNA* e o ligante, A_{ctDNA} é a absorvância máxima do *ctDNA* livre e A_{composto} é a absorvância máxima do composto livre. A Tabela 5 mostra os valores obtidos para as absorvâncias dos compostos estudados:

Tabela 5. Variação da máxima absorção entre os compostos derivados benzimidazois e benzotiazois avaliados (5,0 μ M) e *ctDNA* (50,0 μ M) livres e o complexo *ctDNA*-composto. Condição: pH = 7,40 (tampão Tris 10 mM) a 30°C.

Composto	A _{composto}	A _{DNA}	A _{complexo}	ΔA
1A	0,01353	0,03469	0,01473	-0,03349
1B	0,09650	0,03469	0,10254	-0,02865
3A	0,06357	0,02169	0,07098	-0,01428
3B	0,11383	0,02169	0,11793	-0,01759
5A	0,01950	0,02169	0,02040	-0,02079
5B	0,13310	0,02169	0,13600	-0,01879
6A	0,01204	0,02169	0,01610	-0,01763
6B	0,01821	0,02169	0,01916	-0,02074
11A	0,02856	0,03469	0,03170	-0,03155
11B	0,15695	0,03469	0,16157	-0,03007
12A	0,04854	0,02169	0,05444	-0,01579
12B	0,13311	0,02169	0,13661	-0,01819
15A	0,05275	0,03469	0,06727	-0,02017
15B	0,12986	0,03469	0,13026	-0,03429

Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Pelos valores de ΔA observados na Tabela 5, pode-se concluir que houve mudanças espectrais em todos os compostos avaliados, pois $\Delta A = A_{\text{complexo}} - (A_{\text{composto}} + A_{\text{ctDNA}}) \neq 0$, sendo um indicativo que o mecanismo de *quenching* seguido foi o estático ocorrendo alteração no estado fundamental em função da formação do complexo *ctDNA*-ligante. Caso o mecanismo de *quenching* fosse dinâmico não ocorreria alterações no estado fundamental e sim no estado excitado, e com isso, interferências espectrais não seriam percebidas e ΔA seria nulo (WU, et al., 2011).

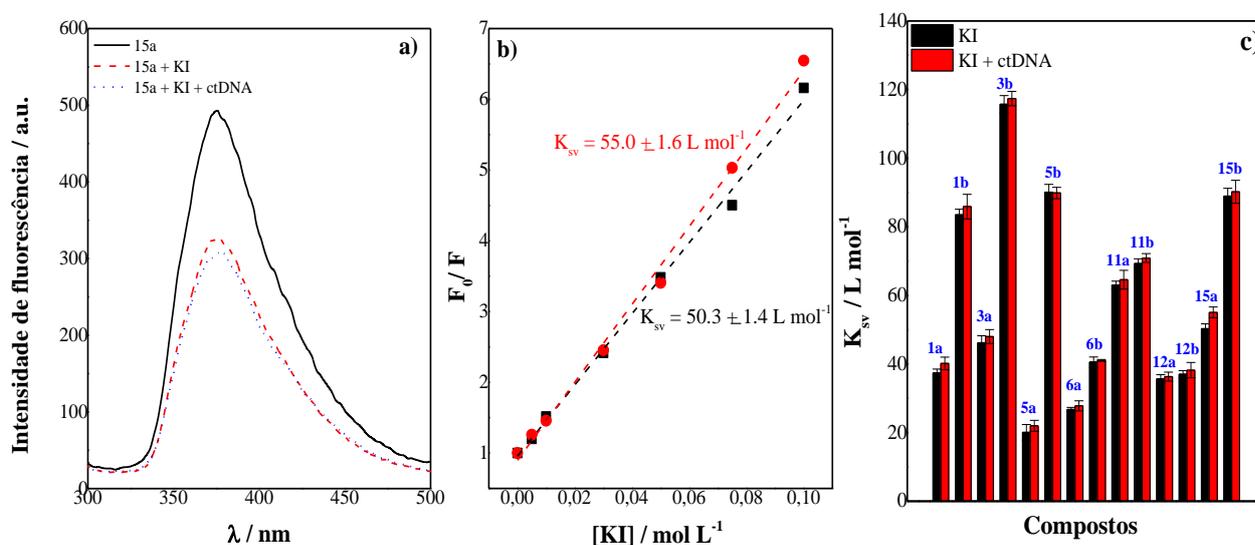
4.4 Avaliação do modo de ligação composto-*ctDNA*

O modo de ligação dos compostos derivados benzimidazois e benzotiazois e *ctDNA* foram propostos de acordo com duas estratégias: avaliação do efeito de *quenching* do iodeto de potássio (KI) e competição com as sondas brometo de etídio e berenil.

4.4.1 Teste com iodeto de potássio

Uma forma eficaz de investigação do modo de ligação por experimentos de supressão de fluorescência na presença de um agente desativador é o teste de iodeto de potássio (KI), descrito anteriormente (Capítulo 1). O íon iodeto é utilizado para estimar a localização da molécula ligante, pois é carregado negativamente e será repelido pelas repulsões eletrostáticas da dupla hélice do DNA, o que conseqüentemente irá diminuir os valores da constante de Stern-Volmer (K_{SV}). A Figura 20 mostra a representação do teste de KI para todos os compostos avaliados, dando ênfase ao composto 15A, com os valores da constante de K_{SV} na ausência e na presença de *ct*DNA.

Figura 20. Representação do teste de iodeto de potássio. (a) Espectro do composto 15A livre, do composto 15A com KI e do composto 15A com KI e *ct*DNA. (b) Gráficos e valores de K_{SV} para o composto 15A com KI na ausência e presença de *ct*DNA. (c) Comparação dos valores de K_{SV} na ausência e na presença de *ct*DNA para todos os compostos avaliados.



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Em conformidade com Sarwar e colaboradores (2015), quando as interações DNA-ligante ocorrem via intercalação, há uma diminuição nos valores de K_{SV} na presença da macromolécula, pois o íon iodeto é repelido pelos grupos fosfato do DNA devido às interações repulsivas. Por outro lado, quando o modo de ligação ocorre preferencialmente via *groove* ou interações eletrostáticas os valores da constante de Stern-Volmer serão

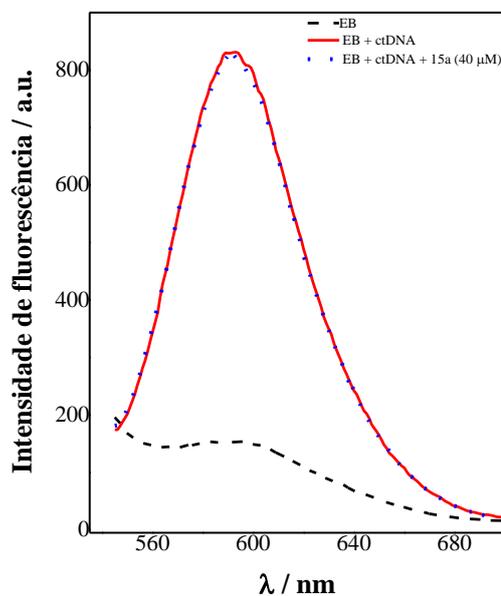
maiores em função da maior acessibilidade do íon iodeto às moléculas ligantes, o que aumenta a probabilidade de colisão entre si (LING, et al., 2008; REHMAN, et al., 2015).

A Figura 20 revela que, em geral, os valores de K_{SV} na presença de *ctDNA* foram sistematicamente maiores do que na ausência da macromolécula. Esse resultado implica que o íon iodeto está mais livre para ter acesso ao ligante, sugerindo que o modo de ligação seja por via *groove* ou por interações eletrostáticas. Outros testes fazem-se necessário para a confirmação do modo de ligação dos compostos avaliados, entre eles os ensaios de competição utilizando sondas fluorescentes, como brometo de etídio (BE) e berenil.

4.4.2 Ensaio com brometo de etídio

O brometo de etídio (BE) é um intercalante muito conhecido e amplamente utilizado nos testes para a elucidação do mecanismo de *quenching* de uma molécula. Com base nisso, os ensaios de competição dos compostos avaliados com BE visam a observação de possíveis mudanças nos comportamentos espectrais das moléculas. O BE na forma livre apresenta baixa emissão de fluorescência, assim como o DNA; entretanto, quando BE se intercala a macromolécula sua fluorescência aumenta drasticamente. O estudo então é realizado adicionando crescentes quantidades dos compostos derivados benzimidazois e benzotiazois e, caso o modo de ligação desses compostos com o DNA seja intercalação, irão competir com a sonda fluorescente. A Figura 21 representa o espectro do ensaio de brometo de etídio para o composto 15A; comportamento semelhante foi verificado aos demais compostos avaliados.

Figura 21. Espectro do ensaio de competição de BE para o composto 15A (40,0 μM). Concentração do BE e *ct*DNA foram 2,0 e 10,0 μM , respectivamente. Condição: pH = 7,40 (tampão Tris 10 mM) e $\lambda_{\text{exc}} = 535 \text{ nm}$ a 30°C.



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Pelo perfil espectral visto na Figura 21 nota-se que, mesmo com a adição de excesso do composto 15A não há diminuição significativa da intensidade de emissão de fluorescência do sistema BE-*ct*DNA (redução de apenas 0,27% para o benzotiazol 15A; valores semelhantes foram observados para todos os compostos avaliados). Desta forma, os compostos derivados benzimidazois e benzotiazois avaliados interagem com o DNA de maneira não-similar ao BE, visto que o grau de redução do sinal analítico de fluorescência pode ser empregado para estabelecer a magnitude de intercalação entre a macromolécula e o ligante (CHOWDHURY, et al., 2011).

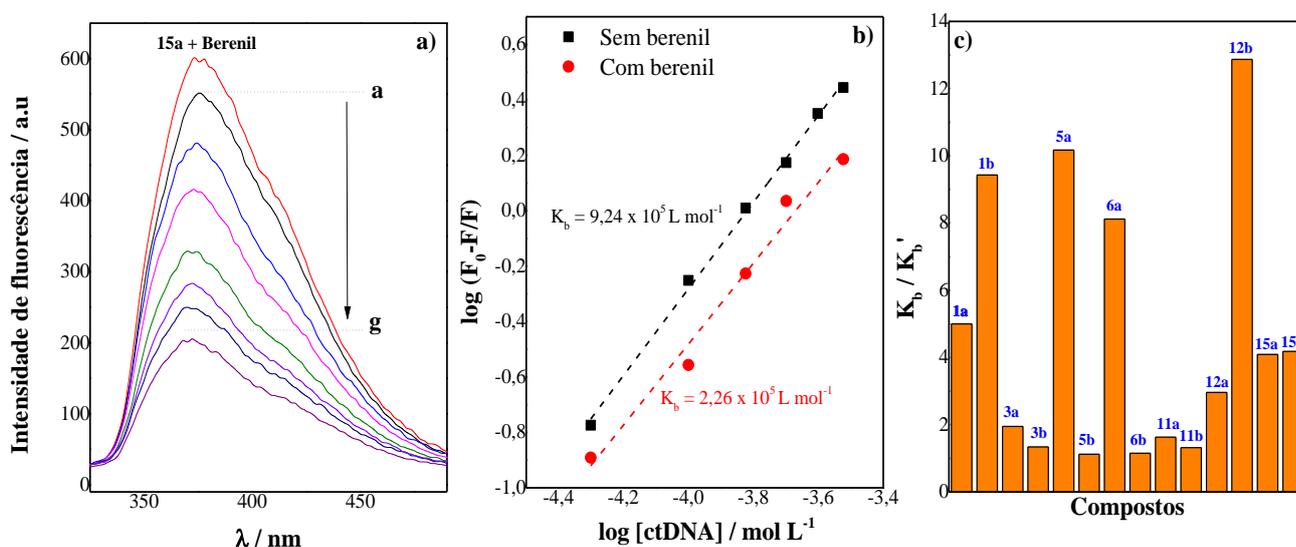
Portanto, os resultados dos ensaios com brometo de etídio corroboram com os resultados obtidos do ensaio de *quenching* com iodeto de potássio. Os compostos avaliados não interagem com o DNA via intercalação, sendo necessário outros ensaios de competição, com outras sondas, para avaliar o modo de ligação. Outro ensaio empregou o uso da sonda comercial berenil.

4.4.3 Ensaio com berenil

O berenil é um agente antitripanossomal que se liga ao DNA duplex via interação no sulco menor (*groove*) de domínios ricos em pares A-T de DNA dupla hélice. Ele também exibe propriedades características do modo de ligação por intercalação, e o que determinará o seu modo de interação será a concentração da sonda (NGUYEN, et al., 2004; NUNES, et al., 2011). Uma outra característica interessante do uso do berenil como sonda para marcação de *groove* por fluorescência é que o mesmo não fluoresce na presença de DNA, fazendo com que essa sonda seja versátil e evite interferências espectrais com os ligantes de interesse.

Para avaliar o comportamento dos compostos derivados benzimidazois e benzotiazois com *ctDNA* na presença e ausência de berenil, fixou-se a concentração dos ligantes e da sonda (quando presente) em 10,0 μM e adicionou-se quantidades crescentes da macromolécula. A Figura 22a apresenta o espectro de fluorescência do composto 15A com berenil:

Figura 22. Ensaio com berenil. **(a)** Espectros de fluorescência obtidos a partir da adição de *ctDNA* (0, 10, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 μM , curvas a→g respectivamente) ao composto 15A (10,0 μM) na presença de berenil (10,0 μM). **(b)** Curvas de linearização para o cálculo de K_b do composto 15A na presença e na ausência de berenil. **(c)** Gráfico da razão entre o valor de K_b no ensaio sem berenil e K_b' no ensaio com berenil para todos os compostos avaliados.



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Percebe-se a redução da intensidade do sinal de fluorescência do composto 15A quando maiores quantidades do *ctDNA* é adicionado. Para confirmação de que o berenil interferiu no modo de ligação comparou-se os valores da constante de ligação (K_b) na presença e na ausência da sonda, como mostrado na Figura 22b. Como o valor de K_b é menor na presença de berenil, temos que a sonda "competiu" com os compostos derivados benzimidazois e benzotiazois avaliados e, conseqüentemente, a magnitude da interação DNA-ligante foi reduzida. Comportamentos semelhantes foram encontrados para todos os outros compostos estudados e as razões de K_b nos ensaios sem e com berenil estão representados na Figura 22c.

A Tabela 6 apresenta os valores de K_b nos ensaios sem berenil e K_b' nos ensaios com berenil para todos os derivados benzotiazois e benzimidazois avaliados:

Tabela 6. Valores das constantes de ligação dos compostos avaliados com *ctDNA* na presença e ausência de berenil.

Compostos	$K_b (\times 10^5 \text{ L mol}^{-1})$	
	Sem berenil	Com berenil
1A	1,15 ± 0,01	0,23 ± 0,01
1B	31,6 ± 0,1	3,35 ± 0,01
3A	0,0389 ± 0,0001	0,0199 ± 0,001
3B	0,691 ± 0,001	0,515 ± 0,001
5A	0,427 ± 0,001	0,042 ± 0,001
5B	6,92 ± 0,01	6,17 ± 0,01
6A	3,63 ± 0,01	0,447 ± 0,001
6B	1,38 ± 0,01	1,20 ± 0,01
11A	12,3 ± 0,1	7,55 ± 0,01
11B	8,89 ± 0,01	4,47 ± 0,01
12A	3,17 ± 0,01	1,07 ± 0,01
12B	38,6 ± 0,1	3,00 ± 0,01
15A	9,24 ± 0,01	2,26 ± 0,01
15B	0,339 ± 0,001	0,081 ± 0,001

Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Como pode ser analisado, os valores das constantes de ligação diminuíram para todos os compostos, indicando que a presença de berenil provocou redução da interação *ctDNA*-ligante. Desta forma, esses compostos interagem com o *ctDNA* de maneira similar ao berenil, corroborando com os resultados obtidos com o teste de KI e o ensaio de BE, que

excluem o modo de ligação ser via intercalação. Logo, o modo de ligação benzimidazois-*ctDNA* e benzotiazóis-*ctDNA* proposto será *groove*, ocorrendo entre o ligante e as bases nitrogenadas nos sulcos maior ou menor do DNA (SARWAR, et al., 2015).

4.5 Correlação bioanalítica

Os compostos derivados benzimidazois e benzotiazóis foram analisados quanto a atividade antiproliferativa pelo grupo de pesquisa do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, frente a sete linhagens de células tumorais humanas, sendo estas: glioma (U251), mama (MCF7), ovário resistente (NCI/ADR-RES), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), cólon (HT-29) e leucemia (K-562), e seus valores de GI_{50} estão representados na Tabela 7:

Tabela 7. Valores de GI₅₀ (µg mL⁻¹) e índice de seletividade (IS) dos compostos derivados benzotiazóis e benzimidazóis avaliados frente a 7 linhagens de células tumorais humanas.

Compostos	Linhagens celulares														
	Glioma (U251)		Mama (MCF7)		Ovário Resistente (NCI/ADR-RES)		Rim (786-0)		Pulmão (NCI-H460)		Cólón (HT29)		Leucemia (K-562)		Queratinócito Humano (HaCaT)
	GI ₅₀	IS	GI ₅₀	IS	GI ₅₀	IS	GI ₅₀	IS	GI ₅₀	IS	GI ₅₀	IS	GI ₅₀	IS	GI ₅₀
1A	>250	>0,2	>250	>0,2	>250	>0,2	23,0	2,3	166,6	0,3	>250	>0,2	>250	>0,2	52,5
1B	26,5	0,9	24,0	1,0	26,1	1,0	23,4	1,1	26,5	0,9	27,8	0,9	4,4	5,6	25,0
3A	6,4	8,4	40,8	1,3	>250	>0,2	9,7	5,6	16,3	3,3	80,0	0,7	0,9	56,8	54,0
3B	26,8	0,9	9,7	2,4	25,7	0,9	21,5	1,1	50,1	0,5	26,3	0,9	25,5	0,9	23,5
5A	15,6	1,2	31,2	0,6	31,1	0,6	12,5	1,6	9,8	2,0	14,8	1,3	1,2	16,0	19,3
5B	>250	>0,8	171,2	1,2	26,4	8,0	>250	>0,8	>250	>0,8	>250	>0,8	11,9	17,6	209,8
6A	138,9	>1,8	>250	>1,0	146,4	>1,7	>250	>1,0	>250	>1,0	>250	>1,0	82,1	>3,0	>250
6B	1,7	3,0	0,7	6,7	5,1	1,0	7,4	0,7	0,6	8,2	19,0	0,3	0,2	23,8	5,0
11A	33,9	3,1	>250	>0,4	>250	>0,4	>250	>0,4	8,7	12,0	186,5	0,6	87,0	1,2	105,2
11B	11,6	0,4	9,1	0,6	11,9	0,4	2,9	1,8	18,4	0,3	4,4	1,2	2,6	2,0	5,1
12A	121,9	1,2	98,6	1,5	33,1	4,4	90,1	1,6	76,3	1,9	>250	>0,6	29,3	5,0	145,3
12B	6,7	3,7	8,4	3,0	24,5	1,0	2,8	8,8	25,6	1,0	5,8	4,3	1,3	18,5	24,9
15A	23,8	1,5	7,6	4,8	24,1	1,5	0,3	127,6	43,6	0,8	64,3	0,6	22,4	1,6	36,5
15B	26,0	1,0	12,1	2,2	28,2	1,0	26,8	1,0	64,5	0,4	30,1	0,9	26,7	1,0	27,1
Doxorrubicina	0,03	0,7	0,03	0,7	0,58	0,03	0,03	0,7	0,01	2,0	0,18	0,1	0,06	0,3	0,02

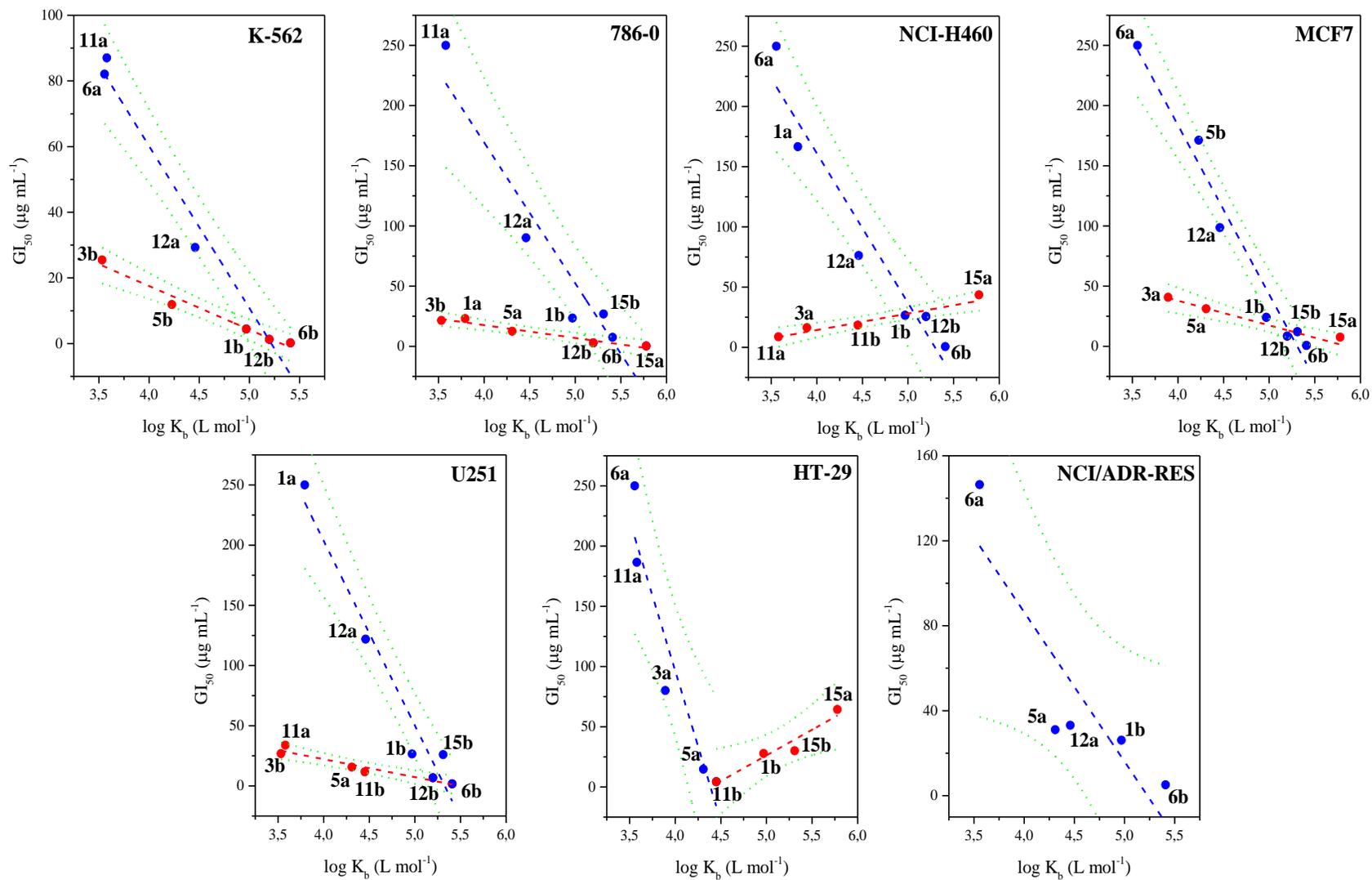
Fonte: adaptado de ARAÚJO, 2015.

Os índices de seletividade (IS) representam a seletividade de um determinado composto por uma linhagem de célula tumoral em relação a uma linhagem de célula não-tumorogênica. O valor de IS é o quociente entre o valor de GI_{50} de um composto por células não-tumorogênicas pelo valor de GI_{50} deste mesmo composto por células tumorais. Considerou-se um valor significativo de IS maior ou igual a 2,0 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991), isto é, este valor significa que o composto é duas vezes mais ativo contra a linhagem de célula tumoral do que a célula não-tumorogênica.

A maioria dos compostos apresentaram resultados satisfatórios para uma ou mais linhagens de células tumorais. Entre eles, destacam-se os compostos: 15A com os valores de 0,3 e 127,6 de GI_{50} e IS, respectivamente, para a linhagem de rim e 7,6 e 4,8 (GI_{50} e IS, respectivamente) para mama; 12B para as linhagens glioma, rim, cólon e leucemia (esta última com 1,3 e 18,5 de GI_{50} e IS, respectivamente); 6B para pulmão, leucemia, mama e glioma; 3A para as linhagens de rim, leucemia e glioma; 11A para a linhagem de pulmão e 5A para leucemia. Nota-se que a diferença de apenas o substituinte – fenil ou furano – na posição 2 do núcleo fez o índice de seletividade sofrer uma grande mudança.

Com base nos valores de $\log K_b$ foi avaliado o grau de correlação através do coeficiente de correlação (r^2) e dos valores de GI_{50} . Este ensaio visou analisar se as variáveis independentes (K_b e GI_{50}) estão relacionadas e, desta forma, se o mecanismo de ação dos compostos avaliados pode ser associado à interação com DNA. A Figura 23 mostra a representação gráfica desta correlação, para todas as 7 linhagens de células avaliadas:

Figura 23. Gráfico de correlação linear de GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) vs. $\log K_b$ a 95% de intervalo de confiança (linhas verdes).



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Neste estudo, consideraram-se apenas os compostos que se apresentaram contidos ou próximos ao intervalo de confiança (neste caso, empregou-se um nível de confiança de 95%) estabelecido estaticamente. Assim, para a maioria das linhagens foram obtidas duas faixas de correlação frente aos compostos mais ativos.

De acordo com a Figura 23 foi possível relacionar as atividades antiproliferativas empregando no mínimo cinco (ovário resistente, NCI/ADR-RES) e no máximo dez compostos (glioma, U251; mama, MCF7; rim, 786-0 e pulmão, NCI-H460). A seguir é apresentado, na Tabela 8, os coeficientes de correlação (r^2) frente às linhagens testadas.

Tabela 8. Coeficientes de correlação (r^2) determinados frente às linhagens celulares testadas.

Linhagem celular	Coeficiente de correlação (r^2)	Compostos	n
K-562	- 0,98413	3B, 5B, 1B e 12B	5
	- 0,98628	11A, 6A e 12A	3
786-0	- 0,94719	3B, 1A, 5A, 12B e 15A	5
	- 0,97493	11A, 12A, 1B, 6B e 15B	5
NCI-H460	- 0,96904	6A, 1A, 12A, 1B, 12B e 6B	6
	+ 0,95110	11A, 3A, 11B e 15A	4
MCF7	- 0,98403	6A, 5B, 12A, 1B, 12B, 15B e 6B	7
	- 0,93093	3A, 5A e 15A	3
U251	- 0,97811	1A, 12A, 1B, 15B, 12B e 6B	6
	- 0,95891	3B, 11A, 5A, 11B e 12B	4
HT-29	- 0,95192	6A, 11A, 3A e 5A	4
	+ 0,96617	11B, 1B, 15B e 15A	4
NCI/ADR-RES	- 0,88213	6A, 5A, 12A, 1B e 6B	5

Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Verifica-se, de modo geral, duas faixas de correlação onde r^2 variou de -0,98628 (leucemia, K-562) a +0,96617 (côlon, HT-29), com exceção para ovário resistente (NCI-

H460) onde só foi observado uma faixa linear ($r^2=-0,88213$). Pelos resultados, obteve-se uma tendência inversa sempre que $r^2 < 0$; isto é, quanto maior o valor da constante de interação com *ctDNA* menor o valor de GI_{50} e, desta forma, mais ativos os compostos para aquelas linhagens celulares. Já para $r^2 > 0$ observa-se majoritariamente tendência contrária, onde os valores do coeficiente de determinação indicam que para maioria das linhagens avaliadas os valores de K_b e GI_{50} aumentam de forma proporcional, ou seja, quanto maior a interação com *ctDNA* maior a atividade dos compostos (SILVA, 2016).

Em relação aos compostos com os maiores valores das constantes de ligação (K_b) merecem destaque: o 15A, o 6B e os pares 12A e 12B; que estiveram presentes na maioria das correlações e são os compostos mais ativos. Assim, é provável que o mecanismo de ação dos compostos derivados benzimidazóis e benzotiazóis avaliados esteja relacionado à interação com DNA. Entretanto, pode-se inferir que os compostos 6B, 12A e 12B por estarem presentes na correlação de quase todas as linhagens analisadas (Figura 23) apresentam baixa seletividade. Já o composto 15A foi o mais seletivo, visto que apresentou boa atividade somente às linhagens celulares rim, mama, pulmão e cólon.

5. CONCLUSÃO

A avaliação da interação entre os compostos derivados benzimidazois e benzotiazois com *ct*DNA, por meio das técnicas espectroscópicas de fluorescência molecular e espectroscopia de absorção no UV-visível, foi eficiente. Foi possível determinar os parâmetros relativos à interação, como as constantes de ligação (K_b) e a estequiometria (números de sítios, n) bem como os parâmetros termodinâmicos e o modo de ligação, variáveis necessárias para a avaliação do mecanismo de ação dessas moléculas.

O par de compostos 15A e 15B, com o substituinte furano apresentou os maiores valores de K_b , provocando interações por forças de van der Waals e ligações de hidrogênio preferencialmente com as bases A e T da macromolécula. Esses compostos também apresentaram alto índice de seletividade, dando ênfase na importância desse substituinte nos processos de interação e desenvolvimento de fármacos.

O modo de interação entre os compostos avaliados e o *ct*DNA por meio do teste com iodeto de potássio e do ensaio com brometo de etídio excluíram a intercalação como modo de ligação para os compostos avaliados, pois os valores das constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) aumentaram no teste com KI e não deslocou a sonda no ensaio com BE. A sonda comercial berenil foi então empregada nos ensaios e as constantes de ligação na sua presença e na sua ausência foram determinadas e comparadas, confirmando a redução de K_b na presença da sonda e confirmando a interação *groove* como modo preferencial de ligação entre a macromolécula e os compostos avaliados.

O mecanismo de *quenching* foi estudado por meio da espectroscopia de absorção do UV-vis, a qual indicou que o mecanismo seguido foi o *quenching* estático uma vez que houve mudanças espectrais em todos os compostos avaliados, ocorrendo alteração no estado fundamental em função da formação de complexo.

Adicionalmente, pôde-se também estabelecer uma correlação entre os valores de K_b e das atividades biológicas (GI_{50}) dos compostos, a 95% de confiança. Em suma, os resultados obtidos indicam que o mecanismo de ação dos derivados benzimidazois e benzotiazois provavelmente está associado à interação com o DNA, e isso sugere que esses compostos podem ser utilizados como precursores de novos fármacos que possuam o DNA como alvo biológico principal e que combata doenças como o câncer.

Portanto, benzimidazois e benzotiazois são duas classes de compostos que podem interagir com o DNA e essas interações serem analisadas qualitativa e quantitativamente por meio de técnicas espectroscópicas.

5.1 Perspectivas

a) Propor mudanças na síntese dos compostos avaliados, para a obtenção de estruturas químicas mais eficazes quanto a atividade biológica;

b) Realizar o estudo de interação entre os compostos avaliados e *ctDNA* empregando força iônica no meio, usando para isso solução de cloreto de sódio, NaCl;

c) Caracterizar a formação do complexo DNA-ligante por meio de outros métodos, tais como *docking* molecular, ressonância magnética nuclear (RMN) e infravermelho (IV).

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V.L., et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Rev. Química Nova**, Brasil, v. 28, p. 118-129, Set., 2005.

ARAÚJO, Débora Pereira. **Síntese e atividade anti-ureolítica e antiproliferativa de benzimidazóis e benzotiazóis**. 2015. Tese de doutorado – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

ARJMAND, F., et al. Molecular drug design, synthesis and crystal structure determination of Cu^{II} - Sn^{IV} heterobimetallic core: DNA binding and cleavage studies, **European Journal of Medicinal Chemistry**, Índia, v. 49, p. 141-150, Jan., 2012.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K.M.; SILVA, A.B.F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694-699, 2010.

BACHHAV, H.M.; BHAGAT, S.B.; TELVEKAR, V.N. Efficient protocol for the synthesis of quinoxaline, benzoxazole and benzimidazole derivatives using glycerol as green solvent. **Tetrahedron Lett**, v. 52, 2011. ISSN 5697-5701

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.

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.

BAUMANN, T.; DELGADO, J.; SANTACRUZ, R.; MARTÍNEZ-TRILLOS, A.; ROYO, C.; NAVARRO, A.; PINYOL, M.; ROZMAN, M.; PEREIRA, A.; VILLAMOR, N.; AYMERICH, M.; LÓPEZ, C.; CARRIÓ, A.; MONTSERRAT, E. Chronic lymphocytic leucemia in the elderly: Clinico-biological features, outcomes, and proposal of a prognostic model, **Haematologica**, v. 99, p. 1599-1604, 2014.

BAZZICALUPI, C., et al. Metals in supramolecular chemistry. **Inorganica Chimica Acta**, Espanha, v. 417, p. 3-26, Mar., 2014.

BENESI, H.A.; HILDEBRAND, J.H. Spectrophotometric investigation os the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons, **Journal of the American Chemical Society**, Estados Unidos da América, v. 71, p. 2703-2707, Ago., 1949.

BHUVA, H.A.; KINI, S.G. Synthesis, anticancer activity and docking of some substituted benzothiazoles as tyrosine kinase inhibitors, **J. Mol. Graphics Mod.**, v. 29, p. 32-37, 2010.

BOER, D.; CANALS, A.; COLL, M. DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes. **Dalton Transactions**, Espanha, v. 399, p. 399-414, Nov., 2009.

BOGERT, M.T.; MEYER, M. Researches on thiazoles. II. 2-para-toly-benzothiazole, dehydrothio-para-toluidine, and some related compounds. **Contribution from the Chemical Laboratories of Columbia University**, p. 1568-1572, 1922.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Mensagem aos médicos. Câncer: Fundamentos**, Secretária de Assistência Médica - Divisão Nacional de Câncer; Brasília, p. 7-47, 1971.

CALETA, I.; GRDISA, M.; MRVOS-SERMEK, D.; CETINA, M.; TRALIC-KULENOVIC, V.; PALEVIC, K.; KARMINSKI-ZAMOLA, G. Synthesis, Crystal structure and antiproliferative evaluation of some new substituted benzothiazoles and styrylbenzothiazoles, **IL Farmaco**, v. 59, p. 297-305, 2004.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R.A; CALIXTO, J.B. (ed.). **Plantas Mediciniais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**, Chapecó: Argos, Cap. 2, p. 59-69, 2001.

CHAMBERS, V.S., et al. High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. **Nature Biotechnology**, Reino Unido, v. 33, p. 877-881, Jul., 2015.

CHOI, Y.S., et al. Amine terminated G-6 PAMAM dendrimer and its interaction with DNA probed by Hoechst 33258; **Biophysical Chemistry**, República da Coreia, v. 121, p. 142-149, Fev., 2006.

CHOWDHURY, S., et al. Wavelength dependence of the fluorescence quenching efficiency of nearby dyes by gold nanoclusters and nanoparticles: the roles of spectral overlap and particle size. **Journal of Physical Chemistry C: Nanomaterial Interfaces**, China, v. 115, p. 20105-20112, 2011.

COBAN, G.; ZENCIR, S.; ZUPKÓ, I.; RÉTHY, B.; GUNES, H.S.; TOPCU, Z. Synthesis and biological activity evaluation of 1H-benzimidazoles via mammalian DNA topoisomerase I and cytotoxicity assays, **Eur.J. Med. Chem.**, v. 44, p. 2280-2285, 2009.

COX, M.M; DOUDNA, J.A.; O'DONNELL. **Biologia Molecular: Princípios e técnicas**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

CSERMELY, P.; HÓDSÁGI, J.; KORCSMÁROS, T.; MÓDOS, D.; PEREZ-LOPEZ, A.R.; SZALAY, K.; VERES, D.V.; LENTI, K.; WU, L.; ZHANG, X. Cancer stem cells display extremely large evolvability: alternating plastic and rigid networks as a potential Mechanism Network models, novel therapeutic target strategies, and the contributions of hypoxia, inflammation and cellular senescence, **Seminars in Cancer Biology**, v. 30, p. 42-51, 2015.

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.

DORRAJI, P. S.; JALALI, F. Investigation of the Interaction of Sertraline with Calf Thymus DNA by Spectroscopic Methods. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Iran, v. 24, p. 939-945, 2013.

DUBEY, A.K.; SANYAL, P.K. Benzimidazoles in a Wormy World. **Online Veterinary Journal**, v. 5, n. 2, Artigo 63, 2010. ISSN 0973-6980

FERLAY, J., et al. Cancer incidence and mortality worldwide. **GLOBOCAN 2012**, v. 1, Lyon, France: IARC. (IARC Cancer Base, 11), 2013. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>> Acesso em: 1 de Junho de 2018.

FICHTNER, I.; MONKS, A.; HOSE, C.; STEVENS, M.F.G.; BRADSHAW, T.D. The experimental antitumor agents phortress and doxorubicin are equiactive against human-derived breast carcinoma xenograft models, **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 87, p. 97-107, 2004.

FOO, J.; MICHOR, F. Evolution of acquired resistance to anti-cancer therapy, **J. Theor. Biology**, v. 335, p. 10-20, 2014.

GIBSON, D. Drug-DNA interactions and novel drug design. **The Pharmacogenomics Journal**, Israel, v. 2, p. 275-276, 2012.

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

GONZÁLEZ-RUIZ, V., et al. **An Overview of Analytical Techniques Employed to Evidence Drug-DNA Interactions. Applications to the Design of Genosensors**, Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies. Espanha, InTech, 2011. Disponível em: <<http://cdn.intechweb.org/pdfs/12820.pdf>> Acesso em: 19 de abril de 2018.

GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D. Modelagem molecular de fármacos. **Rev. Proc. Quím.**, v. 2, n. 4, p. 24-26, 2008.

GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D. e OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud. Av. [online]**, vol. 24, n. 70, p. 81-98, 2010. ISSN 0103-4014

GUPTA, A.; RAWAT, S. Synthesis and cyclization of benzothiazole: Review. **Journal Current Pharmaceutical Research**, v. 3, n.1, p. 13-23, 2010.

HALLEK, M.; KAY, N.E.; OSTERBORG, A.; CHANAN-KHAN, A.A.; MAHLER, M.; SALMAN, M.; WAN, Y.; SUN, S.; HONG, S.; HOWES, Z.A. The HELIOS trial protocol: a Phase III study of ibrutinib in combination with bendamustine and rituximab in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia, **Future Oncol.**, v. 11, p. 51-59, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer, **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HAQ, I. Thermodynamics of drug-DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Reino Unido, v. 403, p. 1-15, Abr., 2002.

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

HASSAN, M.F.; RAUF, A. Synthesis and multi-spectroscopic DNA binding study of 1,3,4-oxadiazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives of fatty acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Índia, v. 153, p. 510–516, Jan., 2015.

HUBER, C.P.; MARUIAMA, C.H.; ALMEIDA, W.P. Glicoproteína-P, Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Revista Química Nova**, Brasil, v. 33, p. 2148-2154, Ago., 2010.

HUTCHINSON, I.; JENNINGS, S.A.; VISHNUVAJALA, B.R.; WESTWELL, A.D.; STEVENS, M.F.G. Antitumor benzothiazoles. 16. Synthesis and pharmaceutical properties

of antitumor 2-(4-Aminophenyl)benzothiazole amino acid prodrugs, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 744-747, 2002.

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

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>> Acesso em: 31 de maio de 2018.

JU, C.C.; ZHANG, A.G.; YUAN, C.L.; ZHAO, X.L.; WANG, K.Z. The interesting DNA-binding properties of three novel dinuclear Ru(II) complexes with varied lengths of flexible bridges. **Journal of Inorganic Biochemistry**, China, v. 105, p. 435-443, Dez., 2011.

JUNIOR, L.C.D.; NOVO, J.B.M. Software para simulação de mecanismo de supressão da luminescência: modelo cinético de Stern-Volmer. **Revista Química Nova na Escola**, v. 37, n. 02, p. 361-366, 2014.

KARPINSKA, M.M.; MATYASIAK, J.; NIEWIADOMY, A. Synthesis of novel 4-(1H-benzimidazol-2-yl)benzene-1,3-diols and their cytotoxic activity against human cancer cell lines, **Arch. Pharm. Res.**, v. 34, p. 1639-1647, 2011.

KHAN, G.S., et al. Chemistry of DNA minor groove binding agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Nova Zelândia, v. 115, p. 105-118, Jul., 2012.

KHOSRAVI, K.; KAZEMI, S. Synthesis of 2-arylbenzimidazoles and 2-arylbenzothiazoles in both room temperature and microwave condition catalyzed by hexamethylenetetramine-bromine complex. **Chinese Chemical Letters**, v. 23, p. 61-64, 2012.

KOOLMAN, J.; ROEHMAN, K.H. **Color Atlas of Biochemistry**. 2. ed. Alemanha: Thieme Stuttgart, 2005.

KUMAR, T.B.; SUMANTH, C.; RAO, A.V.D.; KALITA, D.; RAO, M.S.; SEKHAR, K.B.C.; KUMAR, K.S.; PAL, M. Catalysis by FeF₃ in water: a green synthesis of 2-substituted 1,3-benzazoles and 1,2-disubstituted benzimidazoles. **Royal Soc. Chem**, v. 2, p. 11510-11519, 2012.

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

LAPRENSA. Bajas dosis de quimioterapia controlan mejor el cáncer, **Guía Médica**, Revista Online, 2016. Disponível em: <<http://www.laprensa.hn/guiamedica/temas/933869-418/bajas-dosis-de-quimioterapia-controlan-mejor-el-c%C3%A1ncer>> Acesso em: 02 de Junho de 2018.

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

LINDGREN, E.B.; DE BRITO, M.A.; VASCONCELOS, T.R.A.; DE MORAES, M.O.; MONTENEGRO, R.C.; YONEDA, J.D.; LEAL, K.Z. Synthesis and anticancer activity of (E)-2-benzothiazoles hydrazones, **Eur. J. Med. Chem.**, v. 86, p. 12-16, 2014.

LING, X., et al. Spectroscopic studies on the interaction of pazufloxacin with calf thymus DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, China, v. 93, p. 172-176, Ago., 2008.

LOMBARDINO, J.G.; LOWE, J.A. 3rd. The role of the medicinal chemist in drug discovery – then and now. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 10, p. 853-62, 2004.

LUZ, Hospital da. **Radioterapia**, Lisboa, 2018. Disponível em: <<http://www.hospitaldaluz.pt/lisboa/pt/servicos-clinicos/especialidades-e-linhas-assistenciais/radioterapia>> Acesso em: 02 de Junho de 2018.

MALTAS, E. Binding interactions of niclosamide with serum proteins; **Journal of Food and Drug Analysis**, Turquia, v. 22, p. 549-555, 2014.

MANSOURI, M., et al. Investigation on the Interaction between Cyclophosphamide and Lysozyme in the Presence of Three Different Kind of Cyclodextrins: Determination of the Binding Mechanism by Spectroscopic and Molecular Modeling Techniques, **Molecules**, Irã, v. 18, p. 789-813, Jan., 2013.

MATHERS, C.D., et al. **Global burden of disease in 2002**: data sources, methods and results. Geneva: WHO, 2003. (Global programme on evidence for health policy discussion paper, v. 54).

MCCRACKEN, R.O.; LIPKOWITZ, K. Structure-activity relationships of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics: a molecular modeling approach to *in vivo* drug efficacy. **The Journal of Parasitology**, v. 76, n. 6, p. 853-864, Dez., 1990.

MIRKIN, S.M. Discovery of alternative DNA structures: a heroic decade (1979-1989). **Frontiers in Bioscience**, Estados Unidos da América, v. 13, p. 1064-1071, Jan., 2008.

MOHAMMADI, M.; BARDAJEE, G.R.; PESYAN, N.N. A novel method for the synthesis of benzothiazole heterocycles catalyzed by a copper-DiAmSar complex loaded on SBA-15 in aqueous media. **Royal Soc. Chem. Adv**, v. 4, p. 62888-62894, 2014.

MOLINA-BOLÍVAR, 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.

MURAD, A.M.; KATZ, A. **Oncologia Bases Clínicas do Tratamento**, Guanabara, Rio de Janeiro, p. 41, 1996.

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.

NAKAMOTO, K.; TSUBOI, M.; STRAHAN, G.D. **Drug–DNA Interactions: Structures and Spectra**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2008.

NASCIMENTO, Eduarda de Omena Oliveira. **Avaliação da interação entre derivados β -carbolínicos e DNA (Calf Thymus) através de técnicas espectroscópicas**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6.ed. São Paulo: Sarvier, 2014.

NGUYEN, B., et al. Characterization of a Novel DNA Minor-Groove Complex. **Biophysical Journal**, v. 86, p. 1028-1041, 2004.

NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; MIRKAZEHI-RIGI, S. Fluorescence and DNA-binding properties of neodymium(III) and praseodymium(III) complexes containing 1,10-phenanthroline; **Spectrochimica Acta Part A**, v. 79, n. 5, p. 978-984, 2011.

NUNES, C.C., et al. Specific berenil-DNA interactions: An approach for separation of plasmid isoforms by pseudo-affinity chromatography. **Analytical biochemistry**, v. 412, p. 153-158, 2011.

PARK, H.; HONG, S.; HONG, S. Nocodazole is a High-affinity ligand for the cancer-related kinases ABL, c-KIT, BRAF, and MEK; **Chem. Med. Chem.**, v. 7, p. 53-56, 2012.

PATEL, N.B.; SHAIKH, F.M. New 4-thiazolidinones of nicotinic acid with 2-amino-6-methylbenzothiazole and their Biological Activity. **Scientia Pharmaceutica**, v. 78, n. 4, p. 753-765, Out., 2010.

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

POLICARPI, Everton de Britto. **Síntese, caracterização e estudo de interação com o DNA de novos complexos de cobre(II) com o ligante "DPPZ"**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

PRAY, L.A. Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. **Nature Education**. Reino Unido, v. 1, n. 1, 2008. Disponível em: <

<https://www.nature.com/scitable/topicpage/discovery-of-dna-structure-and-function-watson-397> > Acesso em: 05 de abril de 2018.

PUYO, S.; MONTAUDON, D.; POURQUIER, P. From old alkylating agents to new minor groove binders. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, França, v.89, p. 43-61, Jul., 2014.

RADEMARK-LAKHAI, J.M.; BONGARD, D.V.D.; PLUIM, D.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H.M. A phase I and pharmacological study with imidazolium-*trans*-DMSO-imidazoles-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticâncer agente, **Clin. Cancer Res.**, v. 10, p. 3717-3727, 2004.

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

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

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

SANTOSH, P.C.; PANDEYA, S.N.; PATHAK, A.A. Benzimidazole: a versatile chemical entity. **Int. J. Res. Ayurveda Pharm**, v. 2, p. 1726-1737, 2011.

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-substitued 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.

SEFEROGLU, Z.; MAHMOUD, M.M.A; IHMELS, H. Studies of the binding interactions of dicationic styrylimidazol (1,2-a) pyridinium dyes with duplex and quadruplex DNA. **Dyes and Pigments**, Turquia, v. 125, p.241-248, Fev., 2016.

SHAHABADI, N.; HADIDI, S. Spectroscopic studies on the interaction of calf thymus DNA with the drug levetiracetam. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. Irã, v. 96, p. 278-283, Mai., 2012.

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.

SHAIK, S.A.; JAYARAM, B. **DNA Drug Interaction**. Department of Chemistry, Índia. Disponível em: < <http://www.scfbio-iitd.res.in/doc/preddicta.pdf> > Acesso em: 10 de Abril de 2018.

SHI, X.H.; WANG, Z.; XIA, Y.; YE, T.H.; DENG, M.; XU, Y.Z.; WEI, Y.Q.; YU, L.T. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Benzothiazole-2-thiol Derivatives as Potential Anticancer Agents, **Molecules**, v. 17, p. 3933-3944, 2012.

SILVA, L., et al. Investigação Eletroquímica e calorimétrica da interação de novos agentes antitumorais biscatiônicos com DNA. **Química Nova**, Brasil, v. 35, p. 1318-1324, Jun., 2012.

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

SILVESTRI, C.; BRODBELT, J.S. Tandem Mass Spectrometry for Characterization of Covalent Adducts of DNA with Anticancer Therapeutics. **Mass Spectrometry Reviews**, Texas, v. 32, p. 247-266, Nov., 2012.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Dru-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 9ª Edição norte-americana. São Paulo: Thomson, 2015.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. Vol. 2, 10 ed. RIO DE JANEIRO: LTC, 2012.

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

STEWART, B.W.; WILD, C.P. (Ed.). **World Cancer Report**: 2014. Lyon: IARC, 2014.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays for bioactivity in methods in plant biochemistry. **Ed. K. Hostettmann**, 1991.

SUNG, G.H.; LEE, I.; KIM, B.R.; SHIN, D.; KIM, J.; LEE, S.; YOON, Y. Eco-friendly atom-economical synthesis of 2-substituted-benzo[d]thiazoles and 2-substituted-benzo[d]oxazoles using 2-acylpyridazin-3(2H)-ones, **Tetrahedron**, v. 69, p. 3530-3535, 2013.

TOWNSEND, L.B.; WISE, D.S. The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. **Parasitology Today**, v. 6, n. 4, p. 107-112, Abr., 1990.

VENTURA, P. Centro de referência em cirurgias eletivas de baixa e média complexidades, do Hospital Regional de Samambaia. **Agência Brasília**, 2017. Disponível em: < <https://www.agenciabrasilia.df.gov.br/2017/06/09/samambaia-torna-se-referencia-em-cirurgias-de-hernia-e-vesicula/> > Acesso em: 02 de Junho de 2018.

WANG, E.; ZAMAN, N.; MCGEE, S.; MILANESE, J.; MASOUDI-NEJAD, A.; O'CONNOR-MCCOURT, M. Predictive genomics: A cancer hallmark network for

predicting tumor clinical phenotypes using genome sequencing data, **Seminars Cancer Biology**, v. 30, p. 4-12, 2015.

WERMUTCH, C.G. **The practice of medicinal chemistry**. London: Academic Press. 2003.

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, X.; et al. Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to human serum albumin at subdomain IIA. **Spectrochimica Acta Part A**, China, v. 79, p. 1202-1209, Abr., 2011.

XIANG, P.; ZHOU, T.; WANG, L.; SUN, C.Y.; HU, J.; ZHAO, Y.L.; YANG, L. Novel benzothiazole, benzimidazole and benzoxazole derivatives as potential antitumor agents: synthesis and preliminary in vitro biological evaluation, **Molecules**, v. 17, p. 873-883, 2012.

YADAV, G.; GANGULY, S. Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 419-443, 2015.

ZARAGOZA, F. **Lead Optimization for Medicinal Chemists: Pharmacokinetic Properties of Functional Groups and Organic Compounds**. 1.ed. Weinheim: Wiley-VHC Verlag GmbH & Co KGaA, 2012.

ZHANG, Y., et al. Interaction of malachite green with bovine serum albumin: Determination of the binding mechanism and binding site by spectroscopic methods. **Journal of Hazardous Materials**, China, v. 163, p. 1345-1352, Ago., 2009.

ZHANG, Y.; HUANG, K. The influence of the hydrated metal cations binding to adenine-N7 or adenine-N3 on the hydrogen bonding in adenine-thymine base pair: A comparative study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, China, v. 822, p. 57-64, Jul., 2007.

ZHAO, T., et al. In vitro studies on the behavior of salmeterol xinafoate and its interaction with calf thymus DNA by multi-spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 132, p. 198–204, Mai., 2014.

ZHU, M.; ZHOU, L. Theoretical study on the mechanism of reaction of novel iminoethercontaining Pt(II) anticancer drugs with biological targets, **Computacional & Theoretical Chemistry**, v. 1051, p. 24-34, 2015.