



UFAL

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

INTERAÇÃO DE DROGAS DE RECREAÇÃO COM *ctDNA* SIMULANDO CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS

CAMILA DA SILVA NUNES

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 – Maceió - AL

INTERAÇÃO DE DROGAS DE RECREAÇÃO COM ctDNA SIMULANDO CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS

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

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

Maceió-AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

N972i Nunes, Camila da Silva.
Interação de drogas de recreação com *ctDNA* simulando condições fisiológicas / Camila da Silva Nunes. - 2019
64 f. : il.

Orientadora: Isis Martins Figueiredo.
Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 59-64.

1. *ctDNA* (Calf thymus). 2. Drogas - recreação. 3. 25H-NBOH. 4. 25H-NBOMe. 5. Espectroscopia. 6. Simulação de acoplamento molecular. I. Título.

CDU: 543.42:577.213.3



PPGQB

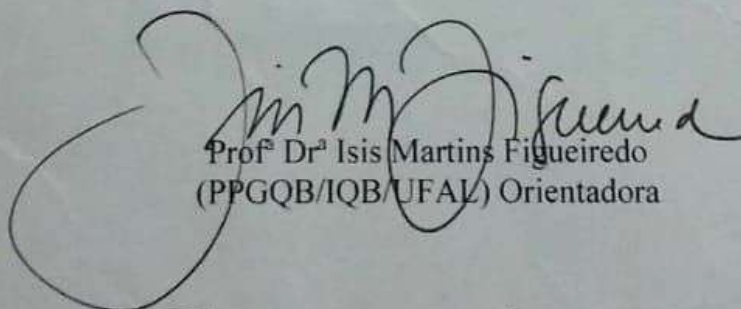
Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



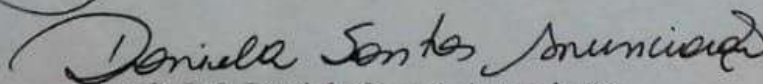
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de CAMILA DA SILVA NUNES, intitulada: “**Interação de drogas de recreação com *ct*DNA simulando condições fisiológicas**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 24 de julho de 2019, às 10h, na sala de reuniões do IQB/UFAL.

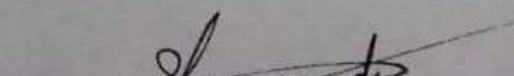
COMISSÃO JULGADORA



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



Prof.^a Dr.^a Daniela Santos Anunciação
(PPGQB/IQB/UFAL)



Prof. Dr. Sérgio Antônio Fernandes
(UFV)

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria do Socorro e Aldemir Nunes, por total dedicação, amor e apoio durante toda a minha vida acadêmica, como também a minha irmã, Andressa Nunes, por todo incentivo e força nessa caminhada, espero continuar ao seu lado, acompanhando seus passos à minha frente pelo resto de nossas vidas. A eles, toda a minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Quero registrar minha gratidão inicialmente, à minha família, em especial, meus pais e minha irmã que não mediram esforços para que eu avançasse nos estudos. Mãe e Pai, seus cuidados, dedicação e segurança foram essenciais nessa caminhada. Minha irmã, sempre meu maior incentivo, ponto de apoio e minha fonte de inspiração.

Sou grata também a minha melhor amiga e companheira de apartamento, Roberta, por todo apoio e paciência nos momentos difíceis que compartilhamos.

Ao meu companheiro Gabriel, meu maior incentivador, obrigada pela paciência e por me trazer paz nos momentos mais desafiadores.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Isis Martins Figueiredo pela oportunidade que me foi dada, pelos ensinamentos e paciência.

Ao prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos por todos ensinamentos e contribuições ao meu trabalho.

Ao professor Ângelo de Fátima por ceder os compostos avaliados nesse trabalho. Obrigada também ao Wellington por toda colaboração para este trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de instrumentação e desenvolvimento em química analítica (LINQA), por todo o apoio e companheirismo durante esta jornada, em especial, Marina pela ajuda no meu trabalho, colaboração quando necessário e por todo apoio. Obrigada também ao Ari e Janaína pela amizade, apoio e torcida de sempre.

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

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para mais essa conquista.

Obrigada!

Sempre vai ter mais alguma coisa. Outro obstáculo para superar. Mais perigo no horizonte. A vida é assim. Mas a vida é mais do que conquistar montanhas e se sair vitorioso em toda batalha. Aproveite a vista. Relaxe de vez em quando. Seu sucesso não tem sentido sem diversão. – Autor Desconhecido

RESUMO

Existem drogas de recreação que não possuem dados de segurança pré-clínicos publicados no que se refere à sua toxicidade. Isso pode estar relacionado tanto à dificuldade em conseguir quantidades de amostras suficiente de drogas quanto à dificuldade para liberação judicial que permita realizar estes estudos. Um exemplo são os derivados de NBOMe, este nome vem do substituintes "N-benzilmetoxi" (sendo o metoxi escrito como "OMe"), os quais possuem uma variedade de estruturas, são alucinógenos sintéticos, derivados da fenetilamina e muito utilizados como substitutos do LSD (*Lysergsäure-diethylamid* - dietilamida do ácido lisérgico) que é uma das mais potentes substâncias alucinógenas conhecidas. 25H-NBOMe e 25H-NBOH são exemplos dessas drogas, porém suas propriedades fisiológicas e toxicológicas não são conhecidas. Dentro desse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a interação entre o *ctDNA* e 25H-NBOMe e 25H-NBOH, empregando técnicas espectroscópicas simulando condições fisiológicas. Nos estudos empregando fluorescência molecular foi observado que os compostos analisados apresentaram emissão em 327 nm quando excitados em 260 nm. Dessa forma, devido a variação na fluorescência intrínseca de cada composto, foi possível calcular a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e a constante de ligação (K_b). As constantes foram calculadas na faixa de 23 a 37°C, apresentando K_{SV} na ordem de 10^3 M^{-1} e K_b na ordem de 10^4 M^{-1} , as quais, diminuíram em função do aumento da temperatura. O mecanismo preferencial de extinção da fluorescência dos compostos pelo *ctDNA* foi classificado como *quenching* estático, uma vez que o $K_q > 2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Por meio de estudos de competição com sete sondas comerciais (brometo de etídio, acridina orange, DAPI, tiazol orange, berberina, hoechst e *methyl green*) com modo de marcação estabelecido, foi possível inferir que esses compostos interagem com o *ctDNA* via *groove* maior. Os estudos termodinâmicos indicaram que a interação com o *ctDNA* é espontânea e que os principais tipos de interações que ocorrem são ligações de hidrogênio e força de van der Waals ($\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$). Por fim, utilizando estudos de RMN ^1H foi estabelecido o epítipo das moléculas na presença do *ctDNA*. No caso do 25H-NBOH a região contendo o fenol foi a que mais sofreu deslocamento na presença da macromolécula, o que é um indicativo que essa é a porção da molécula que mais interage com o *ctDNA*. Além disso, o *docking* molecular indicou as regiões de interação e quais as principais interações que estabilizam o complexo, sendo consistentes com os estudos experimentais. Assim, este estudo apresentou evidências da interação entre drogas de recreação como 25H-NBOMe e 25H-NBOH com o DNA, o que pode acarretar possíveis efeitos genotóxicos.

Palavras-chave: interação, DNA, drogas de recreação, 25H-NBOH, 25H-NBOMe, técnicas espectroscópicas, *docking* molecular.

ABSTRACT

There are recreational drugs that do not have published preclinical safety data regarding their toxicity. This may be related to both the difficulty in obtaining sufficient quantities of drug samples and the difficulty in obtaining a judicial release to carry out these studies. One example is the derivatives of NBOMe, this name comes from the substituent "N-benzylmethoxy" (the methoxy being written "OMe"), which have a variety of structures, are synthetic hallucinogens, phenethylamine derivatives and widely used as LSD (*Lysergsäurediethylamid* - lysergic acid diethylamide) which is one of the most potent hallucinogenic substances known. 25H-NBOMe and 25H-NBOH are examples of these drugs, but their physiological and toxicological properties are not known. In the studies employing molecular fluorescence, it was observed that the analyzed compounds showed emission at 327 nm when excited. at 260 nm. Thus, due to the variation in the intrinsic fluorescence of each compound, It is possible to calculate the Stern-Volmer constant (K_{SV}) and the binding constant (K_b). The constants were calculated in the range of 23 to 37°C, presenting K_{SV} in the order of 10^3 M^{-1} and K_b in the order of 10^4 M^{-1} , which decreased as a function of the temperature increase. The preferred mechanism of quenching the fluorescence of the compounds by ctDNA was classified as static quenching, since the $K_q > 2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. By means of competition studies with seven commercial probes (ethidium bromide, acridine orange, DAPI, orange thiazole, berberine, hoechst and methyl green) with established dates, it was possible to infer which these compounds interact with ctDNA via the major groove. The thermodynamic studies indicated that the interaction with ctDNA is spontaneous and that the main types of interactions that occur are hydrogen bonds and van der Waals force ($\Delta H < 0$ and $\Delta S < 0$). Finally, using ^1H NMR studies the epitope of the molecules was established in the presence of ctDNA. In the case of 25H-NBOH, the region containing the phenol was the one that most suffered displacement in the presence of the macromolecule, which is an indication that this is the portion of the molecule that most interacts with the ctDNA. In addition, molecular docking indicated the regions of interaction and what are the main interactions that stabilize the complex and are consistent with the experimental studies. Thus, this study presents evidence of the interaction between recreational drugs such as 25H-NBOMe and 25H-NBOH with DNA, which may lead to possible genotoxic effects.

Keywords: interaction, DNA, recreational drugs, 25H-NBOH, 25H-NBOMe, spectroscopic techniques, molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelos de interação enzima-substratos **(a)** Modelo chave-fechadura proposto por Emil Fischer; **(b)** Modelo de encaixe induzido proposto por Koshland.....15
- Figura 2.** Estrutura do DNA e formação dos pares de bases adenina-timina, guanina-citosina, através de ligações de hidrogênio 17
- Figura 3.** Conformações B-DNA, A-DNA e Z-DNA..... 18
- Figura 4.** Modos de ligação de compostos com DNA. 18
- Figura 5.** Tipos de interações entre DNA e ligantes..... 19
- Figura 6.** Estruturas químicas de núcleos intercalantes ao DNA. 20
- Figura 7.** Estruturas químicas de ligantes que interagem com DNA via *groove*..... 21
- Figura 8.** Derivados NBOMe e NBOH na forma de folhas de papel absorvente destinadas à administração sublingual.. 24
- Figura 9.** Estruturas químicas das drogas 25H-NBOH e 25H-NBOMe..... 24
- Figura 10.** Perfil espectral do DNA em função da temperatura. a) Espectro de absorção do DNA a 28°C (DNA /Watson-Crick) e 85 °C (separação das fitas); b) Curva de desnaturação do DNA.....26
- Figura 11.** Representação do processo de quenching **a)** dinâmico **b)** estático.....29
- Figura 12.** Resultados obtidos para avaliação da interação DNA-ligante por fluorescência molecular. **a)** Perfil espectral do composto BOH (7,5 µM) com adição de incrementos crescentes de *ct*DNA; **b)** Curva para cálculo da constante Stern-Volmer, KSV, (processo de *quenching*) para BOH; **c)** Curva logarítmica para cálculo da constante de ligação (Kb) e *n* do complexo *ct*DNA-BOH. **d)** Perfil espectral do composto BOMe (7,5 µM) com adição de incrementos crescentes de *ct*DNA; **e)** Curva para cálculo de KSV para BOMe; **f)** Curva logarítmica para cálculo de Kb e *n* do complexo *ct*DNA-BOMe. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 10 mM, 100 mM NaCl) a 23, 30 e 37 °C.....42
- Figura 13.** Avaliação da interação *ct*DNA-ligante por absorção no UV-vis. a) Composto BOH (7,5 µM) e *ct*DNA (20 µM); b) Composto BOMe (7,5 µM) e *ct*DNA (20 µM).....45
- Figura 14.** Avaliação do modo de ligação DNA-ligante por meio de ensaios com KI (0,005 – 0,15 mol L⁻¹). **a)** Gráfico Stern-Volmer (determinação de KSV) na ausência

e presença do ctDNA (50 e 100 μM), para o composto **BOH** (7,5 μM). **b)** Gráfico Stern-Volmer na ausência e presença do ctDNA (50 e 100 μM), para o composto **BOMe** (7,5 μM). **c)** Gráfico em barras dos valores de KSV na ausência e na presença de ctDNA para os dois compostos avaliados. A: BOH e BOMe (7,5 μM); B: BOH + ctDNA e BOMe + ctDNA (50 μM) e C: BOH + ctDNA e BOMe + ctDNA (100 μM).....47

Figura 15. Avaliação da intensidade de fluorescência do sistema sonda-ctDNA. **a)** Sonda intercalante, [BE] = 1 μM , [ctDNA] = 10 μM e [ligantes] = 15 – 250 μM na presença do composto **BOH** **b)** Sonda seletiva ao *groove* menor, [Hoechst] = 1 μM , [ctDNA] = 10 μM e [ligantes] = 15 – 250 μM na presença do composto **BOH**. **c)** Sonda intercalante, [BE] = 1 μM , [ctDNA] = 10 μM e [ligantes] = 15 – 250 μM na presença do composto **BOMe** **d)** Sonda seletiva ao *groove* menor, [Hoechst] = 1 μM , [ctDNA] = 10 μM e [ligantes] = 15 – 250 μM na presença do composto **BOMe**.....48

Figura 16. a) Avaliação da intensidade de fluorescência do sistema BOH-ctDNA na ausência do *methyl green* **b)** Avaliação da intensidade de fluorescência do sistema BOH-ctDNA na presença do *methyl green* (20 μM) **c)** Kb para os sistemas A (sem a presença do *methyl green*), B (10 μM de *methyl green*) e C (20 μM de *methyl green*). **d)** Sistema BOMe-ctDNA na ausência do *methyl green* **e)** Sistema BOMe-ctDNA na presença do *methyl green* (20 μM) Concentrações: [ctDNA] = 0 - 250 μM , [BOH] = 7,5 μM e [MG] 10 e 20 μM Estrutura com numeração. **a)** Para o composto BOH. **b)** Para o BOMe.....50

Figura 17. Curva de desnaturação térmica do ctDNA a 260 nm na ausência e na presença do compostos. a) Para composto BOH. b) Para composto BOMe. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 10 mM, 100 mM NaCl).....51

Figura 18. Estrutura com numeração. **a)** Para o composto BOH. **b)** Para o BOMe..52

Figura 19 – Docking molecular do composto BOH no DNA. Representação esquemática do composto BOH, que se liga via *groove*. Linha verdes: ligação de hidrogênio.....55

Figura 20 – Docking molecular do composto BOMe no DNA. Representação esquemática do composto BOMe, que se liga via *groove*. Linha verdes: ligação de hidrogênio.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de interação do <i>ct</i> DNA com os compostos BOMe e BOH.	43
Tabela 2. Parâmetros termodinâmicos de interação dos 25H-NBOMe e 25H-NBOH com <i>ct</i> DNA.	44
Tabela 3. Variação da máxima absorvância entre o complexo DNA-ligante e o somatório das absorvâncias do ligante e DNA livres.	46
Tabela 4. Resultados referentes ao estudo de desnaturação térmica do <i>ct</i> DNA frente aos compostos selecionados.....	51
Tabela 5 - Desvio químico de RMN ¹ H (δ) de BOH na ausência e presença de diferentes proporções de <i>ct</i> DNA. Condições: BOH (1 mM) e <i>ct</i> DNA em tampão fosfato (1 mM) a um pH de 7,4.....	53
Tabela 6 - Desvio químico de RMN ¹ H (δ) de BOMe na ausência e presença de diferentes proporções de <i>ct</i> DNA. Condições: BOMe (1 mM) e <i>ct</i> DNA em tampão fosfato (1 mM) a um pH de 7,4.....	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AO	Acridina orange
BE	Brometo de etídio
ctDNA	DNA <i>Calf Thymus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
F	Fluorescência
HO	Hoechst
K _b	Constante de ligação
K _{sv}	Constante de Stern Volmer
K _q	Taxa de extinção biomolecular
<i>n</i>	Número de sítios de ligação do complexo
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
TO	Tiazol orange
UV-Vis	Ultravioleta-visível
ΔH	Variação de entalpia
ΔS	Variação de entropia
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs
3D	Tridimensional
NPS	<i>New psychoactive substances</i>
UNODOC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
LSD	Dietilamida do ácido lisérgico
UV-vis	Ultravioleta-visível
MG	<i>Methyl Green</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Química supamolecular.....	14
1.2	DNA: características gerais.....	15
1.2.1	DNA duplex.....	16
1.2.2	Modo de ligação DNA-ligante.....	18
1.2.2.1	Modo de ligação covalente.....	19
1.2.2.2	Modo de ligação não covalente.....	19
1.3	Importância de estudos de interação DNA-ligante.....	22
1.4	25H-NBOMe E 25H-NBOH.....	22
1.5	Técnicas e métodos empregados para avaliar a interação DNA-ligante...	24
1.5.1	Espectroscopia de absorção molecular no UV-visível.....	25
1.5.2	Estudos de desnaturação térmica.....	26
1.5.3	Espectroscopia de fluorescência molecular.....	27
1.5.3.1	Mecanismo de <i>quenching</i>	28
1.5.3.2	Constante de ligação (K _b).....	30
1.5.3.3	Modo de ligação.....	31
1.5.3.3.1	Ensaio com iodeto de potássio (KI).....	31
1.5.3.3.2	Ensaio de competição.....	32
1.5.3.4	Parâmetros termodinâmicos.....	33
1.6	<i>Docking</i> molecular.....	34
2	JUSTIFICATIVA	35
3	OBJETIVOS	35
3.1	Geral.....	35
3.2	Específicos.....	36
4	EXPERIMENTAL	36
4.1	Reagentes e Soluções.....	36
4.2	Equipamentos utilizados.....	38
4.3	Procedimentos.....	38
4.3.1	Determinação da concentração do <i>ctDNA</i> (<i>Calf thymus</i>).....	38

4.3.2	Estudo da interação <i>ct</i> DNA-ligante por fluorescência molecular e UV-vis..	39
4.3.3	Estudo realizado com iodeto de potássio (KI).....	39
4.3.4	Ensaio de competição com brometo de etídio (BE), acridina orange (AO), DAPI, tiazol orange (TO), berberina e Hoechst (HO).....	39
4.3.5	Ensaio de competição com <i>methyl green</i>	39
4.3.6	Avaliação da temperatura de desnaturação.....	40
4.3.7	Estudos de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN).....	40
4.3.8	Estudos de <i>Docking</i> molecular.....	40
4.3.9	Tratamento dos dados.....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Considerações iniciais.....	41
5.2	Avaliação da interação DNA-ligante.....	41
5.3	Estudos por espectroscopia de absorção molecular no UV-vis.....	45
5.4	Avaliação do modo de ligação composto- <i>ct</i> DNA.....	46
5.5	Estudos de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN).....	54
5.6	Estudos de <i>Docking</i> molecular.....	54
6	CONCLUSÃO	56
7	PERSPECTIVAS	57
8	REFERÊNCIAS	58

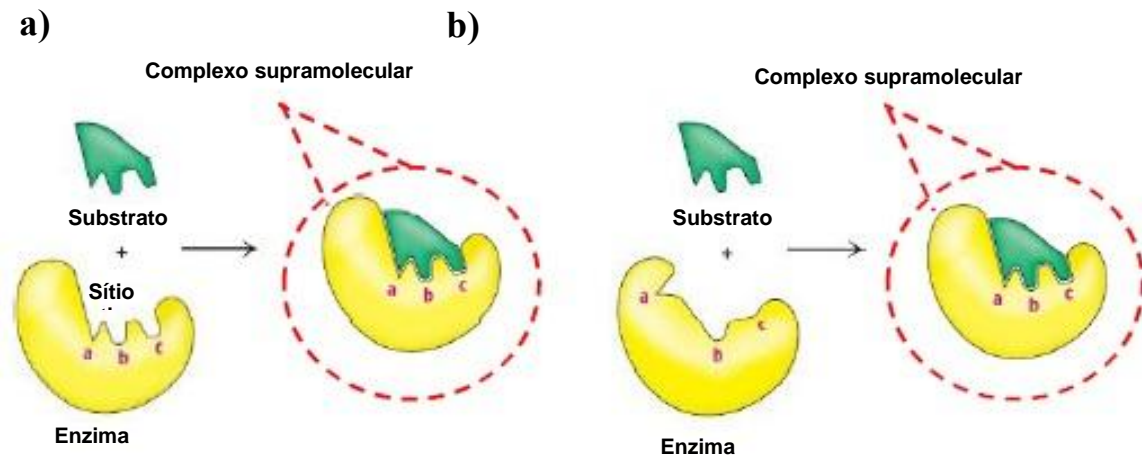
1 INTRODUÇÃO

1.1 Química supramolecular

O conceito de química supramolecular surgiu a partir da abordagem feita por Emil Fischer, em 1894, propondo o conceito de chave e fechadura, uma analogia, onde as macromoléculas seriam estruturalmente complementares a seus substratos. Essa teoria foi superada em 1958 quando Koshland propôs a *teoria do encaixe induzido*, no qual o substrato induz uma mudança na conformação da macromolécula, possibilitando o rearranjo dos aminoácidos para formar um sítio ativo complementar ao substrato (Figura 1) (DESIRAJU, 2001; STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2014; BARREIRO; FRAGA, 2015). As principais forças intermoleculares envolvidas tanto para o conceito de chave e fechadura, quanto para a teoria do encaixe induzido, são as não covalentes, como interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, entre outras (VARSHNEY et al., 2012).

A origem da química supramolecular se deu em 1969, quando o seu conceito foi introduzido pelo químico francês Jean-Marie Lehn, conceituando-a como “*química além da molécula*”. Lehn percebeu então, que alguns fenômenos biológicos importantes não envolvem a formação ou quebra de ligações covalentes. Contrariamente, as estruturas biológicas interagem por meio de interações não covalentes (DESIRAJU, 2001; VARSHNEY et al., 2012). Dessa forma, enquanto a química molecular está pautada no estudo da formação e quebra das ligações covalentes e iônicas, a química supramolecular se fundamenta na organização de associações moleculares com diferentes graus de complexidade, estabilizadas por interações intermoleculares (não covalentes), mais fracas e reversíveis (NGUYEN et al., 2001; BAZZICALUPI, et al., 2014).

Figura 1 - Modelos de interação enzima-substratos **(a)** Modelo chave-fechadura proposto por Emil Fischer; **(b)** Modelo de encaixe induzido proposto por Koshland.



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

Essas interações são de fundamental importância nos processos biológicos entre proteínas receptoras e substratos, reconhecimento celular, regulação da expressão genética pelas proteínas ligadas ao DNA e, principalmente a interação entre DNA e fármacos (LEHN, 1996). Portanto, a química supramolecular vem ganhando cada vez mais espaço, tanto na área da Química biológica e medicinal (ligação molécula-proteína, molécula-DNA, *design* de drogas, entre outros) como também na Ciência dos Materiais (magnetismo, sensores, condutividade, óptica não-linear, etc) (DESIRAJU, 2001; LEHN, 2002; YOU, 2015).

O DNA (ácido desoxirribonucléico) tem um papel muito relevante nos processos biológicos, visto que, ele é responsável pelo transporte do código genético, onde estão as informações necessárias para a síntese das proteínas e enzimas, por meio dos processos de tradução e transcrição (KOOLMAN, ROEHM, 2005).

1.2 DNA: características gerais

O DNA está relacionado diretamente com as características físicas e fisiológicas dos seres vivos. Portanto, o DNA é o portador de informações hereditárias e expressão gênica de proteínas e enzimas, que desempenham um papel

extremamente importante na vida humana (ZHAO, et al.; 2014; THIEMANN, 2003; ALMEIDA, 2005).

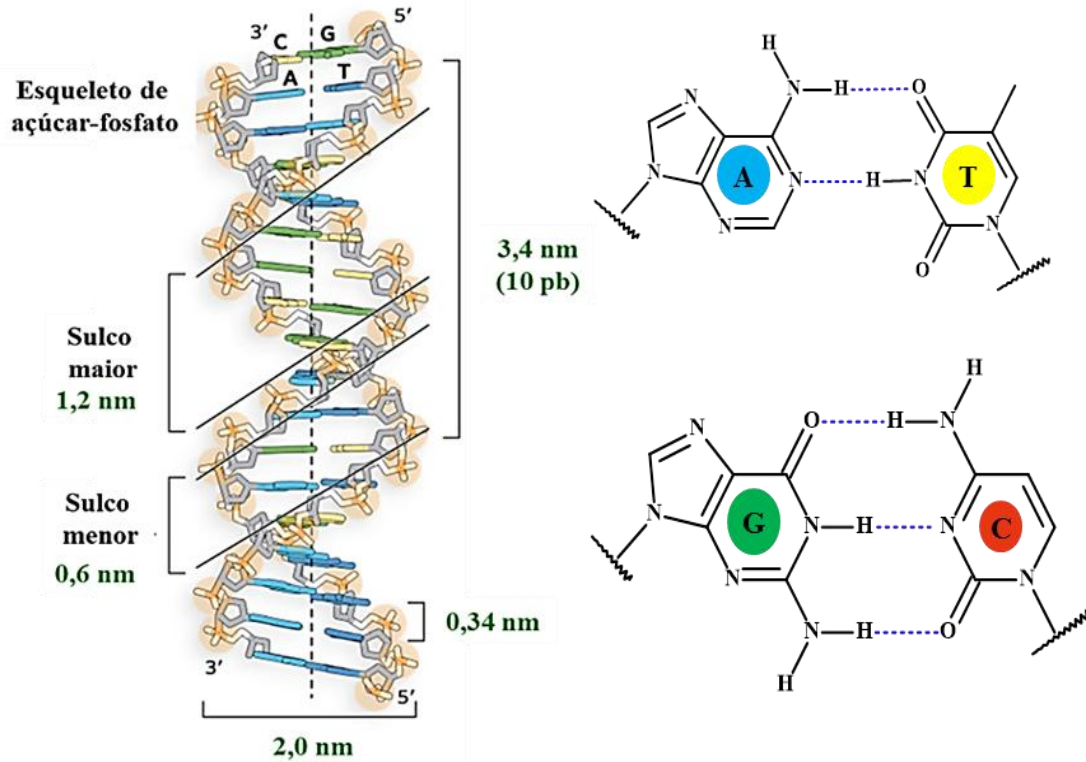
Dessa forma, o DNA por meio do tipo e sequência de bases nitrogenadas em sua cadeia polimérica, armazena as informações genéticas que determinam a síntese de todos os constituintes celulares e regula o seu funcionamento correto, por meio de reconhecimento molecular (NELSON; COX, 2014).

1.2.1 DNA duplex

Em 1953, foi proposta a estrutura tridimensional do DNA, pelos cientistas James Dewey Watson e Francis Crick, possibilitando o conhecimento de que o DNA celular contém tanto a informação genética quanto as características e funções de cada célula, sendo um marco na história da ciência (NELSON; COX, 2014).

O modelo proposto por Watson e Crick consiste em duas cadeias polinucleotídicas que se entrelaçam em um mesmo eixo formando uma dupla hélice, unidas por meio de ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas (Purínicas - Adenina (A), Guanina (G) e Pirimidínicas - Citosina (C), Timina (T)) de cada fita, sempre ocorrendo o pareamento de uma adenina com uma timina e uma citosina com uma guanina (NELSON; COX, 2014). A guanina (G) forma três ligações de hidrogênio com a citosina (C) da fita complementar enquanto a adenina de uma fita sempre forma duas ligações de hidrogênio com a timina (T) da outra (Figura 2). Dessa forma, ao longo da hélice, os pares de bases são sempre AT (ou TA) e CG (ou GC) (NAKAMOTO; TSUBOI; STRAHAN, 2008). A parte hidrofílica dos grupos desoxirribose e fosfatos carregados negativamente se encontram na parte externa do DNA, interagindo com a água circundante (Figura 2), já as bases purínicas e pirimidínicas encontram-se empilhadas no interior da dupla hélice (NELSON; COX, 2014; THIEMANN, 2003).

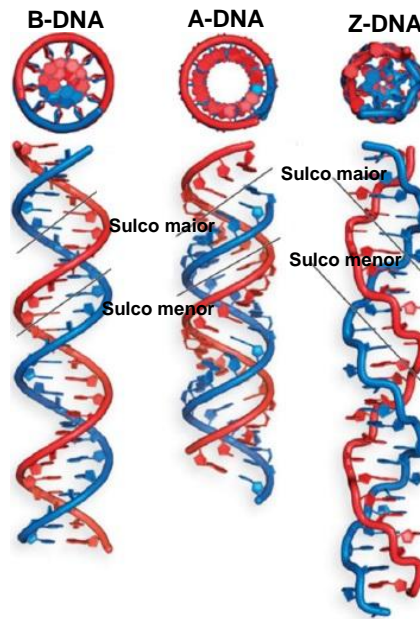
Figura 2- Estrutura do DNA e formação dos pares de bases adenina-timina, guanina-citosina, por meio de ligações de hidrogênio.



Fonte: adaptado de ALMEIDA et al., 2005.

A forma duplex do DNA apresenta variações estruturais (isoformas) dependentes do meio em que está exposto, podendo assumir as conformações: A-DNA, B-DNA E Z-DNA (Figura 3). A forma B do DNA é a estrutura proposta por Watson e Crick, que se refere a estrutura mais estável em condições fisiológicas, com 11 pares de bases para cada volta completa na hélice do DNA e a forma mais encontrada no organismo, essa isoforma possui a rotação da hélice para a direita. Além disso, é usada como padrão de referência em estudos das propriedades do DNA (HARVEY; FERRIER, 2011). A isoforma A-DNA é mais curta e é formada em condições de desidratação, além de possuir 10 pares de bases para uma volta completa na hélice, se encontra em ambientes com baixa concentração de água. Enquanto que a forma Z-DNA é a conformação alongada e fina com 12 pares de bases para uma volta completa na hélice; e é favorecida em condições com alta concentração de cátions e possui a rotação da hélice para a esquerda (ALMEIDA, 2005).

Figura 3- Conformações B-DNA, A-DNA e Z-DNA.

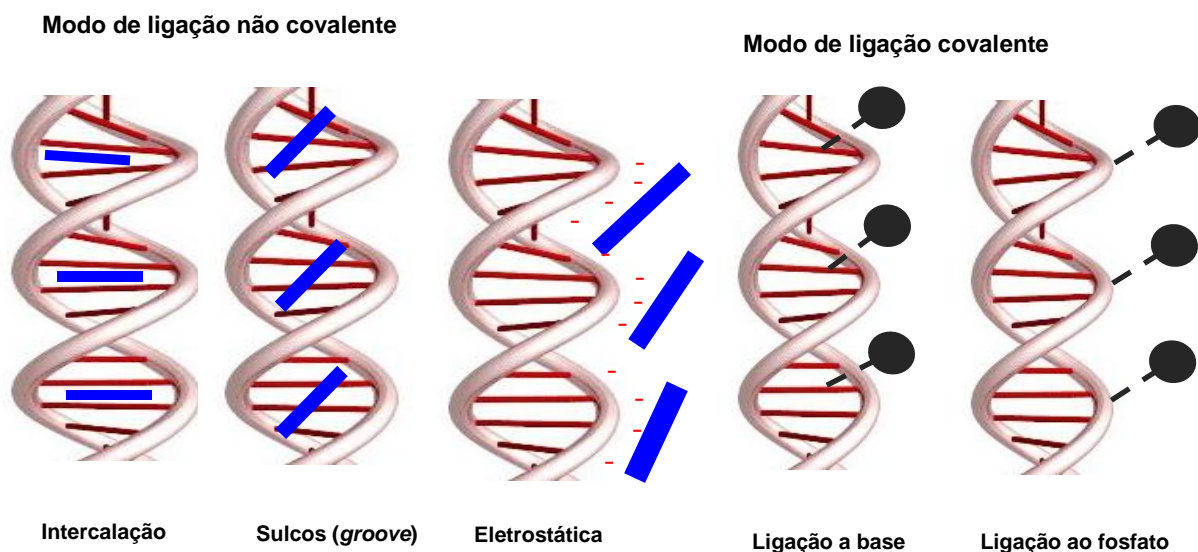


Fonte: adaptado de COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O' DONNELL, 2012.

1.2.2 Modo de ligação DNA-ligante

O DNA pode interagir com diferentes moléculas por dois diferentes tipos de interações, sendo elas: covalentes, com grupos fosfato ou bases do DNA e por interações não covalentes, que se subdividem em: interações eletrostáticas, intercalação e *groove*, sendo as duas últimas interações nos sulcos do DNA (Figura 4) (BARRA; NETTO, 2015).

Figura 4- Modos de ligação de compostos com DNA.



Fonte: adaptado de BARRA; NETTO, 2015.

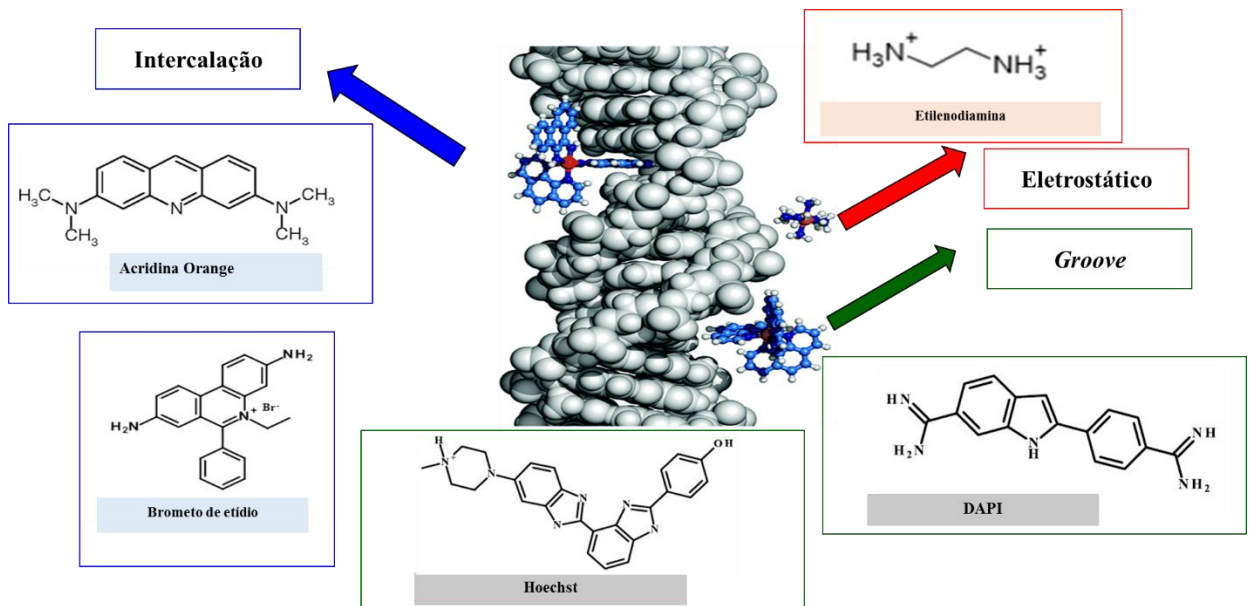
1.2.2.1 Modo de ligação covalente

O modo de ligação covalente do DNA com pequenas moléculas possui alta energia, portanto difícil de ser rompida e, dessa forma, os complexos macromolécula-ligante são raramente desfeitos, provocando a inibição completa do DNA, causando morte celular. Os principais ligantes que atuam por esse modo de ligação são, normalmente, de caráter eletrofílico. Um exemplo de um composto que forma ligação covalente com DNA é a cisplatina [*cis*-diclorodiaminoplatina(II)], um ligante tradicional, capaz de realizar ligações covalentes com os nitrogênios das bases do DNA deslocando o cloreto. Além disso, há os agentes alquilantes que atuam de forma semelhante a cisplatina, fazendo ligações covalentes com o DNA, impedindo e/ou inibindo o ciclo celular (processos de replicação). (PUYO, MONTAUDON, POURQUIER, 2014).

1.2.2.2 Modo de ligação não covalente

O modo de ligação não covalente é mais facilmente reversível, está relacionado a interações fracas e a espécie ou molécula alvo ao interagir com o DNA pode provocar tensão torsional, alterar a conformação, além de inibir a interação DNA-proteína nos processos biológicos (SILVESTRI; BRODBELT, 2012). Como já foi discutido, esse tipo de interação é a base da química supramolecular. Essas interações entre DNA e ligantes pode ocorrer de três formas: por intercalação, via *groove* ou ainda de forma eletrostática (Figura 5) (RAHMAN, et al., 2017; AHMAD, A.; AHMAD, M. 2018)

Figura 5 - Tipos de interações entre DNA e ligantes

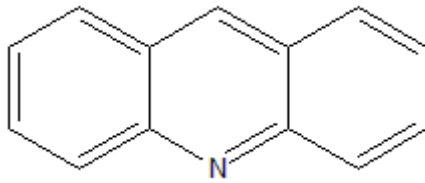


Fonte: autora, 2019.

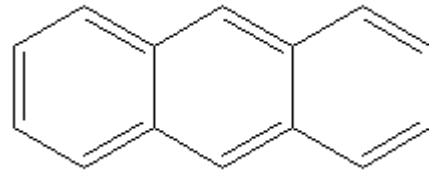
A intercalação acontece quando um composto (poli)aromático plano, com sistema rico em elétrons π , se interpõe entre dois pares de base adjacentes do DNA, ligando-se de forma perpendicular ao eixo da hélice (Figura 4). As forças intermoleculares que mantêm a estabilidade do complexo DNA-ligante, possibilitam uma maior estabilidade para o complexo que para o DNA sozinho. A estabilidade do complexo é efetuada pelo empilhamento π - π (interação π *stack*) que ocorre entre os grupos aromáticos heterocíclicos dos pares de bases e as estruturas aromáticas do intercalante, por meio de ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (MARTÍNEZ; CHACÓN-GARCIA, 2005; BARRA; NETTO, 2015).

A intercalação de um ligante entre os pares de bases do DNA causa uma mudança na estrutura do ácido nucleico, resultando em enrijecimento, alongamento e desenovelamento da dupla hélice do DNA. Portanto, o DNA perde sua estrutura helicoidal regular, modificando os ângulos de torção envolvendo os grupos açúcar-fosfato, possibilitando a acomodação do ligante por meio da separação dos pares de bases no sítio intercalante (WHEATE, et al., 2007). Dessa forma, a Figura 6 apresenta diversas estruturas químicas que são núcleos de intercaladores clássicos.

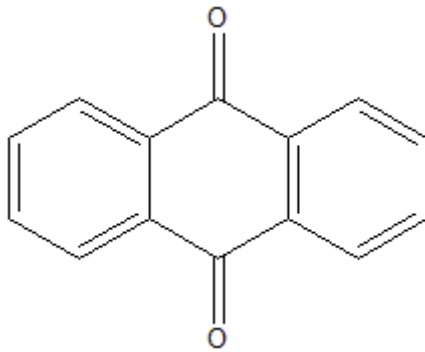
Figura 6 – Estruturas químicas de núcleos intercalantes ao DNA.



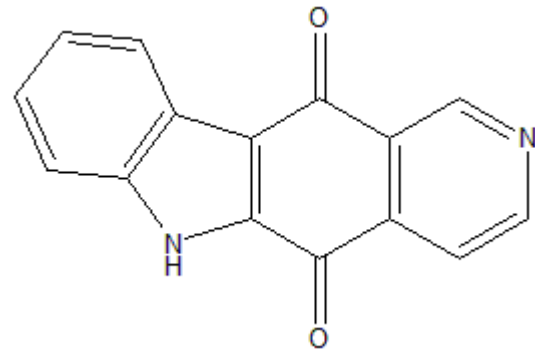
Acridinas



Antracenos



Antraquinonas



Elipticinas

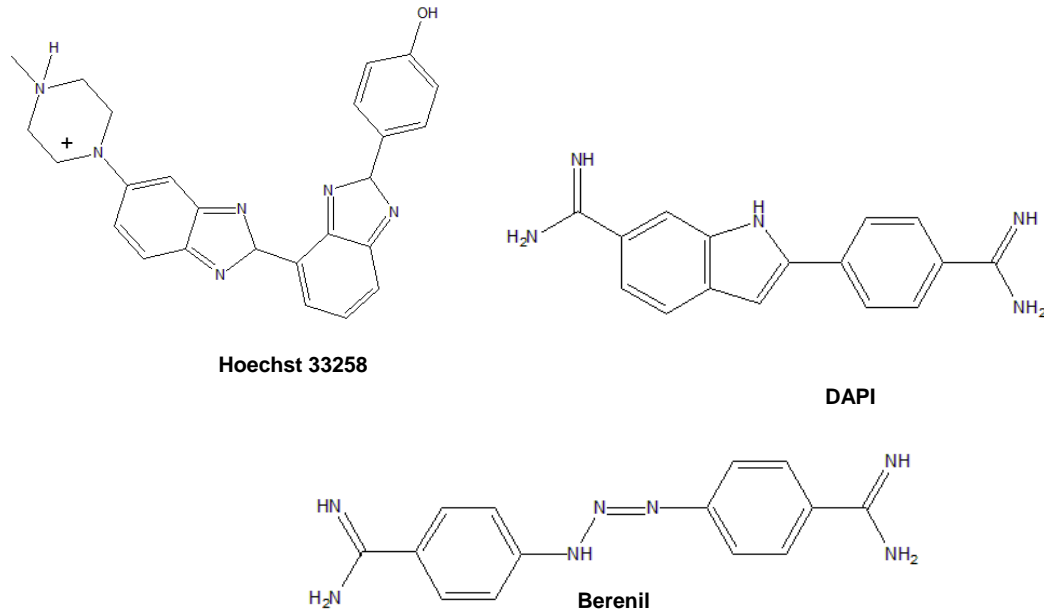
Fonte: adaptado de WHEATE, 2007.

O modo de ligação via *groove* ocorre quando as moléculas se ligam no sulco maior ou menor do DNA e envolve a interação direta do ligante com as bases nitrogenadas (Figura 4). O *sulco maior* é decorrente da depressão existente entre os giros adjacentes da hélice, e por possuir um sítio de ligação maior (1,2 nm) possibilita fácil acesso a ligantes volumosos. Já o *sulco menor* resulta da depressão entre as duas cadeias complementares, e devido ao seu tamanho menor (0,6 nm), está susceptível ao ataque de pequenas moléculas (Figura 4) (POLICARPI, 2008; KHAN, et al., 2012).

Estes sulcos possuem diferenças significativas no potencial eletrostático e nas características da composição das bases. Isso faz com que, o complexo formado por ligações ao sulco menor seja estabilizado por ligação de Van der Waals e de hidrogênio. Geralmente, os ligantes que interagem no sulco menor, têm vários anéis aromáticos (não condensados), tais como benzeno, furano ou pirrol, com capacidade de torção, facilitando as interações de Van der Waals. Ademais, esses compostos podem formar também ligações de hidrogênio de preferência com as bases timina e adenina (HAQ, 2002; ZHANG, HUANG, 2007). Já a ligação do sulco maior acontece por meio de ligação de hidrogênio, podendo formar uma hélice tripla de DNA, como por exemplo, o antibiótico norfloxacino (HAQ, 2002; RAUF, 2005). Na

figura 6, encontram-se alguns ligantes clássicos que apresentam interação *via groove* são eles: Hoechst 33258, netropsina, distamicina e DAPI (SALVIA, 2013).

Figura 7 – Estruturas químicas de ligantes que interagem com DNA *via groove*.



Fonte: adaptado de SALVIA, 2013.

Quanto à ligação eletrostática, ocorre entre as moléculas na forma catiônica e os grupos fosfato carregados negativamente presentes no DNA. Essa interação acontece na parte externa da hélice (Figura 4). Dessa forma, é possível observar que tanto a ligação nos sulcos (*groove*) quanto a intercalação acontecem na parte mais interna da dupla hélice do DNA, enquanto a ligação eletrostática está relacionada com interação na superfície da molécula de DNA, ou seja, na parte externa (REHMAN, 2015b).

1.3 Importância de estudos de interação DNA-ligante

Estudos sobre o modo de ligação e o mecanismo de pequenas moléculas biologicamente ativas com o DNA foram apontados como um dos principais temas na área de química biológica e medicinal nos últimos anos (DORRAJI; JALALI, 2013; ZHAO, et al., 2014; HASSAN; RAUF, 2015), posto que o DNA é um alvo intracelular muito eficiente para uma gama de compostos isto ocorre, porque moléculas pequenas podem interagir com proteínas associada ao DNA, híbridos de DNA-RNA e diretamente com a dupla hélice do ácido nucleico (RAUF, et al., 2005). Além disso, é possível avaliar a capacidade de ligação que algumas drogas de recreação possuem de se ligar ao DNA *in vitro* e desta forma, correlacionar com possíveis

propriedades (geno)tóxicas dos mesmos.

1.4 25H-NBOMe e 25H-NBOH

Novas substâncias psicoativas (NPS – *new psychoactive substances*) são um grupo de compostos que se espalharam pelas ruas de diferentes países na última década. De acordo com o Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC – *United Nations Office on Drugs and Crime*), as NPS são substâncias de abuso que não são controladas pelas convenções da Organização das Nações Unidas (ONU) sobre drogas, mas podem causar problemas de saúde. Elas podem ser divididas em nove grupos diferentes, um deles são as fenetilaminas. Derivados de N-benzilfenetilaminas, tais como 25X-NBOMes (2- (4-X-2,5-dimetoxifenil) -N - [(2-metoxifenil) metil] etanamina e 25X-NBOHs (2 - ((2- (4- X-2,5-dimetoxifenil) etilamino) metil) fenol, onde X pode ser Cl, Br, I ou até mesmo H. O que motiva a rápida disseminação dessas NPS é a dificuldade que existe para o controle legal, uma vez que suas estruturas químicas são facilmente modificadas sem perder seus efeitos fisiológicos (BRAGA; ARANTES; MAGALHÃES, 2018).

Os derivados de N-benzilfenetilaminas são substâncias alucinógenas cuja potência é comparada à dietilamida do ácido lisérgico (LSD), portanto suas doses usuais são consideravelmente menores do que as fenetilaminas clássicas e muitas outras NPS (BRAGA; ARANTES; MAGALHÃES, 2018). Substâncias NBOMe foram sintetizadas pela primeira vez em 2003 por Ralph Heim na Universidade Livre de Berlim e, em seguida, foram estudadas por David Nichols em 2008 (NIKOLAOU et al., 2014).

Diversas drogas de recreação não possuem dados de segurança pré-clínicos publicados no que se refere a sua toxicidade, potencial mutagênico/carcinogênico e impactos reprodutivos em modelos animais ou humanos e isso é ocasionado pela dificuldade em conseguir quantidades de amostras suficiente de drogas e dificuldade para liberação judicial que permita realizar estes estudos. Um exemplo são os derivados de NBOMe, os quais possuem uma variedade de estruturas, sendo as substâncias psicotrópicas: 25H- NBOH, 25B- NBOH, 25I-NBOH, 25H- NBOMe, 25B- NBOMe, 25I- NBOMe, 25C-NBOMe, proibidas no Brasil. (HENDRICKS & DAUGHERTY, 2018). Essas drogas apresentam efeitos colaterais psicodélicos

graves, tem sido reportados alguns casos clínicos de intoxicação em vários países, além de apresentarem potencial de dependência (NIKOLAOU et al., 2014).

A denominação NBOMe ocorre devido ao substituinte "N-benzilmetoxi" (sendo o metoxi escrito como "OMe"). (NIKOLAOU et al., 2014). O 25H-NBOH e 25H-NBOMe são derivados da fenetilamina, porém suas propriedades fisiológicas e toxicológicas não são conhecidas. As estruturas do 25H-NBOH e 25H-NBOMe são mostradas na Figura 9 Esses derivados são agonistas do receptor 5-HT_{2A} (pertence à família de receptores de serotonina). Portanto, seus efeitos alucinógenos são devido à ativação do receptor 5-HT_{2A} (HENDRICKS; DAUGHERTY, 2018). Essas drogas tem sido apreendidas na forma de folhas de papel absorvente destinadas à administração sublingual. São frequentemente impressos com desenhos distintos e perfurados para que possam ser divididos em pequenas unidades de dose única (Figura 8). As "doses comuns" são 500 a 800 µg. Seus efeitos são percebidos dentro de 15 a 120 minutos com duração de 6 a 10 horas (NIKOLAOU et al., 2014). Dessa forma, torna-se importante avaliar a capacidade de interação dessas drogas com o DNA *in vitro* e assim, correlacionar com possíveis propriedades (geno)tóxicas dessa classe de drogas de recreação.

Figura 8 - Derivados NBOMe e NBOH na forma de folhas de papel absorvente destinadas à administração sublingual.

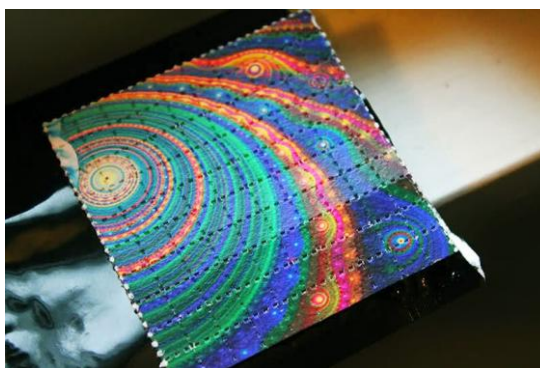
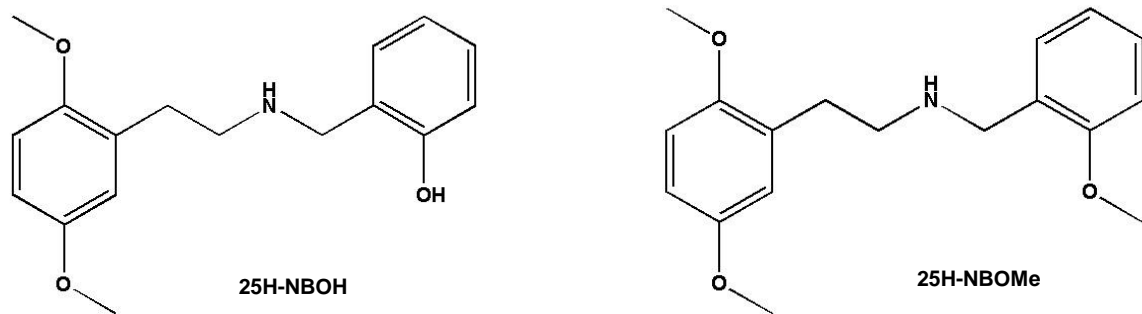


Figura 9 – Estruturas químicas das drogas 25H-NBOH e 25H-NBOMe.



Fonte: autora, 2019.

1.5 Técnicas e métodos empregados para avaliar a interação DNA-ligante

Ao longo dos últimos anos, muitas pesquisas estão abordando a interação ligante-DNA, para isso, diversas técnicas instrumentais podem ser empregadas tanto para avaliar os efeitos desta interação na estrutura do DNA, quanto para caracterizar a natureza do complexo formado. Dentre elas, tem-se espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-visível, fluorescência molecular, microscopia de força atômica (MFA), técnicas eletroquímicas, ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de absorção no infravermelho (IV), medidas de viscosidade, calorimetria, dicroísmo circular, espectrometria de massas, eletroforese, difração de raios-X e espectroscopia Raman. (SIRAJUDDIN, ALI; BADSHAH, 2013).

No presente trabalho, foram utilizadas as técnicas espectroscópicas de fluorescência molecular e absorção molecular na região do UV-vis, para avaliação da interação de ligante-DNA. Possibilitando o cálculo dos valores das constantes de interação, parâmetros termodinâmicos, número de sítios de ligação (estequiometria), além de caracterizar o modo de ligação do ligante com o DNA.

1.5.1 Espectroscopia de absorção molecular no UV-visível

A espectroscopia de absorção molecular no UV-visível é uma técnica relativamente simples, porém eficaz, portanto é amplamente utilizada para avaliar a formação de complexos supramoleculares entre o ligante e a macromolécula. Dessa forma, faz-se a avaliação tanto da estabilidade do DNA quanto da sua interação com

ligantes (REHMAN, et al., 2015a). A avaliação da formação do complexo com o DNA pode ser feita por meio das mudanças espectrais no máximo de absorção da molécula, na presença e ausência do DNA. Assim, a aplicação dessa técnica para avaliação da interação de ligantes com DNA mostra variações mais acentuadas quando as moléculas em estudo absorvem radiação na região visível (REHMAN et al., 2015; AFRIN et al., 2017; AHMAD; AHMAD, 2018).

Geralmente, o espectro de absorção do DNA mostra uma banda característica com comprimento de onda de máxima absorção em 260 nm na região do UV, que corresponde aos grupos cromóforos das pirimidinas (citosina e guanina) e purinas (adenina e guanina), sendo eles os responsáveis pelas transições eletrônicas. A aplicação desta técnica permite a determinação da concentração molar do DNA de acordo com a lei de Beer- Lambert, utilizando a medição do valor de absorvância em 260 nm. Além disso, é possível avaliar a pureza do DNA, empregando a razão das absorvâncias A_{260}/A_{280} ou A_{260}/A_{230} , onde o valor deve estar entre 1,8-2,0, garantindo que o DNA esteja suficientemente livre de proteínas (SAVARIZ, et al., 2014).

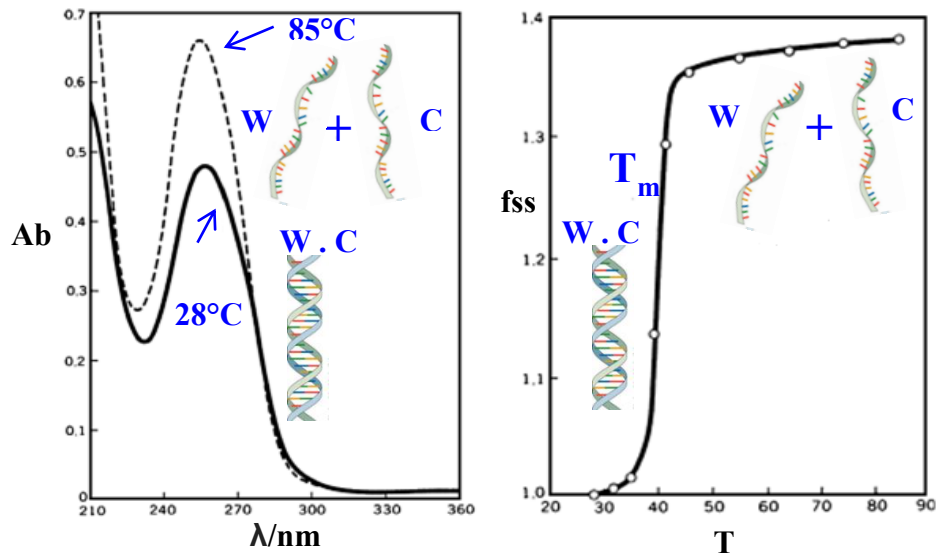
Quando a ligação entre ligante e DNA é via intercalação ocorrem variações na intensidade de absorção (hipocromismo) junto ao deslocamento no comprimento de onda para o vermelho (mudança batocrômica). Mas, se o modo de ligação for via *groove*, a variação da intensidade é desprezível e apenas são observados os efeitos hipocrômico e hiperocrômico (RAHMAN et al., 2017; AHMAD; AHMAD, 2018).

1.5.2 Estudos de desnaturação térmica

Para avaliar a estabilidade do DNA ao interagir com ligantes, é possível realizar estudos utilizando a medição da absorção no UV-vis em função da variação de temperatura. A dupla hélice do DNA é considerada estável devido as ligações de hidrogênio e interações de empilhamento entre as bases. Porém, a dupla hélice pode dissociar em duas fitas simples devido ao enfraquecimento das forças de ligação com o aumento da temperatura, essas fitas simples se encontram em conformação espiral aleatória. Dessa forma, a interação entre as bases será menor, aumentando assim, a absorção da radiação eletromagnética da solução de DNA (Figura 10a), pois as bases estão na sua forma livre e não formam ligações de hidrogênio com suas bases complementares. Isso faz com que a absorvância para o

DNA de cadeia simples seja aproximadamente 40% maior do que para o DNA de cadeia dupla com a mesma concentração. (ARJMAND, JAMSHEERA, 2011).

Figura 10- Perfil espectral do DNA em função da temperatura. a) Espectro de absorção do DNA a 28°C (DNA Watson-Crick) e 85 °C (separação das fitas); b) Curva de desnaturação do DNA.



Fonte: adaptado de NAKAMOTO; TSUBOI; STRAHAN, 2008.

Estudos de desnaturação térmica são feitos para avaliar o modo de ligação de moléculas pequenas com o DNA. Como já foi mencionado, com o aumento da temperatura do meio, a dupla hélice do DNA é desnaturada com a formação de cadeias simples. Isso causa uma alteração da absorvância da solução em 260 nm. A temperatura em que uma amostra de DNA está 50% na forma de fita dupla e 50% na forma de fita simples é denominada temperatura de desnaturação (T_m), associada fortemente com a estabilidade da dupla hélice (Figura 10b) (NAKAMOTO; TSUBOI; STRAHAN, 2008). Para avaliar o modo de ligação de pequenas moléculas com o DNA, calcula-se o T_m na ausência e na presença do ligante, empregando a seguinte equação:

$$f_{ss} = (A - A_0)/(A_f - A_0) \quad \text{EQUAÇÃO (1)}$$

no qual f_{ss} corresponde a fração de DNA como fita simples, A_0 e A_f representam os valores de absorvância mínimo (DNA em fita dupla) e máximo (DNA em fita simples) a 260 nm, respectivamente (SHEN, et al., 2011). T_m é definida quando f_{ss} corresponde a 0,5. Nesse sentido, o valor de T_m pode ser obtido representando

graficamente f_{ss} versus a temperatura.

Ocorre um aumento na temperatura de desnaturação do DNA acima de 5°C ($\Delta T_m > 5$) quando o modo de interação com DNA é via intercalação, (SUN, et al., 2014). Isto acontece devido ao aumento da estabilidade da dupla hélice do DNA consequente da intercalação do ligante no interior da cadeia. Porém, quando a molécula não interage via intercalação, interagindo via *groove* por exemplo, não é observado aumento no valor de T_m (SARWAR, et al., 2015).

1.5.3 Espectroscopia de fluorescência molecular

A espectroscopia de fluorescência molecular é uma das técnicas mais amplamente exploradas para compreender a interação entre ligantes e o DNA. As vantagens da fluorescência molecular comparada às demais técnicas espectroscópicas, são a sua alta sensibilidade, seletividade e rapidez. Essa técnica pode fornecer informações importantes sobre a formação do complexo, como o mecanismo de *quenching*, distâncias intermoleculares, modo de ligação, parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG), constante de ligação, sítios de ligação (estequiometria) (AFRIN et al., 2017; RAHMAN et al., 2017).

Geralmente, compostos que possuem grupos funcionais aromáticos apresentam fluorescência intensa. Uma vez que o DNA não apresenta fluorescência, a avaliação do potencial de ligação ao DNA é estudada com base nas mudanças do sinal analítico do ligante na presença de concentrações variáveis de DNA. Logo, essas mudanças no sinal são relacionadas ao ligante livre ou ao complexo formado com o DNA (REHMAN et al., 2015).

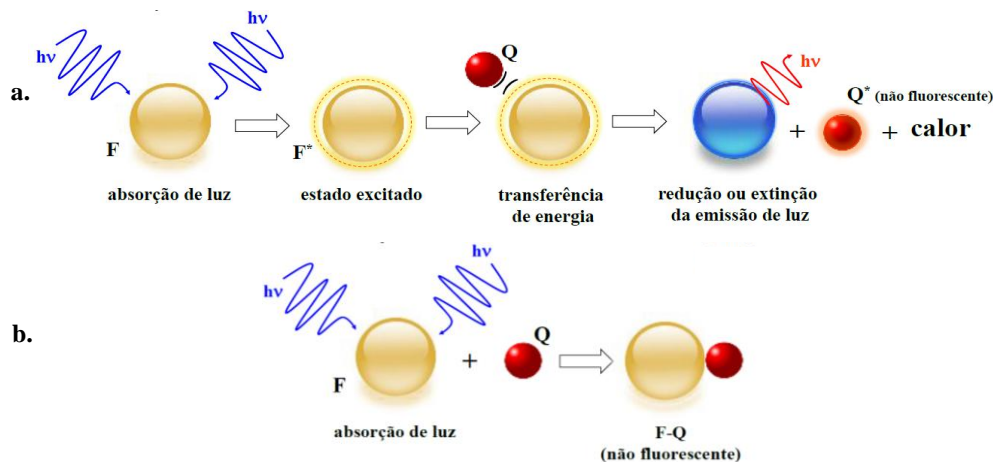
1.5.3.1 Mecanismo de *quenching*

O processo de *quenching* está relacionado ao mecanismo no qual uma espécie fornece uma via alternativa para o fluoróforo de retornar do estado excitado ao estado fundamental, ou seja, ocorre supressão/extinção do sinal de fluorescência

de um fluoróforo por uma molécula desativadora, denominada *quencher*, por uma variedade de interações moleculares. (AFRIN et al., 2017). Estes incluem reações do estado excitado, formação do complexo do estado fundamental, rearranjos moleculares, transferência de energia ou por extinção colisional. A supressão de sinal pode ser induzida por processo dinâmico ou estático (LAKOWICZ, 2006). Neste trabalho, a molécula que atua como *quencher* é o DNA, pois este não fluoresce, e em solução com o ligante avaliado leva à diminuição do sinal analítico.

Há diversos mecanismos associados ao processo de *quenching*, os mais comuns, são: *quenching* dinâmico (colisional) ou estático (Figura 11), mas existem casos onde ambos mecanismos podem ocorrer. O *quenching* estático refere-se ao processo em que há formação de um complexo não-fluorescente no estado fundamental, no qual o fluoróforo no estado excitado entra em contato com o *quencher*, levando à formação de um complexo não-fluorescente (F–Q) no estado fundamental, resultando na desativação radioativa do fluoróforo, liberação de calor, resultando também na redução do sinal analítico. Por outro lado, no *quenching* dinâmico há um mecanismo momentâneo e ocorre quando o fluoróforo, em seu estado excitado, entra em contato, por colisão, com a espécie *quencher*, resultando na desativação radioativa do fluoróforo, ocorrendo transferência de energia do fluoróforo no estado excitado para a espécie *quencher*, e conseqüentemente à diminuição no sinal (ZHANG et al., 2009; DESPAIGNE et al., 2014; MOLINA-BOLÍVAR, et al., 2014).

Figura 11. Representação do processo de quenching **a)** dinâmico **b)** estático.



Fonte: adaptado de SILVA, 2016.

O tipo desse mecanismo pode ser estudado através de titulações fluorimétricas em diferentes temperaturas. Caso ocorra o modo *estático*, o aumento da temperatura (T), ocasionará redução do valor da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) ou seja, essas variáveis serão inversamente proporcionais, pois com o aumento da temperatura o complexo formado tende a desestabilizar, reduzindo assim o valor da constante. De forma contrária, o modo *dinâmico*, o valor de K_{SV} , será diretamente proporcional à temperatura, uma vez que o número de colisões aumenta quando a temperatura se eleva (MOLINA-BOLÍVAR et al., 2014).

O mecanismo *quenching* pode também ser avaliado por meio da técnica de absorção molecular no UV-vis, avaliando os espectros do DNA, do composto livre e do complexo formado. Quando o valor de absorção do complexo é igual a somatória da absorção do DNA mais o composto ($A_{\text{complexo}} = A_{\text{composto}} + A_{\text{DNA}}$), tem-se um *quenching dinâmico*, pois este não afeta o estado fundamental da molécula. Porém, se houver mudanças espectrais e nas intensidades do sinal, sendo ($A_{\text{complexo}} \neq A_{\text{composto}} + A_{\text{DNA}}$), indica *quenching estático* (ZHANG et al., 2008).

A alteração na intensidade de fluorescência é, portanto, interpretada através da equação de Stern-Volmer:

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

$$K_q = K_{SV} / \tau_0 \quad \text{EQUAÇÃO (2.1)}$$

em que F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do *quencher*, $[Q]$ é a concentração do *quencher*, K_q é a taxa de extinção biomolecular, τ_0 refere-se ao tempo de vida médio do fluoróforo na ausência do extintor, geralmente igual a 10^{-8} s, e K_{SV} é a constante de extinção de Stern-Volmer, a qual pode ser obtida a partir da linearização da equação (2), onde o coeficiente angular do gráfico F_0/F vs $[Q]$ corresponde ao valor de K_{SV} (RAHMAN et al., 2017; AFRIN et al., 2017). O tipo do mecanismo pode ser avaliado ainda a partir da constante K_q , no qual, valores acima de $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ é indício de que o *quenching* ocorre preferencialmente de modo estático, enquanto valores inferiores a este, é um indicativo de *quenching* dinâmico (RAHMAN et al., 2017; QAIS et al., 2017).

1.5.3.2 Constantes de ligação (K_b)

É também possível avaliar a magnitude da interação e a estequiometria do complexo supramolecular formado, por meio da espectroscopia de fluorescência molecular, usando a seguinte equação:

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

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

1.5.3.3 Modos de ligação

As três principais interações não covalentes que desempenham um papel importante na interação composto-DNA, são: interação por intercalação, via *groove* e eletrostática. Para elucidar qual modo de ligação é preferencial em cada interação, utiliza-se alguns métodos analíticos baseados em propriedade de emissão de fluorescência. Assim, o modo de ligação pode ser proposto por exemplo de acordo com duas estratégias: avaliação do efeito de *quenching* do KI e competição com sondas.

1.5.3.3.1 Ensaio com iodeto de potássio (KI)

O teste realizado com iodeto de potássio é normalmente feito, quando a molécula estudada apresenta propriedades de fluorescência. Este ensaio pode indicar o local de interação do ligante com o DNA, podendo acontecer na parte interna ou externa do DNA (REHMAN et al., 2015). Isso acontece, pois, os íons iodeto são capazes de promover *quenching* dinâmico em fluoróforos quando em

solução aquosa, porém, para que isso ocorra, o ligante deve encontrar-se acessível para que interaja com ele. Os íons iodeto são carregados negativamente, então ele será repelido pelo esqueleto de fosfato do DNA se o ligante estiver intercalado à macromolécula, protegido entres os pares de bases nitrogenados. No entanto, caso o modo de ligação seja via *groove* ou eletrostático, o ligante estará mais acessível aos íons iodeto, facilitando a colisão, causando assim, a supressão de fluorescência (REHMAN et al., 2015).

No estudo desse mecanismo, faz-se a análise quanto a acessibilidade do fluoróforo ao *quenching* KI. Dessa forma, é necessário usar a equação de Stern-Volmer (K_{sv}) que indica a acessibilidade do íon iodeto ao fluoróforo, na ausência e presença de DNA, comparando os valores de K_{sv} da solução de ligante com KI na presença e ausência do DNA. Portanto, para interação via intercalação os valores de K_{sv} costumam ser menores na presença do DNA, enquanto que para ligação via *groove* ou eletrostático geralmente esses valores são maiores (REHMAN et al., 2015).

1.5.3.3.2 Ensaio de competição

O modo de ligação DNA-ligante pode ser avaliado ainda a partir do uso de sondas fluorescentes. Dessa forma, geralmente é feito o teste de deslocamento competitivo usando sondas fluorescentes que possuem seu modo de ligação ao DNA já bem definido. Assim, as mudanças na emissão de fluorescência do complexo sonda-DNA são interpretadas (REHMAN et al., 2015). Nesses experimentos são empregados ligantes que possuem seu modo de ligação bem estabelecido, como acridina orange e brometo de etídio, que são sondas intercalantes e DAPI e Hoechst 33258, sondas usadas para interação via *groove*.

O brometo de etídio (EB – *ethidium bromide*) é muito utilizado como uma sonda fluorescente que interage com o DNA *via* intercalação. Na sua forma livre apresenta baixa emissão de fluorescência, porém, ao intercalar com DNA, ocorre um aumento relevante da intensidade de fluorescência. Quando o ligante avaliado possui o mesmo modo de ligação com DNA, ao adicioná-lo ao sistema DNA-EB, pode levar ao deslocamento do EB intercalado, ocasionando uma diminuição na

intensidade de fluorescência, pois parte do EB estaria na forma livre (SAVARIZ, et al., 2014). Para determinar a magnitude da intercalação entre o DNA e o ligante pode ser usado o grau na redução do sinal de fluorescência. Mas, ligantes que se ligam preferencialmente *via groove* ou eletrostático, não causam nenhum efeito sobre o sinal analítico do complexo formado entre o brometo de etídio e o DNA. A acridina orange (AO) também é bastante utilizada nos ensaios de competição como sonda intercalante, por ter um comportamento similar ao brometo de etídio (REHMAN, et al., 2015b).

Esses ensaios de competição podem ser realizados também utilizando sondas que interagem *via groove* com o DNA, como DAPI e Hoechst 33258, semelhante ao que foi descrito para o EB, ligantes com o mesmo modo de ligação dessas sondas, são capazes de deslocá-las dos sulcos do DNA, levando à redução no sinal de fluorescência, podendo determinar a magnitude da interação entre o DNA e o ligante (BASU; KUMAR, 2013).

Embora a maioria dos corantes de ligação ao sulco estudados se liguem no sulco menor do DNA, o *Methyl Green* (MG) parece ser uma exceção. O MG é um corante trifenilmetano que tem sido utilizado para análise bioquímica da degradação do DNA. Liga-se ao DNA, mas não ao RNA, de maneira não-intercalante, interagindo com o sulco maior e apresentando ligação preferencial para regiões ricas em AT. O MG na sua forma livre apresenta baixa emissão de fluorescência, porém, ao se ligar ao DNA, ocorre um aumento relevante da intensidade de fluorescência, dessa forma, ligantes com o mesmo modo de ligação do MG, são capazes de deslocá-lo dos sulcos do DNA, levando à redução no sinal de fluorescência, podendo determinar a magnitude da intercalação entre o DNA e o ligante (PRIETO et al., 2014).

1.5.3.4 Parâmetros termodinâmicos

A espectroscopia de fluorescência pode ser utilizada também para determinar parâmetros termodinâmicos envolvidos nas interações ligante-DNA. Forças de van

der Waals, ligações de hidrogênio interações hidrofóbicas e eletrostáticas são as principais interações não covalentes, com funções muito importantes na interação DNA-ligante. Esses parâmetros termodinâmicos fornecem informações necessárias para compreender as forças moleculares responsáveis pela formação do complexo DNA-ligante. Realizando ensaios com temperaturas diferentes, é possível calcular variação de entropia (ΔS) e entalpia (ΔH) aplicando a equação de *Van't Hoff* (equação 4) (HAQ, 2002).

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

em que K_b representa a constante de ligação, R a constante do gás ideal ($8,314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e T a temperatura em Kelvin (K). Já para avaliar a espontaneidade da reação é calculada a variação da energia livre de Gibbs, usando as equações representadas abaixo: (HAQ, 2002; REHMAN et al., 2015)

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

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

Normalmente, quando a interação macromolécula-ligante acontece, preferencialmente, por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, o processo está associado a $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$, caso ocorra por forças eletrostáticas, tem-se $\Delta H < 0$ (ou $\Delta H \approx 0$) e $\Delta S > 0$, enquanto que interações hidrofóbicas são consideradas a força majoritária quando $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ (SUN et al., 2014; REHMAN et al., 2015).

1.6 *Docking* molecular

Docking molecular é um processo computacional que busca prever ligações não-covalentes entre uma molécula (ligante) em complexo com uma macromolécula (DNA/receptor) (TROTT, OLSON, 2009). Para que haja sucesso no procedimento de

docking proteína-ligante, é necessário levar em consideração a geometria, conformação e propriedades eletrônicas das duas moléculas (WEAVER, DONALD, 2005). Uma das características mais relevantes no cálculo de *docking* molecular é a capacidade dele de reproduzir a orientação (posição) experimental de ligantes em comparação aos modos de ligação que se observa em complexos com estrutura já resolvida (RODRIGUES et al., 2012).

Existem diversos *softwares* disponíveis que realizam o *docking* molecular e utilizam diferentes metodologias, tais como: AutoDock Vina (TROTT, OLSON, 2009), BetaDock (KIM et al., 2011), Gold (Genetic Optimisation for Ligand Docking) (Jones et al., 1995, 1997) etc. Os protocolos de *docking* podem ser descritos como uma combinação de algoritmos de busca e função de *score* (MUEGGE, RAREY, 2001). Os algoritmos de busca, geralmente consistem de um conjunto de parâmetros e regras que são utilizadas com o objetivo de analisar a flexibilidade dos ligantes em simulações de *docking* molecular (RODRIGUES et al., 2012). Enquanto, que as funções de *score* são empregadas com o intuito de estimar a afinidade de uma determinada orientação do ligante no sítio de ligação (HIRST, 1998), facilitando assim, a separação entre possíveis ligantes e moléculas não-ligantes. A função *score* pode ser determinada a partir de diversos termos relacionados à propriedades físico-químicas específicas tais como, ligações de hidrogênio (Hbond), interações de van der Waals (vdW) e entropia (entr) (GUEDES, 2014).

A estratégia básica do *docking* molecular é analisar as possíveis conformações de um ligante que é inserido no sítio de uma macromolécula alvo. Portanto, os estudos de *docking* molecular são muito importantes nos estudos de interação DNA-ligante, pois permite prever os tipos de interação, além de definir o sítio de interação.

2 JUSTIFICATIVA

Diante do que foi explanado, fica clara a importância de estudos de interação com o DNA utilizando estratégias/técnicas associadas à determinação de parâmetros de ligação e termodinâmicos, bem como o seu modo de ligação. Portanto, considerando a ausência de dados na literatura relacionados aos efeitos

tóxicos de 25H-NBOH e 25H-NBOMe e por se tratar de um trabalho inédito, este trabalho pretende colaborar com a população e comunidade científica, no sentido de avaliar a interação entre essas drogas com o DNA e assim esclarecer possíveis efeitos tóxicos dessa classes de drogas ilícitas empregando técnicas espectroscópicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a interação de 25H-NBOH e 25H-NBOMe com ctDNA (*Calf thymus*) utilizando técnicas espectroscópicas e estudos teóricos para determinar os parâmetros de ligação e termodinâmicos, modo de ligação e alterações na estrutura do DNA e correlacionar com possíveis efeitos genotóxicos.

3.2 Específicos

- Determinar os principais parâmetros de ligação e termodinâmicos entre 25H-NBOH e 25H-NBOMe com ctDNA (*Calf thymus*) por fluorescência molecular em condições fisiológicas simuladas;
- Avaliar o processo de interação por espectrofotometria de absorção molecular no UV-vis para o sistema 25H-NBO e 25H-NBOMe com ctDNA;
- Determinar o modo de ligação DNA-ligante, empregando ensaios com o iodeto de potássio e estudos de competição com sete sondas que possuem modo de marcação estabelecido;
- Realizar estudos de espectroscopia por ressonância magnética nuclear de H entre 25H-NBOH e 25H-NBOMe com DNA;
- Realizar estudos de *docking* molecular do complexo 25H-NBOH e 25H-NBOMe com DNA.

4. EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados nos ensaios são de grau analítico de pureza. As soluções foram preparadas com água ultrapura com resistividade específica de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, a partir de um sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA).

Para o preparo da solução do DNA (*Calf thymus*, *ctDNA*) tipo I na forma de fibras (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), foram pesados entre 1,0-2,0 mg (SHAHABADI; MOGHADAM, 2012) do ácido nucleico e solubilizou-se em tampão Tris (10 mM, pH = 7,40) contendo NaCl (100 mM). A solução foi armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração a 4°C. Após 24 h, foram levadas a um banho de ultrassom (Quimis modelo Q335D, Brasil), por 30 min, para garantir uma melhor solubilidade do DNA e conseqüentemente a homogeneidade da solução (SAVARIZ, et al., 2014).

A solução de NaCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ empregada para ajuste da força iônica foi preparada a partir da dissolução de 1,1688 g de cloreto de sódio (Vetec) em água ultrapura, transferiu-se a mesma para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água ultrapura.

Para o preparo da solução tampão Tris (10 mM, pH = 7,40) pesou-se 0,24228 g de Tris (Sigma) e solubilizou-se em água ultrapura. Retirou-se uma alíquota de 25 mL da solução de NaCl ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e adicionou-se à solução tampão. O ajuste do pH para 7,40 foi realizado com uma solução de HCl. Em seguida, transferiu-se a mistura para um balão volumétrico de 200 mL.

Como já mencionado, as drogas sintéticas 25H-NBOH e 25H-NBOMe foram empregadas para os estudos de interação com o *ctDNA*. Essas drogas foram cedidas pelo Prof Ângelo de Fátima do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, que possui a licença da polícia federal para trabalhar com essas drogas ilícitas. Para o preparo da solução estoque destes compostos, pesou-se 1,0 mg e solubilizou-se em 2,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Após o preparo, as soluções estoques foram armazenadas em tubo criogênico (2 mL), sob refrigeração a 4°C.

Para o preparo da solução de tiosulfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pesou-se 0,1581 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Synth), com posterior solubilização em água ultrapura para 10

mL.

Para o preparo da solução estoque de KI ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$), pesou-se 2,4900 g de KI (Sigma) e solubilizou-se em água ultrapura. Retirou-se uma alíquota de 2,5 mL da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e adicionou-se à solução de KI e a solução final foi avolumada para 50 mL com água ultrapura.

Para o preparo da solução estoque de brometo de etídio (2,0 mM) foi pesado 0,0016 g do brometo de etídio (Sigma) e solubilizado com água ultrapura em tubo criogênico (2,0 mL). Para o preparo da solução estoque de acridina orange (2,0 mM) foi pesado 0,0012 g da acridina (Sigma) e solubilizado em água ultrapura (2,0 mL). Para o preparo da solução estoque de Hoechst (1,8 mM) foi pesado 0,0100 g de hoechst (Sigma) e solubilizado em água ultrapura (10 mL). Para o preparo da solução estoque de DAPI (0,8 mM) foi pesado 0,0009 g e solubilizado em água ultrapura (3,0 mL). Para o preparo da solução estoque de tiazol orange (2,0 mM) foi pesado 0,0018 g e solubilizado em água ultrapura (2,0 mL). Para o preparo da solução estoque de berberina (2 mM) foi pesado 0,0021 g e solubilizado em água ultrapura (2,0 mL). Todas as diluições posteriores foram realizadas no tampão utilizado.

No preparo da solução de *methyl green* (1,64 mM) foi pesado 0,0100 g para 5 mL de água ultrapura, em seguida, é exaustivamente extraído para remover impureza *violet* cristal usando clorofórmio.

4.2 Equipamentos utilizados

Nos estudos de interação empregando 25H-NBOH, as medidas espectrofluorimétricas foram realizadas em um espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) equipado com uma lâmpada de xenônio de 150 W, utilizando uma cubeta de quartzo com capacidade de 4 mL e 1,0 cm de caminho óptico.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) de duplo feixe equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e capacidade de 4 mL.

Para 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 eletrônica Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de 0,1 mg e balança analítica Mettler Toledo-AG245 com precisão de 0,01 mg. Para estudos de RMN foi utilizado o espectrômetro de RMN Bruker Avance 600MHz.

4.3 Procedimentos

4.3.1 Determinação da concentração do ctDNA (*Calf thymus*)

A concentração da solução estoque de ctDNA foi determinada com base no coeficiente de extinção de 6600 L mol^{-1} a partir do sinal de absorvância em 260 nm após diluição na proporção de 1:100. Para avaliar a pureza da solução de ctDNA, calculou-se a razão do sinal de absorvância em 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), obtendo valores entre 1,8-1,9 (SAVARIZ, et al., 2014).

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

O estudo da interação entre o ctDNA e o composto 25H-NBOH foi realizado por meio de titulações espectrofluorimétricas com base no monitoramento do sinal de emissão do analito, onde se manteve constante a concentração do ligante ($7,5 \mu\text{M}$) e aumentou, gradativamente, a quantidade de ctDNA ($0 - 250 \mu\text{M}$). Para o estudo no UV-Visível, levou-se em consideração o sinal de absorvância do composto na concentração de $20 \mu\text{M}$ na presença e na ausência de ctDNA ($0 - 20 \mu\text{M}$), assim como a absorvância do DNA na forma livre na concentração de $20 \mu\text{M}$. Após o tempo de incubação (60 min) as medidas analíticas foram realizadas à temperatura ambiente.

4.3.3 Estudo realizado com iodeto de potássio (KI)

Para avaliar o modo de ligação dos compostos com ctDNA, manteve-se constante a concentração dos compostos 25H-NBOH e 25H-NBOMe ($7,5 \mu\text{M}$) e

variou-se a concentração de iodeto de potássio ($0,005 - 0,15 \text{ mol L}^{-1}$) na presença e ausência de ctDNA em concentração fixa (50 e $100 \text{ }\mu\text{M}$).

4.3.4 Ensaio de competição com brometo de etídio (BE), acridina orange (AO), DAPI, tiazol orange (TO), berberina e Hoechst (HO)

O estudo de competição com BE, AO, DAPI, TO, berberina e HO foi realizado mantendo constante a concentração do ctDNA ($10 \text{ }\mu\text{M}$) e das sondas BE, AO, DAPI, TO e HO ($1 \text{ }\mu\text{M}$), exceto para berberina ($5 \text{ }\mu\text{M}$) com a concentração do ctDNA ($50 \text{ }\mu\text{M}$), aumentando progressivamente a concentração do composto ($0 - 250 \text{ }\mu\text{M}$).

4.3.5 Ensaio de competição com *methyl green*

No estudo com *methyl green* foi mantida fixa a concentração do composto ($7,5 \text{ }\mu\text{M}$), variando a concentração do ctDNA ($0-200 \text{ }\mu\text{M}$) e na presença e ausência de *methyl green* mantendo constante suas concentrações em 10 e $20 \text{ }\mu\text{M}$.

4.3.6 Avaliação da temperatura de desnaturação

Nos estudos de avaliação da temperatura de desnaturação (T_m) do ctDNA, as amostras foram aquecidas lentamente na faixa de 24 a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ e os valores de absorvância foram monitorados a 260 nm para o ctDNA ($20 \text{ }\mu\text{M}$) na presença e na ausência do composto (20 e $100 \text{ }\mu\text{M}$) (SUN, et al., 2014).

4.3.7 Estudos de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN)

Para o estudo de RMN, a concentração dos compostos foi mantida em 1 mM , enquanto a concentração do ctDNA variou em $0,01$; $0,02$ e $0,04 \text{ mM}$. Foi utilizado tampão fosfato (1 mM). As análises foram realizadas no espectrômetro de RMN Bruker Avance 600MHz .

4.3.8 Estudos de *Docking* molecular

A estrutura da droga foi desenhada usando o Software *MarvinSketch* e, em seguida foram calculadas as conformações 3D. Os modelos moleculares foram otimizados usando método quântico do software *ArgusLab*. A estrutura modelo do DNA foi obtida a partir do *Protein Data Bank* (PDB ID: 1BNA). Os ensaios foram então efetuados usando o software *Autodock vina*.

4.3.9 Tratamento dos dados

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Considerações iniciais

O presente trabalho avaliou a interação de duas drogas alucinógenas sintéticas, 25H-NBOMe e 25H-NBOH com o ctDNA (*Calf thymus*). O ctDNA é uma macromolécula amplamente utilizada para estudos de interações, uma vez que é similar ao DNA de placenta humana, com as seguintes proporções dos pares de bases: para DNA de placenta humana tem AT (58%), CG (42%) e, para ctDNA se tem AT (58,1 %), CG (41,9 %) (SILVA et al., 2016a).

As estruturas químicas dos compostos avaliados estão dispostas na Figura 9 (pág. 25). As moléculas foram sintetizadas e cedidas pelo grupo do Professor Ângelo de Fátima do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

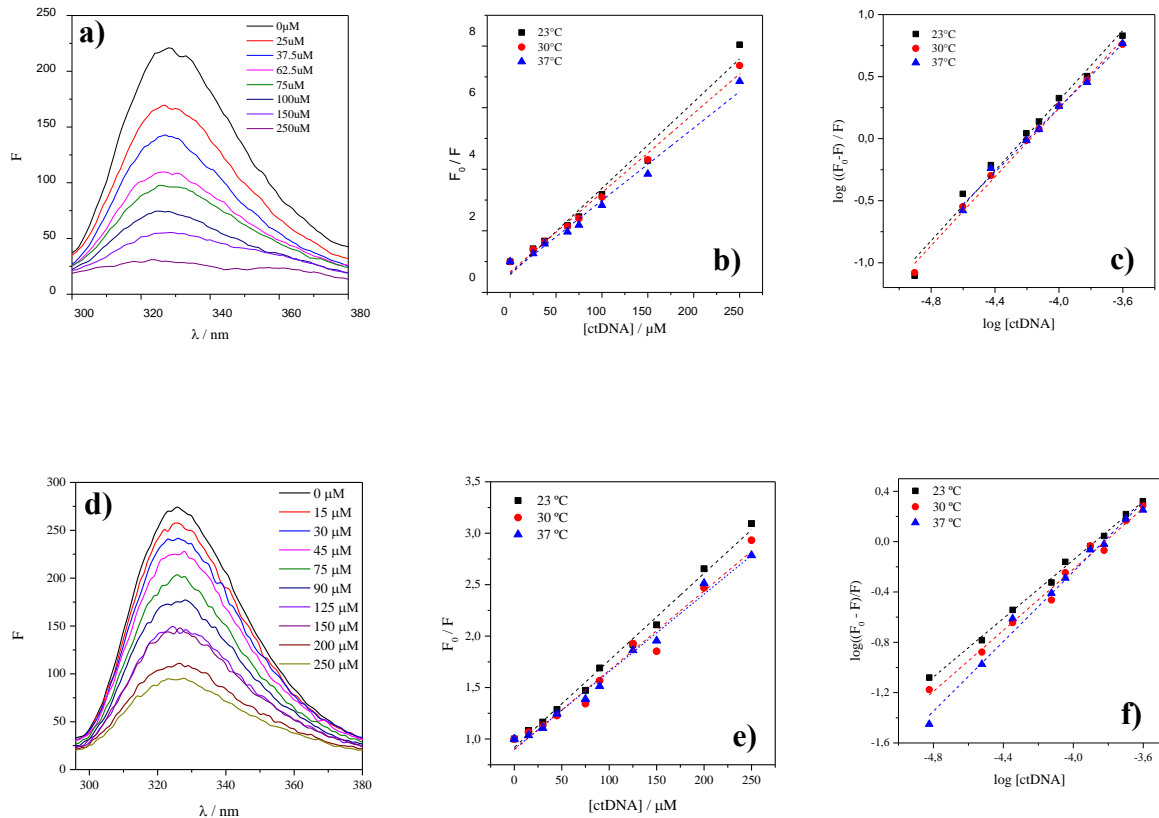
5.2 Avaliação da interação DNA-ligante

Nos estudos empregando fluorescência molecular foi observado que os compostos avaliados apresentaram emissão em 327 nm quando excitados em 260 nm. Portanto, devido esta característica espectroscópica, as drogas sintéticas 25H-NBOMe e 25H-NBOH foram tituladas com *ct*DNA. Ao adicionar quantidades crescentes do *ct*DNA ao sistema, ocorreu uma redução gradual da intensidade de fluorescência intrínseca dos compostos, isto aconteceu devido a diminuição da concentração livre dos mesmos no sistema, indicando que os compostos apresentam interação com o *ct*DNA, formando um complexo supramolecular não fluorescente (SHI, et al., 2015). Nas Figuras 12a e 12d (pág. 43) pode ser observado o perfil espectral obtido para os compostos 25H-NBOMe e 25H-NBOH.

Em razão desta variação na fluorescência intrínseca do composto ao se adicionar quantidades crescentes de *ct*DNA, torna-se possível calcular a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e a constante de ligação (K_b), entre os compostos e a macromolécula (*ct*DNA).

Foi realizado uma titulação fluorimétrica para avaliar a constante de ligação e o número de sítios de ligação (n) do complexo supramolecular formado entre o *ct*DNA e os compostos estudados. Assim, foram utilizadas as equações (2) e (3) para determinar o valor da constante de Stern-Volmer e a constante de ligação, respectivamente. Os valores de K_b e n foram obtidos a partir da curva de $\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[ctDNA]$. Nas Figuras 12b, 12c, 12e e 12f (pág. 43) foi possível observar os perfis das curvas para 25H-NBOH e 25H-NBOMe a partir da linearização das equações (2) e (3), respectivamente. Na Tabela 1 (pág. 44) estão dispostos os resultados obtidos para essa avaliação.

Figura 12 - Resultados obtidos para avaliação da interação DNA-ligante por fluorescência molecular. **a)** Perfil espectral do composto BOH (7,5 μM) com adição de incrementos crescentes de *ct*DNA; **b)** Curva para cálculo da constante Stern-Volmer, K_{SV} , (processo de *quenching*) para BOH; **c)** Curva logarítmica para cálculo da constante de ligação (K_b) e n do complexo *ct*DNA-BOH. **d)** Perfil espectral do composto BOMe (7,5 μM) com adição de incrementos crescentes de *ct*DNA; **e)** Curva para cálculo de K_{SV} para BOMe; **f)** Curva logarítmica para cálculo de K_b e n do complexo *ct*DNA-BOMe. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 10 mM, 100 mM NaCl) a 23, 30 e 37 °C.



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Quando ocorre uma redução da intensidade de fluorescência do ligante na presença de uma macromolécula é um indicativo de que aconteceu alguma forma de interação. Este perfil espectral caracteriza o processo de *quenching*, onde a molécula desativadora (*ct*DNA) interage com o fluoróforo (composto) levando a diminuição da radiação emitida, assim, é preciso que ocorra transferência de energia do ligante para o DNA (WU, et al., 2011). Para a análise deste evento, primeiramente foi calculado a constante de supressão de fluorescência (K_{SV}), que está associada à alteração na intensidade de fluorescência, sendo esta interpretada

por meio da linearização da equação (2), onde o K_{sv} refere-se ao coeficiente angular do gráfico F_0/F vs $[ctDNA]$ (Figura 10) (REHMAN et al., 2015; AFRIN et al., 2017). O perfil espectral linear, indica que o processo de extinção de fluorescência tem apenas um mecanismo de *quenching*, estático ou dinâmico. Assim, para verificar qual mecanismo domina a interação dos compostos com o *ctDNA*, fez-se a avaliação do valor da taxa de extinção biomolecular, K_q , por meio da equação (2.1) (pág. 30). Os valores obtidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Parâmetros de interação do *ctDNA* com os compostos 25H-NBOMe e 25H-NBOH.

Composto	T °C	Parâmetro de Stern-Volmer			Parâmetro de ligação		
		$K_{sv}/ 10^3 \text{ L mol}^{-1}$	r	$K_q/ 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$K_b/ 10^4 \text{ L mol}^{-1}$	r	n
25H-NBOMe	23	$8,46 \pm 0,24$	0,9893	$8,46 \pm 0,01$	$3,21 \pm 0,01$	0,9920	1,41
	30	$7,71 \pm 0,42$	0,9947	$7,71 \pm 0,01$	$4,29 \pm 0,01$	0,9975	1,38
	37	$7,52 \pm 0,28$	0,9913	$7,52 \pm 0,01$	$5,27 \pm 0,01$	0,9969	1,29
25H-NBOH	23	$28,0 \pm 0,17$	0,9893	$28,0 \pm 0,01$	$90,5 \pm 0,01$	0,9920	1,41
	30	$25,7 \pm 0,11$	0,9847	$25,7 \pm 0,01$	$61,7 \pm 0,01$	0,9975	1,38
	37	$23,6 \pm 0,13$	0,9812	$23,6 \pm 0,01$	$27,0 \pm 0,01$	0,9969	1,29

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

É possível observar na Tabela 1 que a interação dos compostos avaliados apresentou valores de K_{sv} variando na faixa de $7,52$ a $28,0 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$, já os valores de K_q variaram na faixa de $7,52$ a $28,0 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, indicando que o mecanismo preferencial de extinção da fluorescência dos compostos pelo *ctDNA* é o *quenching* estático, uma vez que o $K_q > 2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (SILVA et al., 2016a).

Adicionalmente, pôde-se observar que o número de sítios de ligação (n) para os compostos avaliados ficaram aproximadamente igual a 1 (Tabela 1), indicando a razão estequiométrica de 1:1 (*ctDNA*: ligante). Além disso, foi possível avaliar a força da interação DNA-ligante, expressa pela constante de ligação (K_b), onde se observou que esta variou de $3,21 \times 10^4$ a $90,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$. Segundo Wu et al. (2011), valores de K_b na ordem de 10^3 a 10^6 representam uma forte interação entre o composto e o DNA, dessa forma, é possível afirmar que os compostos avaliados interagem fortemente com o DNA. Assim como, o estudo com a dopamina que é um neurotransmissor derivado das feniletilaminas, indicaram que há forte interação entre a dopamina e o DNA, com valores de K_b na ordem de 10^6 L mol^{-1} , com um valor de r de 0,9967 para concentrações de dopamina de $2,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ (LIU et al., 2002).

Por fim, por meio dos estudos termodinâmicos, realizados em três diferentes

temperaturas (23, 30 e 37 °C), foi possível calcular alguns parâmetros termodinâmicos em função da variação de K_b , a partir da linearização da equação de van't Hoff (4) (pág. 34). Com base nestes parâmetros foi possível propor os principais tipos de interações intermoleculares envolvidas na formação do complexo supramolecular DNA-ligante (WANG et al., 2015; QAIS et al., 2017). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros termodinâmicos de interação dos 25H-NBOMe e 25H-NBOH com *ct*DNA.

Composto	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)		
			23°C	30°C	37°C
25H-NBOMe	+27,0	+177,8	-25,01	-27,96	-30,91
25H-NBOH	-65,7	-107,2	-33,94	-33,19	-32,44

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

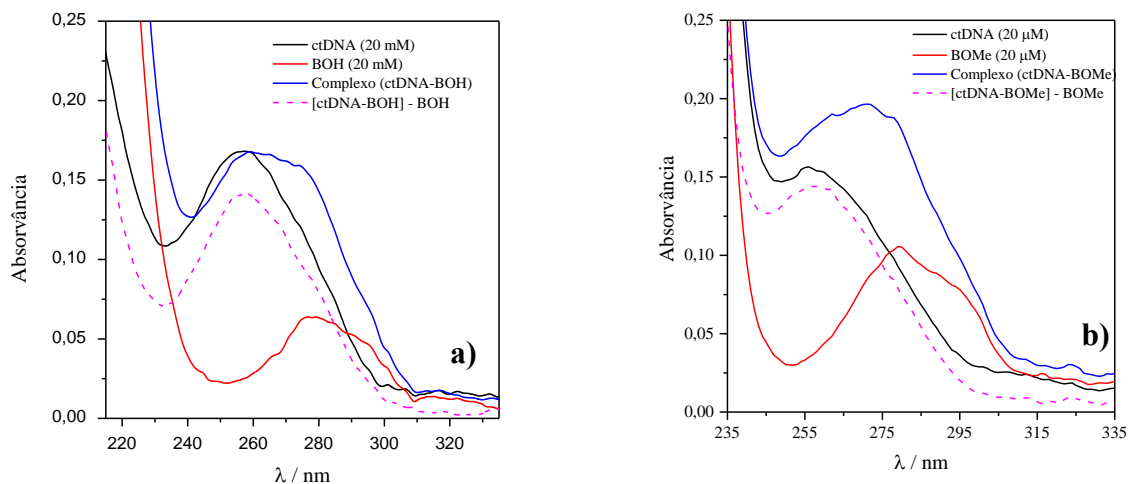
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, pôde-se observar que a interação entre os ligantes 25H-NBOMe e 25H-NBOH com *ct*DNA ocorreu de forma espontânea, visto que, foram obtidos valores negativos para ΔG . Ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals são favorecidas no processo de interação quando $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$; enquanto que forças eletrostáticas quando $\Delta H < 0$ (ou $\Delta H \approx 0$) e $\Delta S > 0$ e interações hidrofóbicas para $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ (Caruso et al., 2012). Dessa maneira, as principais forças associadas à formação do complexo formado entre os compostos avaliados e *ct*DNA são ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals para 25H-NBOH, uma vez que foram obtidos valores de $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$, o que indica uma maior organização no sistema devido às ligações de hidrogênio, fazendo com que as moléculas se posicionem de forma mais ordenada. E forças hidrofóbicas para 25H-NBOMe, uma vez que foram obtidos valores de $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$.

5.3 Estudos por espectroscopia de absorção molecular no UV-vis

A espectroscopia de absorção molecular no UV-visível é uma técnica bastante utilizada na avaliação da interação do DNA-ligante. A formação deste

complexo supramolecular pode ser analisada por meio das mudanças espectrais que ocorrem no máximo de absorção da molécula avaliada, na presença e ausência do DNA (REHMAN et al., 2015; AFRIN et al., 2017; AHMAD; AHMAD, 2018). A Figura 13 apresenta o espectro avaliado, onde os valores de máxima absorção do composto 25H-NBOH (em preto) e do *ctDNA* (em vermelho) estão estabelecidos em 270 e 260 nm, respectivamente. Portanto, quando se adicionou *ctDNA* ocorreu um aumento na absorvância, isto é, um efeito hipercrômico, indicando interação entre o composto com o *ctDNA*, corroborando com os resultados de fluorescência molecular (JANNESARI et al., 2013; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; SILVA et al., 2016).

Figura 13 - Avaliação da interação *ctDNA*-ligante por absorção no UV-vis. **a)** Composto 25H-NBOH (7,5 μM) e *ctDNA* (20 μM); **b)** Composto 25H-NBOMe (7,5 μM) e *ctDNA* (20 μM).



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Ao se realizar estudos por fluorescência molecular, é fundamental a avaliação do tipo de *quenching* dominante no processo de interação, podendo este ocorrer de várias formas, com destaque para o *quenching* dinâmico e estático em estudos de interação com DNA (LAKOWICZ, 2006).

A avaliação do tipo de *quenching* pode ser feita por meio do estudo por UV-Vis com os espectros de absorção do composto livre, do *ctDNA* e do complexo formado (Figura 13). Dessa forma, ao avaliar esses espectros de absorção é possível observar que o valor da absorvância do complexo foi diferente da somatória

da absorção do *ct*DNA mais o composto ($A_{\text{complexo}} \neq (A_{\text{composto}} + A_{\text{ctDNA}})$), caracterizando assim o mecanismo de *quenching* estático. Portanto, $\Delta A \neq A_{\text{complexo}} - (A_{\text{composto}} + A_{\text{ctDNA}}) \neq 0$ (Tabela 3), sendo este um indicativo de que ocorreu alteração no estado fundamental da molécula ocasionado pela formação do complexo (WU et al., 2011; SILVA et. al., 2016b; MARQUES et al., 2018), uma vez que o *quenching* dinâmico só afeta o estado excitado das moléculas e, portanto, não ocasiona mudanças no espectro de absorção.

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

Composto	A_{DNA}	A_{composto}	A_{complexo}	$A_{(\text{DNA} + \text{composto})}$	ΔA^*
25H-NBOH	0,166	0,028	0,167	0,194	0,027
25H-NBOMe	0,156	0,035	0,178	0,191	0,013

* $\Delta A = A_{(\text{DNA} + \text{composto})} - A_{\text{complexo}}$

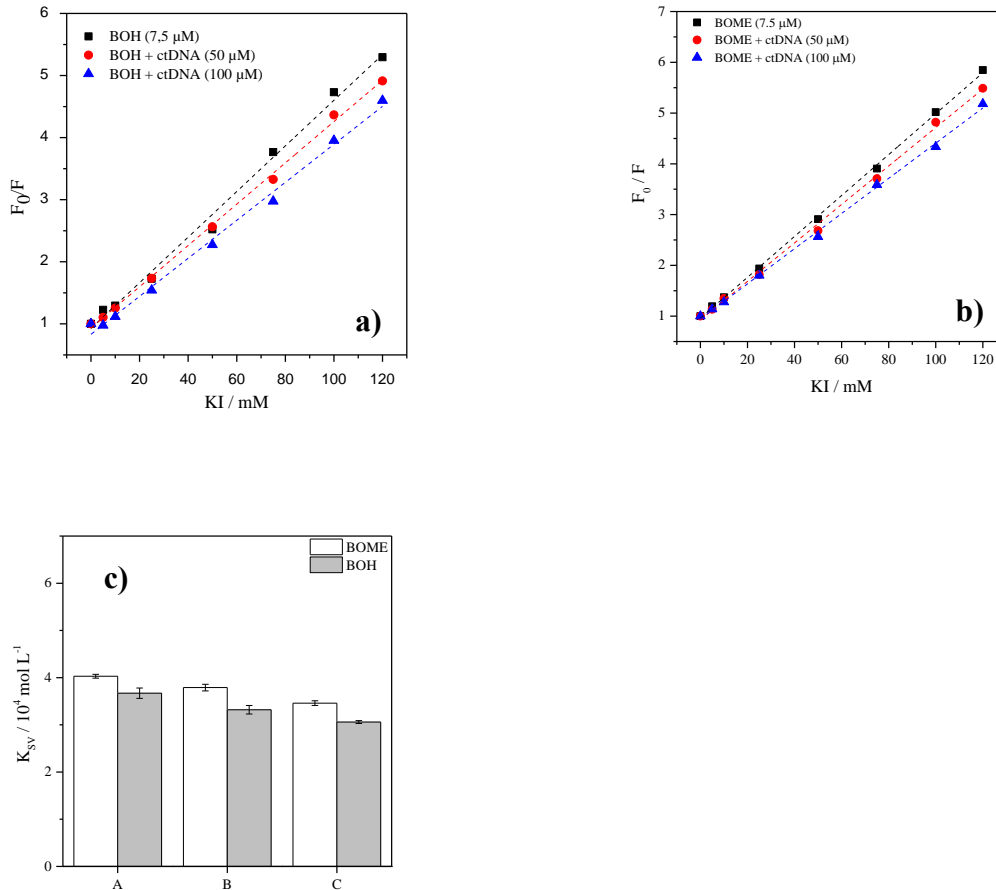
Fonte: elaborado pela autora, 2019.

5.4 Avaliação do modo de ligação composto-*ct*DNA

Os principais modos de ligação não covalente, entre o DNA e pequenas moléculas são três: intercalação, via *groove* e eletrostático. Portanto, o modo de ligação entre os compostos 25H-NBOH e 25H-NBOMe com *ct*DNA foi analisado avaliando o efeito de *quenching* do KI, competição com sondas e perfil espectral da desnaturação térmica (REHMAN, et al., 2015a; SARWAR, et al., 2015).

Para avaliar o mecanismo de ligação por meio do estudo com o iodeto de potássio (KI), verifica-se a acessibilidade do *quenching* KI ao fluoróforo (compostos avaliados). Para isso, é utilizada a equação de Stern-Volmer (equação 2) seguido da comparação dos valores de K_{sv} da condição do ligante com o KI na ausência e presença do *ct*DNA. Os resultados podem ser observados na Figura 14.

Figura 14 – Avaliação do modo de ligação DNA-ligante por meio de ensaios com KI ($0,005 - 0,15 \text{ mol L}^{-1}$). **a)** Gráfico Stern-Volmer (determinação de K_{SV}) na ausência e presença do ctDNA (50 e 100 μM), para o composto **BOH** (7,5 μM). **b)** Gráfico Stern-Volmer na ausência e presença do ctDNA (50 e 100 μM), para o composto **BOMe** (7,5 μM). **c)** Gráfico em barras dos valores de K_{SV} na ausência e na presença de ctDNA para os dois compostos avaliados. A: BOH e BOMe (7,5 μM); B: BOH + ctDNA (50 μM) e BOMe + ctDNA (50 μM) e C: BOH + ctDNA e BOMe + ctDNA (100 μM).

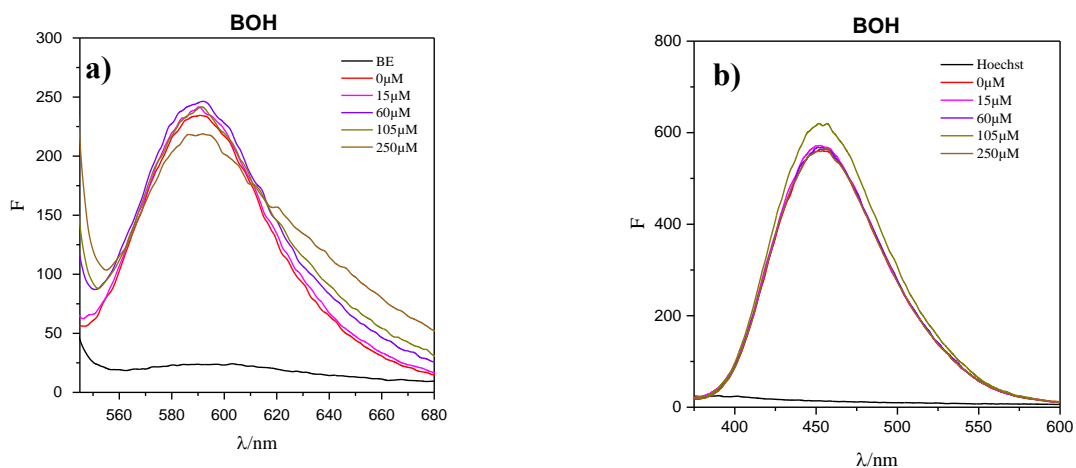


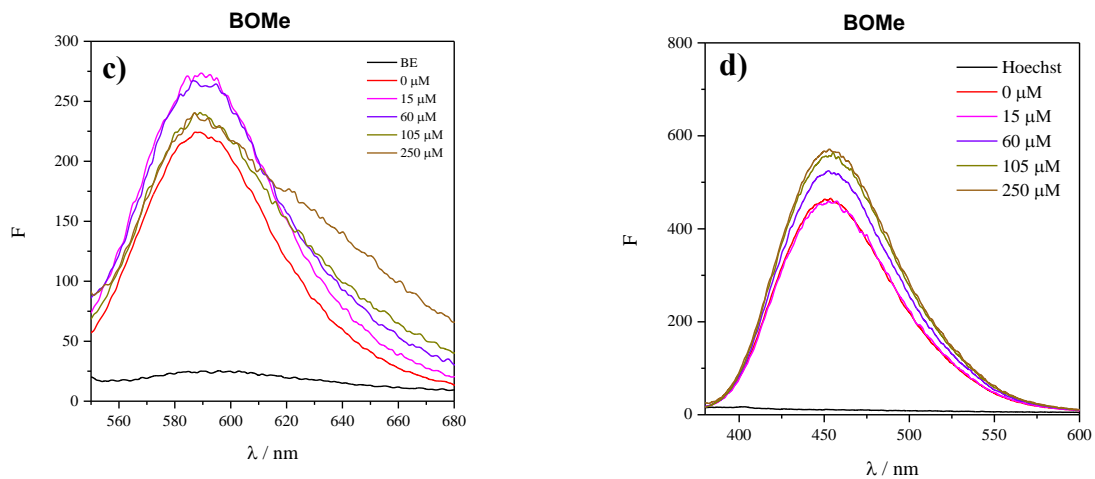
Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Observa-se, portanto, na Figura 14a que, na presença de ctDNA a reta do gráfico apresentou uma inclinação levemente menor (em vermelho e azul), quando comparada ao sistema sem o ctDNA (em preto). Isto indica que o valor de K_{SV} diminuiu na presença do DNA, este comportamento é melhor visualizado no gráfico da Figura 11b. Portanto, observa-se que na presença do ctDNA, os valores da constante de Stern-Volmer, sistematicamente foram menores. Esse perfil é um indício de que o modo de interação ocorre preferencialmente por intercalação, pois a molécula está protegida entre as bases do ctDNA, desta forma, não acessível ao íon iodeto (SARWAR et al., 2015; QAIS et al., 2017). Porém, como o ensaio do KI pode apresentar resultados similares para compostos intercalantes e localizados no *groove*, ensaios adicionais para avaliação do modo de ligação foram necessários.

Outro experimento realizado para avaliar o modo de ligação dos compostos avaliados com o ctDNA consistiu no ensaio de competição com as sondas: brometo de etídio, acridina orange, hoechst e DAPI (pág. 20). Essas sondas na forma livre apresentam baixa emissão de fluorescência, mas quando interagem com o DNA, seja via *groove* menor (hoechst e DAPI) ou intercalação (brometo de etídio e acridina orange), ocorre um aumento considerável da intensidade de fluorescência (Figura 15) (MUKHERJEE; SINGH, 2017; QAIS et al., 2017). Contudo, os compostos avaliados não deslocam nenhuma dessas sondas, portanto, isto é um indício de que a ligação entre os compostos avaliados e o DNA não ocorrem via *groove* menor ou intercalação. Dessa forma, se torna necessário realizar um ensaio de competição com um composto que seja seletivo a região do *groove* maior do DNA.

Figura 15 – Avaliação da intensidade de fluorescência do sistema sonda-ctDNA. **a)** Sonda intercalante, [BE] = 1 μ M, [ctDNA] = 10 μ M e [ligantes] = 15 – 250 μ M na presença do composto **BOH** **b)** Sonda seletiva ao *groove* menor, [Hoechst] = 1 μ M, [ctDNA] = 10 μ M e [ligantes] = 15 – 250 μ M na presença do composto **BOH**. **c)** Sonda intercalante, [BE] = 1 μ M, [ctDNA] = 10 μ M e [ligantes] = 15 – 250 μ M na presença do composto **BOMe** **d)** Sonda seletiva ao *groove* menor, [Hoechst] = 1 μ M, [ctDNA] = 10 μ M e [ligantes] = 15 – 250 μ M na presença do composto **BOMe**.



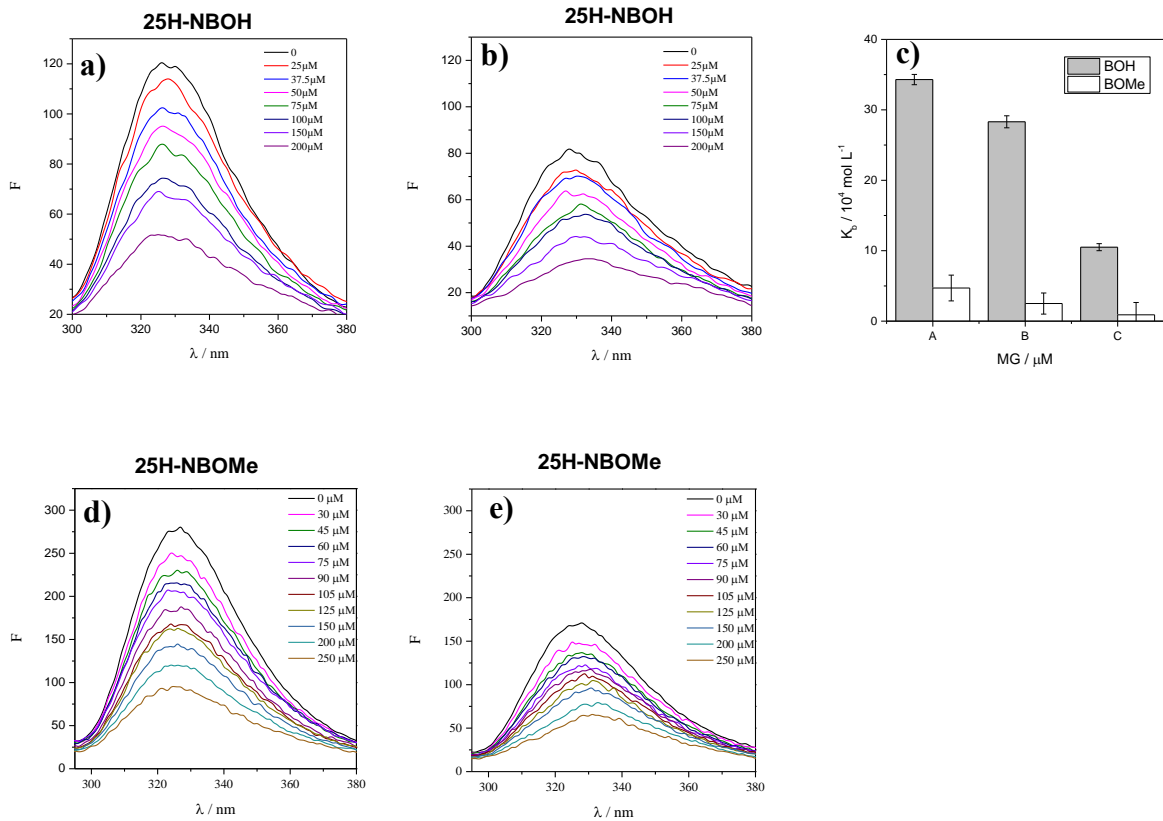


Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Embora a maioria das sondas de ligação ao sulco estudados se liguem no sulco menor do DNA, o *methyl green* (MG) é uma exceção, pois liga-se ao DNA de maneira não-intercalante, interagindo com o *groove* maior. Na sua forma livre apresenta baixa emissão de fluorescência, porém, ao se ligar ao DNA, ocorre um aumento relevante da intensidade de fluorescência. Dessa forma, ligantes com o mesmo modo de ligação do MG, são capazes de deslocá-lo dos sulcos do DNA, levando a redução no sinal de fluorescência, podendo determinar a magnitude da interação entre o DNA e o ligante (PRIETO et al., 2014).

Ao comparar os espectros na Figura 16a e 16b, pôde-se observar que o sinal de fluorescência do complexo *ctDNA*-ligante decai à medida que a concentração do *methyl green* aumenta no sistema. Esse comportamento foi observado para os dois compostos avaliados. Esta redução de sinal acontece quando existe no sistema um ligante que também se liga ao *ctDNA*, diminuindo sua fluorescência. Na Figura 16c, ao comparar os valores de K_b para os sistemas A (sem a presença do *methyl green*), B (10 μM de *methyl green*) e C (20 μM de *methyl green*), é possível observar que com o aumento da concentração de *methyl green* há uma diminuição considerável no K_b , isso indica que o composto avaliado possui o mesmo modo de ligação que o *methyl green* com *ctDNA*. Isto foi observado para os dois compostos avaliados. Dessa forma, o *methyl green* compete pelo mesmo sítio que o ligante, promovendo, assim, a diminuição do K_b , pois ambos se ligam ao *ctDNA* via *groove* maior.

Figura 16 – **a)** Avaliação da intensidade de fluorescência do sistema 25H-NBOH-ctDNA na ausência do *methyl green* **b)** Avaliação da intensidade de fluorescência do sistema 25H-NBOH-ctDNA na presença do *methyl green* (20 μM) **c)** Kb para os sistemas A (sem a presença do *methyl green*), B (10 μM de *methyl green*) e C (20 μM de *methyl green*). **d)** Sistema 25H-NBOMe-ctDNA na ausência do *methyl green* **e)** Sistema 25H-NBOMe-ctDNA na presença do *methyl green* (20 μM) Concentrações: [ctDNA] = 0 - 250 μM , [BOH] = 7,5 μM e [MG] 10 e 20 μM .



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

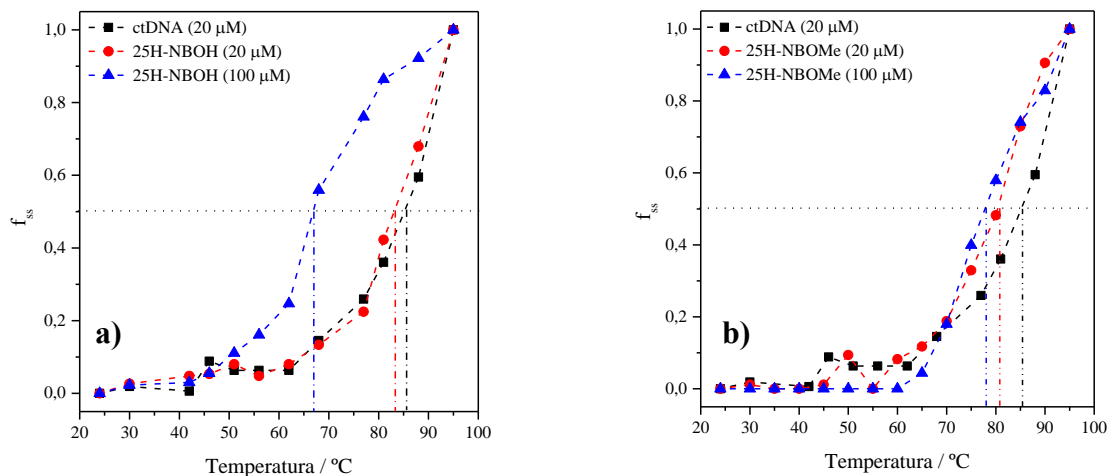
A dupla hélice do DNA é estabilizada pelas ligações de hidrogênio e interações entre as bases. Porém, ela pode se dissociar em fitas simples devido ao enfraquecimento dessas forças de ligação que estabilizam o DNA, decorrente do aumento da temperatura. A temperatura em que uma amostra de DNA está 50% na forma de fita dupla e 50% na forma de fita simples é chamada de temperatura de desnaturação (T_m), é associada com a estabilidade da estrutura da dupla hélice. Quando o modo de interação de um determinado composto com o DNA é via intercalação, ocorre um aumento na temperatura de desnaturação do DNA (T_m) acima de 5°C ($\Delta T_m > 5$) (SARWAR, et al., 2015; SHEN, et al., 2011). Esta variação positiva na temperatura de desnaturação é atribuída ao aumento da estabilidade da dupla hélice do DNA devido a intercalação do ligante no interior da cadeia, entre as bases. Entretanto, quando o composto não interage via intercalação não é

observado esse aumento acima de 5°C no valor de T_m .

Portanto, a ligação dos compostos em estudo com *ctDNA* foi avaliada por meio de ensaios relativos à temperatura de desnaturação do *ctDNA*. Dessa forma, foi calculado o valor de T_m na ausência e na presença dos compostos avaliados e os valores de absorvância foram monitorados em 260 nm, numa faixa de 24-95°C. Para o cálculo do T_m empregou-se a equação 1 (pág. 27).

De acordo com a Figura 17 pôde-se observar que houve variação na temperatura de desnaturação do DNA em relação ao complexo formado, indicando que ocorreram mudanças na estabilidade da estrutura dupla hélice da biomolécula. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para os compostos avaliados.

Figura 17- Curva de desnaturação térmica do *ctDNA* a 260 nm na ausência e na presença dos compostos. a) Para composto BOH. b) Para composto BOMe. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 10 mM, 100 mM NaCl).



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Tabela 4- Resultados referentes ao estudo de desnaturação térmica do *ctDNA* frente aos compostos selecionados.

Sistema	T_m (°C)	ΔT_m ($T_{m\text{-ligante}} - T_{m\text{-ctDNA}}$)
ctDNA (20 μM)	85,3	-
ctDNA + 25H-NBOH (20 μM)	83,2	- 2,1
ctDNA + 25H-NBOH (100 μM)	67,0	- 18,3
ctDNA + 25H-NBOMe (20 μM)	80,7	- 4,6
ctDNA + 25H-NBOMe (100 μM)	77,9	- 7,4

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

De acordo com os resultados obtidos, na ausência dos compostos avaliados observou-se que o valor de T_m correspondeu a 85,3°C, no entanto na presença dos

compostos avaliados, esse valor apresentou um ΔT_m de -18,3 a -2,1. Estes resultados indicam que o modo de ligação dos compostos em estudo com o *ctDNA* não se dá preponderantemente via intercalação ao DNA, visto que, ΔT_m não é maior que 5, confirmando os ensaios anteriores que indicam que a interação entre os compostos avaliados e o *ctDNA* ocorre via *groove* maior.

5.5 Estudos de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN)

Por meio de estudos de RMN de ^1H foi estabelecido o epítipo das moléculas na presença do *ctDNA*. Nas tabelas 5 e 6, é possível observar o deslocamento químico de cada um dos átomos de hidrogênio das moléculas analisadas. Com o auxílio da figura 18a é possível verificar na tabela 5 que os hidrogênios que tiveram mais mudanças no caso do composto 25H-NBOH foram os H-11 e H-13. Enquanto que para o composto 25H-NBOMe, utilizando a figura 18b, é observado na tabela 6 que os átomos de hidrogênio com mais deslocamento foram os H-8 e H-9.

Figura 18 – Estrutura com numeração. **a)** Para o composto 25H-NBOH. **b)** Para o 25H-NBOMe.



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Tabela 5 - Desvio químico de RMN de ^1H (δ) de BOH na ausência e presença de diferentes proporções de *ctDNA*. Condições: BOH (1 mM) e *ctDNA* em tampão fosfato (1 mM) a um pH de 7,4.

Hidrogênio	δ (ppm)				$\Delta\delta^1$
	BOH	BOH: proporção <i>ctDNA</i>			
		100	50	25	
3	7,0245	7,0255	7,0239	7,0228	0,0017
4	6,9413	6,9414	6,9432	6,9382	0,0031
6	6,8778	6,8779	6,8772	6,8781	0,0000
7	2,9678	2,9679	2,9741	2,9603	0,0075
8	3,1834	3,1835	3,1976	3,1651	0,0183
9	4,1243	4,1234	4,1413	4,1011	0,0232
11	6,7966	6,7933	6,8190	6,7568	0,0398
12	7,2675	7,2651	7,2896	7,2468	0,0207
13	6,7966	6,7933	6,8190	6,7568	0,0398
14	7,2022	7,1996	7,2156	7,1783	0,0239
15	3,7908	3,7904	3,7904	3,7901	0,0000
16	3,7815	3,7811	3,7811	3,7838	-0,0023

^1O $\Delta\delta$ foi calculado com base na diferença entre δ (ligante livre) e δ (ligante: *ctDNA* = 25).

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Tabela 6- Desvio químico de RMN de ^1H (δ) de BOMe na ausência e presença de diferentes proporções de *ctDNA*. Condições: BOMe (1 mM) e *ctDNA* em tampão fosfato (1 mM) a um pH de 7,4.

Hidrogênio	δ (ppm)				$\Delta\delta^1$
	BOMe	BOMe: proporção <i>ctDNA</i>			
		100	50	25	
3	7,0338	7,0310	7,0295	7,0266	0,0072
4	6,9463	6,9406	6,9381	6,9338	0,0125
6	6,8510	6,8448	6,8427	6,8394	0,0116
7	2,9356	2,9186	2,9117	2,9025	0,0331
8	3,1097	3,0683	3,0530	3,0331	0,0766
9	4,0921	4,0487	4,0315	4,0106	0,0815
11	7,0177	7,0154	7,0143	7,0130	0,0047
12	7,4495	7,4369	7,4314	7,4247	0,0248
13	7,0510	7,0438	7,0403	7,0364	0,0146
14	7,3082	7,2986	7,2955	7,2902	0,0180
15	3,7434	3,7387	3,7371	3,7367	0,0067
16	3,7434	3,7387	3,7371	3,7294	0,0140
17	3,7914	3,7900	3,7894	3,7886	0,0280

^1O $\Delta\delta$ foi calculado com base na diferença entre δ (ligante livre) e δ (ligante: *ctDNA* = 25).

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

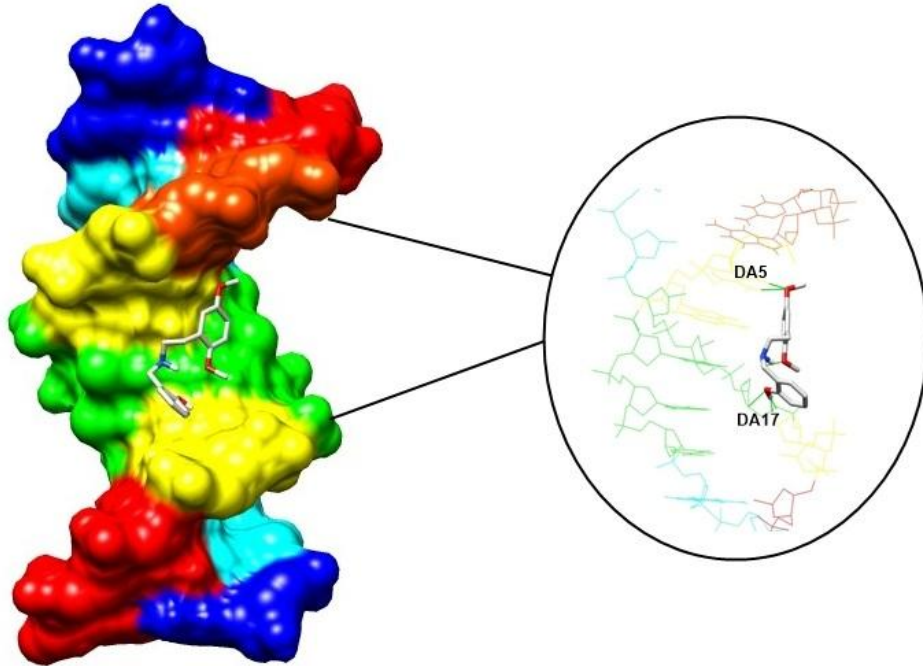
Dessa forma, tanto o 25H-NBOH quanto o composto 25H-NBOMe as regiões contendo o fenol e o grupo amino foram as que mais sofreram deslocamento na presença da macromolécula, o que é um indicativo que essa é a porção da molécula que mais interage com o *ctDNA*, sendo o epítipo da molécula, corroborando com os estudos de fluorescência.

5.6 Estudos de *docking* molecular

O *docking* molecular desempenha um papel importante no processo de interação entre pequenas moléculas e o alvo biológico, uma vez que fornece informações sobre o mecanismo de ligação e a formação de complexo energeticamente favorável (REHMAN, et al., 2015b). Dessa forma, estudos de docagem molecular foram realizados a fim de confirmar os resultados experimentais, prevendo o modo de ligação, bem como a energia de ligação relativa ao complexo formado entre os compostos avaliados e o *ctDNA*.

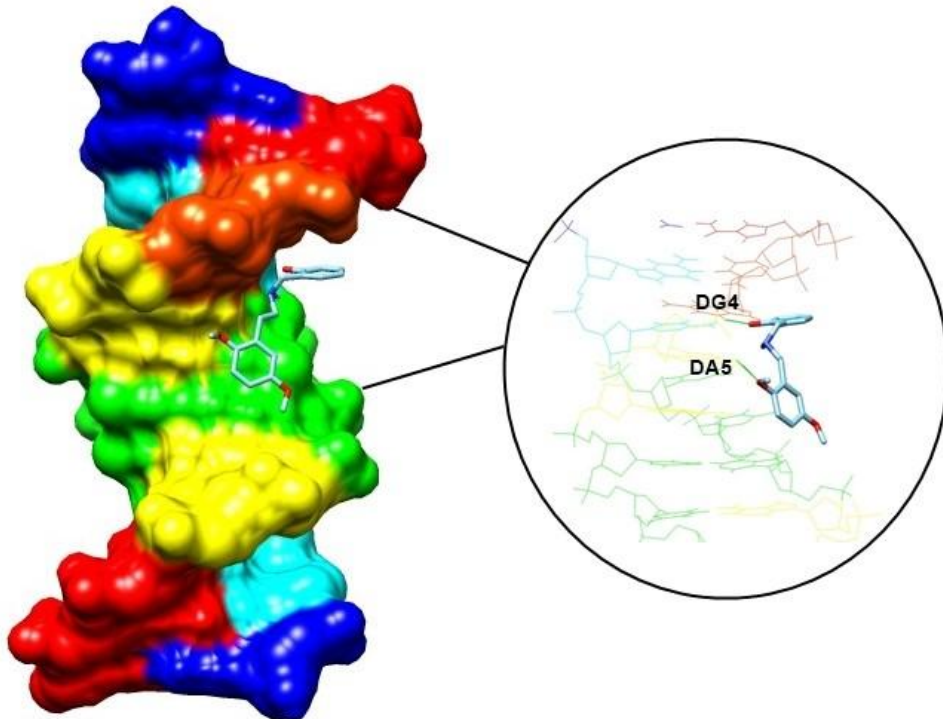
Para os experimentos de *docking* molecular, inicialmente a estrutura de cada composto foi desenhada e submetida à otimização de energia, em seguida, foram importados para a estrutura do DNA para o processo de docagem. Os valores negativos das energias de ligação, -6,8 (**BOH**) e -6,5 (**BOMe**) kcal mol⁻¹, indicaram um maior potencial de ligação dos compostos com o *ctDNA* através de interações não covalentes, ligações de hidrogênio, sendo consistente com os estudos espectroscópicos. Para todos os compostos avaliados por *docking*, foi observado algumas alterações conformacionais nas moléculas após a ligação, e uma preferência para interação via *groove* maior (Figura 19 e 20). Além disso, é possível observar que o composto BOH faz ligações de hidrogênio entre o seu grupo fenol e o resíduo DA17, além disso, faz ligações de hidrogênio também com o resíduo DA5 do DNA, enquanto que o composto BOME faz ligações de hidrogênio com o resíduo DG4 e DA5 do DNA. Esses estudos corroboram com os estudos de RMN, visto que as regiões que sofreram maior deslocamento de hidrogênio são as que fazem de ligação de hidrogênio com o DNA de acordo com os estudos de *docking* molecular.

Figura 19 – *Docking* molecular do composto BOH no DNA. Representação esquemática do composto BOH, que se liga via *groove*. Linha verdes: ligação de hidrogênio.



Fonte: autora, 2019.

Figura 20 – *Docking* molecular do composto BOMe no DNA. Representação esquemática do composto BOMe, que se liga via *groove*. Linha verdes: ligação de hidrogênio.



Fonte: autora, 2019.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho possibilitou avaliar a interação de duas drogas de recreação sintéticas (25H-NBOH e 25H-NBOMe) com o *ct*DNA, visando sugerir um possível mecanismo de ação para essas moléculas. Assim, em relação à avaliação da interação entre os compostos estudados e o *ct*DNA, as técnicas espectroscópicas utilizadas (espectrofotometria de absorção molecular no UV-Vis e espectroscopia de fluorescência molecular), bem como estudos de RMN de ^1H e de *docking* molecular, mostraram-se eficientes, uma vez que permitiram determinar as constantes, modo de ligação, parâmetros termodinâmicos, estequiometria e o epítipo das moléculas na presença do *ct*DNA.

Portanto, foi possível observar que os compostos avaliados apresentaram interação significativa com o *ct*DNA, formando um complexo supramolecular não fluorescente, caracterizando o mecanismo de *quenching* estático. Os ensaios envolvendo iodeto de potássio, competição com sondas e avaliação da temperatura de desnaturação do DNA, foram de grande importância, uma vez que foi possível avaliar o modo de ligação DNA-ligante, sugerindo que os compostos estudados interagem preferencialmente via *groove* maior.

Com os valores de K_b estabelecidos, foi possível observar que a constante de ligação desses compostos está na ordem de 10^4 L mol^{-1} . Os estudos termodinâmicos indicaram também que a interação com o DNA é espontânea e que os principais tipos de interações que ocorrem são ligações de hidrogênio e força de van der Waals para 25H-NBOH e forças hidrofóbicas para 25H-NBOMe. Por fim, com os estudos de RMN de ^1H foi estabelecido o epítipo das moléculas na presença do *ct*DNA. Para 25H-NBOH e 25H-NBOMe as regiões contendo o fenol e o grupo amino foram as que mais sofreram deslocamento na presença da macromolécula, o que é um indicativo que essa é a porção da molécula que mais interage com o *ct*DNA, sendo o epítipo da molécula. Além disso, o *docking* molecular indicou as regiões de interação e quais as principais interações que estabilizam o complexo formado entre 25H-NBOH, 25H-NBOMe e o DNA, sendo consistentes com os estudos experimentais. Dessa forma, este estudo apresenta evidências da interação entre drogas ilícitas como 25H-NBOMe e 25H-NBOH com o DNA, o que pode levar a possíveis efeitos genotóxicos.

7 PERSPECTIVAS

- i)* Avaliar a interação de outros derivados de NBOMe e NBOH com o *ctDNA*;
- ii)* Avaliar a interação desses compostos estudados com a Albumina do Soro Humano (HSA) estabelecendo os principais parâmetros de interação;
- iv)* Realizar estudos de *docking* molecular para outros derivados de NBOMe e NBOH com o *ctDNA* e HSA.

8 REFERÊNCIAS

- AFRIN, S. et al. Molecular spectroscopic and thermodynamic studies on the interaction of anti-platelet drug ticlopidine with calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, India, v. 186, p. 66–75, 2017.
- AHMAD, A.; AHMAD, M. Deciphering the mechanism of interaction of edifenphos with calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, India**, v. 188, p. 244–251, 2018.
- ALMEIDA, V. L., et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, Brasil, v. 28, p. 118-129, Set., 2005.
- ARJMAND, F.; JAMSHEERA, A. DNA binding studies of new valine derived chiral complexes of tin(IV) and zirconium(IV). **Spectrochimica Acta Part A**, Índia, v. 78, p. 45–51, Jun., 2011.
- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, In press, 2015.
- BARREIRO, L. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BASU, A.; KUMAR, G. S. Biophysical studies on curcumin–deoxyribonucleic acid interaction: Spectroscopic and calorimetric approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, Índia, v. 62, p. 257– 264, Set., 2013.
- BAZZICALUPI, C., et al. Metals in supramolecular chemistry. **Inorganica Chimica Acta**, Espanha, v. 417, p. 3–26, Mar., 2014.
- BRAGA, J. W. B.; MAGALHÃES, L. O.; ARANTES, L. C. Identification of NBOMe and NBOH in blotter papers using a handheld NIR spectrometer and chemometric methods. **Microchemical Journal**, Brasil, v. 144, p. 151–158, Ago., 2018.
- CARUSO, I. P. et al. Exploring the binding mechanism of Guaijaverin to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy and computational approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Brasil, v. 97, p. 449–455, 2012.
- COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O' DONNELL. **Biologia Molecular: Princípios e técnicas**. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- DESIRAJU, G. R. Chemistry beyond the molecule. **Nature**, v. 412, p. 397–400, jul., 2001.

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

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.

GUEDES, I. A.; MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. **Receptor–ligand molecular docking**. *Biophys Ver*; 6:75–87, 2014.

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

HARVEY, R. A.; FERRIER, D.R. **Lippicott's Illustrated Reviews: Biochemistry**. 5.ed. Filadélfia: Wolters Kluwer, 2011.

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.

HENDRICKS, L.; DAUGHERTY, J. L. 25I-NBOMe N-bomb. **Drug Des.**, Estados Unidos v. 7, p. 1-2, Fev., 2018.

HIRST, J. D. **Predicting ligand binding energies**. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 1, 28, 1998.

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

JONES, G. et al. **Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking**. *J. Mol. Biol.*, 267 : 727, 1997.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C. **Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with description of desolvation**. *J. Mol. Biol.*, 245 : 43, 1995.

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.

KIM, D. S. et al. **BetaDock: shape-priority docking method based on beta-complex**. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 29: 219–42, 2011.

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

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

Springer, 2006.

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

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

LIU, J., et al. The Interaction of DNA with Dopamine by Spectroscopic and Electrochemical Methods. **Analytical Science**, v. 18, p.751-755, Jul, 2002.

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

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

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

MUEGGE, I.; RAREY, M. **Small molecule docking and scoring**. *Rev Comput Chem.*; 17:1–60, 2001.

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

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

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

NGUYEN, S. T.; GIN, D. L.; HUPP, J. T.; ZHANG, X. Supramolecular chemistry: Functional structures on the mesoscale. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 11849-11850, Out. 2001.

NIKOLAOU, P. et al. 2C-I-NBOMe, an “N-bomb” that kills with “Smiles”. Toxicological and legislative aspects. **Drug and Chemical Toxicology**, Grécia, v. 38, p. 113–119, Mai., 2014.

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.

PRIETO, D. et al., A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling

method using methyl green. **Histochem Cell Biol**, Mai., 2014.

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.

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

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

RAUF, S., et al. Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Austrália, v. 37, 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., 2015b

REHMAN, S.U., et al. Deciphering the interactions between chlorambucil and calf thymus DNA: A multi-spectroscopic and molecular docking study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Índia, v.566, p.7–14, Jan., 2015a.

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

RODRIGUES, R. P. et al. **Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos**. Rev. Virtual Quim. Vol. 4, No. 6, – 739-776, 2012.

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.

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

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

SHEN, H., et al. In Vitro Study of DNA Interaction with Trichlorobenzenes by Spectroscopic and Voltammetric Techniques. **International Journal of Electrochemical Science**, China, v. 6, p. 532-547, Mar., 2011.

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

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

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

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

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

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

THIEMANN, O. H. A descoberta da estrutura do DNA: de Mendel a Watson e Crick. **Química Nova na Escola**, Brasil, v. 17, p. 1-7, Mai., 2003.

TROTT, O.; OLSON, A. J. **AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading**. *Journal of Computational Chemistry*. V. 31, Issue 2, p. 455-461, 2009.

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

WANG, Q., et al. Study on the interaction characteristics of cefamandole with bovine serum albumin by spectroscopic technique. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v.136, p. 321–326, Out., 2015.

WEAVER, I.; DONALD, F. **Pharmaceutical chemistry: a molecular and biochemical approach**. Third edition. Oxford University Press, N777, 2005.

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.

YOU, L.; ZHA, D.; ANSLYN, E. V. Recent Advances in Supramolecular Analytical

Chemistry Using Optical Sensing. **Chemical Reviews**, China, v. 115, p. 7840–7892, 2015.

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

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.