

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

**ESTUDOS BIOFÍSICOS APLICADOS NO MAPEAMENTO DA INTERAÇÃO ENTRE**  
**COMPOSTOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS E MACROMOLÉCULAS**

MARINA DE MAGALHÃES SILVA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

MARINA DE MAGALHÃES SILVA

ESTUDOS BIOFÍSICOS APLICADOS NO MAPEAMENTO DA INTERAÇÃO ENTRE  
COMPOSTOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS E MACROMOLÉCULAS

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Isis Martins Figueiredo

Coorientador: Prof. Dr. Josué C. Caldas Santos

Maceió – AL  
2020

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB-4/661

- S586e Silva, Marina de Magalhães.  
Estudos biofísicos aplicados no mapeamento da interação entre compostos biologicamente ativos e macromoléculas / Marina de Magalhães Silva. – 2020.  
150 f. : il., graf., tabs.
- Orientadora: Isis Martins Figueiredo.  
Coorientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.  
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2020.
- Inclui bibliografia.
1. Interação molecular. 2. ctDNA(*Calf thymus*). 3. Hemoglobina humana.  
4. Técnicas espectroscópicas. 5. Compostos bioativos. I. Título.

CDU:543.42



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA

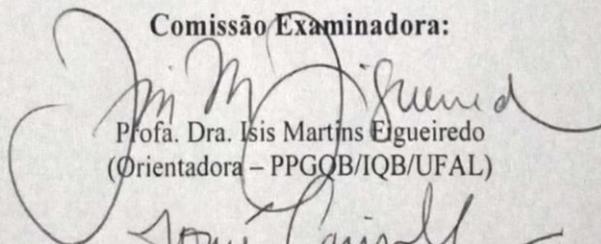


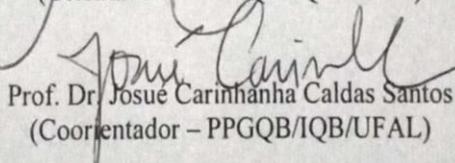
BR 104 Km 14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Taladeiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

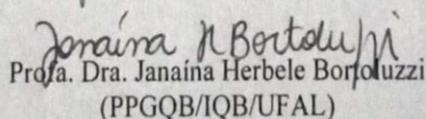
### FOLHA DE APROVAÇÃO

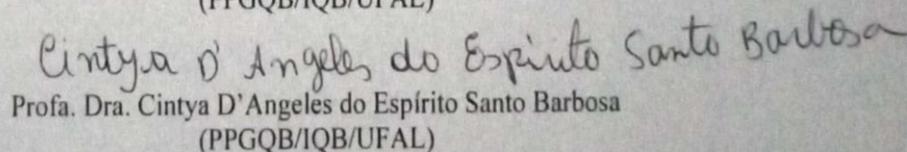
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **MARINA DE MAGALHÃES SILVA** intitulada: “**Estudos biofísicos aplicados no mapeamento da interação entre compostos biologicamente ativos e macromoléculas**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 14 de janeiro de 2020, às 9h, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

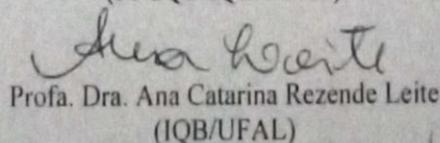
#### Comissão Examinadora:

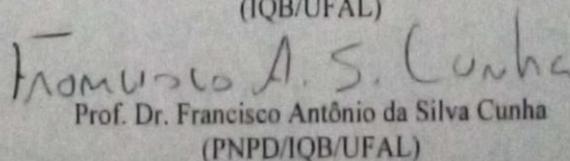
  
Prof. Dra. Isis Martins Egueiredo  
(Orientadora – PPGQB/IQB/UFAL)

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

  
Prof. Dra. Janaina Herbele Bortoluzzi  
(PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof. Dra. Cintya D'Angeles do Espírito Santo Barbosa  
(PPGQB/IQB/UFAL)

  
Prof. Dra. Ana Catarina Rezende Leite  
(IQB/UFAL)

  
Prof. Dr. Francisco Antônio da Silva Cunha  
(PNPD/IQB/UFAL)

*Dedico este trabalho à minha querida  
mãe Vanda Magalhães, por ser meu  
sustento, minha base, minha inspiração.  
Obrigada por me ajudar a tornar esse  
sonho realidade!*

## AGRADECIMENTOS

*Inicialmente gostaria de dizer que, se fosse para descrever todos que me ajudaram a chegar até aqui teria praticamente uma outra tese. Desde a moça da papelaria que me deixava tirar cópia dos materiais que precisava “fiado” até meus maiores professores que compreendem minha família de casa e a da universidade. Tentarei ser breve, mas acredito que esse momento não se resume apenas a um título acadêmico, mas sim numa história de vida repleta de obstáculos e conquistas.*

*Primeiramente, eu louvo ao Meu Deus! Aquele que me ajudou e me proporcionou saúde, sabedoria e discernimento para subir mais um degrau de minha vida. Muitas vezes, em dias de tamanha aflição Ele sempre me respondia com sua palavra: “Ainda que a minha mente e o meu corpo enfraqueçam, Deus é a minha força, Ele é tudo o que eu sempre preciso” (Salmos 73:26). Só tenho a agradecer e pedir que continue iluminando o caminho de todos que comigo trilharam nessa batalha.*

*A minha mãe Vanda Magalhães, que nunca me deixou desistir dos meus sonhos mesmo quando o mundo parecia ter me dado as costas. As longas madrugadas ao meu lado, os lanches no quarto, os remédios e as prévias de seminários que pareciam infinitas. Após esse trabalho acredito que ela sabe mais de DNA do que até eu mesma. Minha guerreira, meu suporte, meu porto seguro, palavras não conseguem exprimir meu amor por você! Eu te amo muito e te agradeço por absolutamente TUDO!*

*A Maria Vitória meu grande amorzinho que tanto me ajudou! Você trouxe luz para minha vida e saiba que a Tita te ama muito. Obrigada por todas as vezes que você disse: “Calma tia, vai dá certo!”*

*A minha irmã Mariana Magalhães e meu pai pela torcida e apoio.*

*E... não menos importante meu namorado Genivaldo Filho, obrigada por tudo! Sem sua tamanha dedicação essa conquista não seria possível. Foi você que sempre acreditou em mim quando eu duvidei. Obrigada por me acompanhar nas viagens em busca de meus sonhos e por honrar com meus compromissos de casa, quando eu estava ausente durante todos esses anos de UFAL. Eu amo você!*

*Aos meus professores (por ordem cronológica):*

*- Toninho: Você foi minha inspiração no ensino médio. Suas aulas despertaram em mim a vontade de ser professora de Química, obrigada por todos os ensinamentos!*

*- André: Suas aulas de Química Analítica I me inspiraram a seguir nessa área, obrigada por todas as suas orientações.*

*- Isis: Obrigada pela oportunidade de fazer parte do LINQA! Você me ensinou não apenas conteúdos científicos e sim espirituais que me ergueram várias vezes que estive desanimada! Obrigada pelas conversas que tanto me ajudaram a continuar firme em meus objetivos. Bênçãos em sua vida!*

*- Josué: O que falar do cientista que entende de tudo??? Literatura, geografia, história, biologia, química, física, enfim... tudo que você imaginar ele discute com extrema clareza. O senhor sempre foi para mim um referencial, uma pessoa que venceu diversos obstáculos e que devido a isso consegue mostrar aos seus alunos que tudo é passageiro e que há um tempo para todas as coisas. Obrigada por permitir ser sua aluna adotiva, obrigada por deixar eu testar os experimentos da oficina de baixo custo, pois foi a partir dali que começamos a trilhar um caminho no LINQA. Palavras não são capazes de expressar minha tamanha gratidão. Que o Senhor continue te abençoando e iluminando sempre!*

*Aos meus amigos (por ordem alfabética):*

*- Amanda: Sinceramente, eu nem sei o que falar de você. Deus sabe de todas as coisas! Ele nos colocou para ir ao casamento da Shenia juntas, e a partir daí nos aproximamos e hoje somos irmãs adotivas. Obrigada pelas conversas, conselhos, apoio, pelas noites que nós fazíamos vídeochamada para fazer prévia. Você foi peça fundamental para a realização de meus sonhos desde o concurso para substituto*

*até o de professor efetivo. Só o amor fraternal pode explicar tudo, eu não tenho palavras. Essa tese é uma realização coletiva e sempre servirá de exemplo de seu apoio constante, gratidão por sua vida e que Deus te ilumine para que alcances tudo aquilo que almejas!*

*- Ari: Mesmo você me achando pedante no início, saiba que não guardo mágoa (rsrsrsrs). Obrigada pelas conversas e conselhos!*

*- Ary: Você é uma pessoa incrível que pude conhecer melhor no doutorado. Uma menina de um coração enorme, sempre disposta a ajudar. Serei eternamente grata por seus conselhos!*

*- Carolzinha: Você sempre me mostrou que era capaz e que nunca desanimasse. Obrigada por me ouvir e orientar em diversos momentos da minha vida!*

*- Day: Você foi minha grande parceira durante essa jornada. Muito obrigada! Sem sua ajuda não teria conseguido. Não apenas na vida acadêmica, mas na vida pessoal você sempre me ajudou em absolutamente tudo, eternamente grata.*

*- Fátima (Fafá): Qual o seu nome? Foi a primeira frase que eu me comuniquei com você. Obrigada por sua família ter me apoiado em inúmeras dificuldades e pela torcida por minhas conquistas!*

*- Jana: Você foi muito importante nessa trajetória! Obrigada pelo apoio, orações e torcida!*

*- Jaelson: Obrigada pelos seus ensinamentos não apenas relacionados a construção civil, mas também por seus conselhos na vida pessoal e profissional.*

*- Karol: A caçula do LINQA, obrigada por nossas conversas às 7h da manhã e por me mostrar que a vida deve ser levada de forma mais simples e leve!*

*- Reginaldo: Esse chegou de fininho e de repente estávamos nos apoiando um no outro. Obrigada por sua amizade.*

*A todos do LINQA: vocês se tornaram minha família ao longo desses quase 8 anos. Garanto que, se um dia eu cheguei desanimada nesse laboratório (que cheguei) eu fui embora de cabeça erguida para recomeçar. Obrigada a todos, sem exceção, por serem esse refúgio em minha vida.*

*A Rosi pequena que apesar da distância sempre torceu por mim e me mostrou que eu era capaz!*

*A Cláudia, minha parceira de ônibus! Obrigada por tornar as viagens menos longas com suas conversas sábias.*

*Ao Cláudio e Ricardo que foram meus parceiros de tantas madrugadas na bancada. Grata!*

*A Nildinha, minha mãe da UFAL. Você sempre cuidou de mim como filha, obrigada por tudo!*

*Ao Cristian que compartilhou comigo muitos momentos de tensão e alegrias durante esses anos.*

*Aos meus alunos durante o período de professor substituto, vocês me ajudaram a crescer bastante. Obrigada pelos feedbacks das aulas que me tornaram uma pessoa e profissional melhor. Obrigada pelos e-mails motivadores e por sempre torcerem por mim. Saibam que o céu é o limite, e nunca permitam que alguém ofusque o brilho de vocês.*

*A todos os alunos e professores colaboradores desse trabalho, muito obrigada!*

*Aos órgãos de fomento (CAPES, CNPq, FAPEAL) pelo apoio financeiro.*

*E, por fim... a todos que de alguma forma fizeram parte da minha vida permitindo que esse sonho fosse concretizado, pois como disse Ayrton Senna: “Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas!”.*

*E cada vez Ele disse: “Não, mas Eu estou com você; isso é tudo que você precisa. Meu poder revela-se melhor nos fracos”. Agora, sinto-me feliz em me gloriar de ser tão fraco; estou feliz em ser uma demonstração viva do poder de Cristo, em vez de alardear meu próprio poder e meus talentos. Já que eu sei que tudo é para o bem de Cristo, sinto-me bem feliz com o “espinho”, e com os insultos, as durezas, as perseguições e as dificuldades; porque quando estou fraco, então sou forte – quanto menos tenho, mais dependo dele.”*

Coríntios 2, 9-10.

## RESUMO

O entendimento do mecanismo de ação de moléculas que se ligam a proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos, entre outras, é de suma importância uma vez que essas biomoléculas estão envolvidas na maioria das funções celulares e a compreensão dos seus mecanismos moleculares de ação contribuem para o desenvolvimento de novos medicamentos. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar a interação de diferentes compostos bioativos com a hemoglobina humana (Hb) e ctDNA (*Calf thymus*), utilizando técnicas espectroscópicas, eletroforese e estudos teóricos, que permitiram investigar a magnitude de ligação dos complexos formados com a proteína e DNA. Assim, de acordo com os resultados obtidos pôde-se observar que o derivado pterocarpano (LQB-223) formou um complexo supramolecular não fluorescente, caracterizado pelo mecanismo de *quenching* estático e a constante de ligação ( $K_b$ ) obtida foi de  $1,94 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  (30 °C), sendo as interações hidrofóbicas, as responsáveis por estabilizar os complexos formados nesse processo. O modo de ligação preferencial foi caracterizado via *groove* e pelo ensaio de eletroforese verificou-se que não houve fragmentação do DNA. Para os derivados piperidínicos, observou-se que ocorre interação preferencialmente por *quenching* estático, via intercalação, onde os valores de  $K_b$  variaram de 0,10 a  $8,00 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ . Por meio da correlação dos valores das constantes de ligação com os dados de atividade biológica ( $GI_{50}$ ), pôde-se observar que os coeficientes de correlação variaram na faixa de  $0,8174 \leq |r| \leq 0,9868$ , para as linhagens HT29, NCI-H460, 786-0 e NCI/ADR-RES, sugerindo que o principal mecanismo de ação desses compostos pode estar associado ao DNA como alvo biológico. Para os estudos de interação entre a hemoglobina e o timerosal (TH), verificou-se que o ligante interage com a macromolécula por *quenching* estático e constante de ligação na ordem de  $10^6 \text{ L mol}^{-1}$  e as principais forças que regem esse processo de interação são as eletrostáticas. A estequiometria TH:Hb foi de 2:1, sugerindo que ocorre ligação do etilmercúrio do timerosal nos dois resíduos de cisteína disponíveis ( $\beta\text{Cis93}$ ) presentes na subunidade  $\beta$ . Esses dados são concordantes com os resultados obtidos pelo ensaio com o reagente NEM (bloqueador de grupo tiol), onde verificou-se diminuição nos valores de  $K_b$  na presença de quantidades crescentes deste reagente. Além disso, constatou-se que ocorrem mudanças conformacionais na estrutura da proteína após complexação com o ligante avaliado sendo confirmado pelos ensaios de DLS e eletroforese. Na avaliação de espécies competidoras, observou-se que o Ca(II) e Mg(II) foram os íons que exerceram maior influência no processo de interação. Como consequência, verificou-se inibição da capacidade de ligação de Hb-O<sub>2</sub> até 72% (Hb humana) e 50% (eritrócitos humanos). Também foi observada a indução de produtos finais de glicação avançada (AGE) e agregados de proteína (amilóides) dependente da dose de TH. Por fim, esses resultados destacam o potencial tóxico do uso de TH em sistemas biológicos, com consequente risco à saúde humana.

**Palavras-Chave:** Interações moleculares. ctDNA (*Calf thymus*). Hemoglobina humana. Técnicas espectroscópicas. Compostos bioativos.

## ABSTRACT

The understanding of action mechanism from molecules that bind to proteins, nucleic acids, carbohydrates, among others, is of the utmost importance since these biomolecules are involved in most cellular functions and the comprehension of their molecular target contribute to the development of new drugs. The aim of this work was to evaluate the interaction of different bioactive compounds with human hemoglobin (Hb) and ctDNA (*Calf thymus*) using spectroscopic techniques, electrophoresis and theoretical studies, which allowed investigate the binding magnitude of the complexes formed with protein and DNA. Thus, according to the results obtained it was observed that the pterocarpane derivative (LQB-223) formed a non-fluorescent supramolecular complex characterized by the static quenching mechanism and the binding constant ( $K_b$ ) obtained was  $1.94 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  (30 °C), the hydrophobic interactions being responsible for stabilizing the complexes formed in this process. The binding mode was characterized by groove and by the electrophoresis assay, it was found that there was no DNA fragmentation. For the piperidine derivatives, it was observed that interaction occurs preferentially by static quenching, via intercalation, where  $K_b$  values ranged from 0.10 to  $8.00 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ . By correlating the values of the binding constants with the biological activity data ( $GI_{50}$ ), it was observed that the correlation coefficients varied in the range of  $0.8174 \leq |r| \leq 0.9868$ , for HT29, NCI-H460, 786-0 and NCI/ADR-RES, suggesting that the main mechanism of action of these compounds may be associated with DNA as a biological target. For the interaction studies between hemoglobin and thimerosal (TH), it was verified that the ligand interacts with the macromolecule by static quenching and binding constant about  $10^6 \text{ L mol}^{-1}$  and the main forces that govern this process are the electrostatics. The TH: Hb stoichiometry was 2:1, suggesting that ethyl mercury binding of thimerosal occurs in the two available cysteine residues ( $\beta\text{Cys93}$ ) present in the  $\beta$  subunit. These data are consistent with the results obtained by the NEM reagent (thiol group blocker) assay, where a decrease in  $K_b$  values was observed in the presence of increasing amounts of this reagent. In addition, it was found that conformational changes occur in the protein structure after complexation with the evaluated ligand being confirmed by the DLS and electrophoresis assays. In the competing species evaluation, it was observed that Ca(II) and Mg(II) were the ions that exerted the greatest influence on the interaction process. As consequence, inhibition of Hb-O<sub>2</sub> binding capacity up to 72% (human Hb), and 50% (human erythrocytes), was verified. Dose-dependent induction of TH forming advanced glycation end products (AGE) and protein aggregates (amyloids) was additionally observed. Finally, these results highlight the toxic potential of the use of TH in biological systems, with a consequent risk to human health.

**Keywords:** Molecular interactions. ctDNA. Human hemoglobin. Spectroscopic techniques. Bioactive compounds.

## **LISTA DE ESQUEMAS**

### **Seção 3 – Artigo 1**

Esquema 1 – Estruturas dos ligantes presentes na Tabela 2..... 62

### **Seção 5 – Artigo 3**

Esquema 1 – Reações realizadas usando o ensaio de Ellman..... 120

Esquema 2 – Avaliação da possível hipótese da reação entre hemoglobina e timerosal..... 121

## LISTA DE FIGURAS

### Seção 1 – Introdução Geral

Figura 1 – Formação de complexos supramoleculares; a) proteína-ligante e b) DNA-ligante por ligações não covalentes.....	21
Figura 2 – Espectros de fluorescência dos aminoácidos aromáticos em meio aquoso.....	30
Figura 3 – Relação de publicações/citações que utilizaram a fluorescência molecular para a avaliação da interação de: a) DNA; b) proteínas.....	31

### Seção 3 – Artigo 1 (LQB-223 e ctDNA)

Figura 1 – Estrutura química do LQB-223 e atividade antileucêmica.....	54
Figura 2 – Espectro de absorção no UV-vis do LQB-223 (10 $\mu$ M), ctDNA (10 $\mu$ M), LQB-223-ctDNA e (LQB-223-ctDNA) – ctDNA.....	56
Figura 3 – Interação do LQB-223 com o ctDNA empregando fluorescência molecular.....	57
Figura 4 – Avaliação do modo de ligação DNA-ligante.....	65
Figura 5 – Efeito da força iônica na interação DNA-ligante na presença de incrementos de NaCl (0-150 mM) a 30°C.....	70
Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1% (m/m) com concentrações crescentes de LQB-223.....	70
Figura 7 – Efeito de concentrações crescentes do LQB-223 e as sondas EB e berenil na viscosidade do ctDNA.....	72
Figura 8 – Tempo de evolução do $C\alpha$ -RMSDs (em Å) do ctDNA (azul) e LQB-223 (laranja).....	73
Figura 9 – Visão comparativa entre ctDNA do a) PDB e b) ctDNA/LQB-223 gerado por simulação MD.....	74
Figura 10 – Interações do complexo ctDNA-LQB-223. Esferas em cinza significam interações hidrofóbicas.....	74

### Seção 4 – Artigo 2 (Piperidinas e ctDNA)

Figura 1 – Exemplos de derivados de piperidina com potentes atividades biológicas.....	84
Figura 2 – Estruturas dos derivados de piperidina previamente sintetizados.....	85
Figura 3 – Interação do derivado 16 com ctDNA empregando fluorescência molecular.....	90

Figura 4 – Espectros de absorção UV-vis do composto 16 (10 $\mu$ M), ctDNA (100 $\mu$ M), complexo 16-ctDNA e (16-ctDNA) - ctDNA.....	93
Figura 5 – Avaliação do modo de ligação ctDNA-ligante.....	95
Figura 6 – Correlação entre atividade biológica e afinidade de ligação do DNA e piperidinas.....	97
Figura 7 – <i>Docking</i> molecular (agrupamento) dos compostos de piperidina no DNA gerado por simulações MD.....	99

### Seção 5 – Artigo 3 (Timerosal e hemoglobina)

Figura 1 – Estrutura química do timerosal (TH) e seus respectivos produtos de degradação, ácido tiosalicílico (ATS) e etilmercúrio (EtHg <sup>+</sup> ).....	107
Figura 2 – Estrutura da hemoglobina humana (Hb), em que a cadeia $\alpha$ corresponde a cor cinza claro e a cadeia $\beta$ refere-se ao cinza mais escuro.....	111
Figura 3 – Avaliação da cinética de interação entre a hemoglobina (2 $\mu$ M) e o timerosal (100 e 50 $\mu$ M, para UV-vis e fluorescência, respectivamente) durante 150 min.....	112
Figura 4 – Resultados para avaliação da interação Hb-TH por fluorescência molecular.....	114
Figura 5 – Perfil obtido pelo método das variações contínuas para o sistema Hb-TH.....	116
Figura 6 – Curva para cálculo do coeficiente de Hill ( $n_H$ ) do sistema Hb-TH.....	117
Figura 7 – Reação de Ellman modificada.....	118
Figura 8 – Mecanismo genérico de reação / interação proposto para o sistema timerosal e hemoglobina.....	122
Figura 9 – Efeito do EtHgCl e NEM no valor da constante de ligação do sistema Hb-TH.....	123
Figura 10 – Curva de Van't Hoff para cálculo dos parâmetros termodinâmicos.....	124
Figura 11 – Efeito da força iônica no complexo hemoglobina-timerosal.....	125
Figura 12 – Resultados obtidos por espectroscopia no UV-vis.....	126
Figura 13 – Espectros de fluorescência tridimensional para a hemoglobina (4,0 $\mu$ M) na ausência (a) e presença (b) de timerosal (200 $\mu$ M).....	128
Figura 14 – Resultados obtidos empregando estudos de fluorescência sincronizada.....	130
Figura 15 – Espectros de dicroísmo circular da (a) hemoglobina e (b) banda da porfirina de Soret na presença de timerosal.....	131
Figura 16 – Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da Hb (10 $\mu$ M) e absorção molecular do TH (20 $\mu$ M).....	133

Figura 17 – Efeito de espécies competidoras nos valores das constantes de ligação ( $K_b$ ) relativo a interação Hb-TH.....	135
Figura 18 – a) Estrutura química do ANS, b) Intensidade de fluorescência do ANS (4 $\mu$ M) na ausência e na presença da Hb (4 $\mu$ M), c) Intensidade de fluorescência do sistema ANS-Hb na presença de diferentes concentrações de TH (0-256 $\mu$ M).....	136
Figura 19 – Efeito da adição de incrementos crescentes de timerosal à hemoglobina na mobilidade eletroforética por Native-PAGE.....	137
Figura 20 – Intensidade de fluorescência (a) AGEs e (b) ThT em diferentes sistemas de Hb, com incubação de 1 semana ( $n = 3$ ).....	139
Figura 21 – a) Capacidade de ligação a oxigênio empregando hemoglobina humana (Hb) e, b) eritrócitos humanos (Eri) na ausência e presença de diferentes proporções ou concentrações de timerosal.....	140

## LISTA DE TABELAS

### Seção 1 – Introdução Geral

Tabela 1 – Informações, parâmetros e vantagens/desvantagens sobre as principais técnicas para avaliação da interação ligante-proteína/DNA.....	27
--	----

### Seção 2 – Experimental

Tabela 1 – Concentrações utilizadas nos ensaios realizados para cada classe de compostos avaliada.....	44
--	----

### Seção 3 – Artigo 1 (LQB-223 e ctDNA)

Tabela 1 – Parâmetros de ligação e termodinâmicos da interação do composto LQB-223 com o ctDNA.....	59
Tabela 2 – Avaliação comparativa da interação do DNA e parâmetros de atividade biológica de trabalhos recentes da literatura.....	61

### Seção 4 – Artigo 2 (Piperidinas e ctDNA)

Tabela 1 – Atividade citotóxica (valores de $GI_{50}^a$ em $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e índices de seletividade ( $IS^b$ , dado entre parênteses) de piperidinas funcionalizadas e doxorubicina (DOX) frente a diferentes linhagens celulares de câncer e HaCat.....	87
Tabela 2 – Parâmetros de interação do ctDNA com derivados de piperidina a 25 °C.....	91
Tabela 3 – Valores de absorvância dos derivados de piperidina (10 $\mu\text{M}$ ), ctDNA (100 $\mu\text{M}$ ) e complexo composto-ctDNA.....	93
Tabela 4 – Comparação das energias do <i>docking</i> , interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio para cada composto avaliado.....	99

### Seção 5 – Artigo 3 (Timerosal e hemoglobina)

Tabela 1 – Efeitos tóxicos do timerosal frente a vários alvos / modelos e influência do tempo e dose de exposição.....	108
Tabela 2 – Parâmetros de ligação para o processo de interação entre Hb e TH em diferentes temperaturas.....	114

Tabela 3 – Valores de absorvância para a hemoglobina (10 $\mu$ M) e timerosal (25 $\mu$ M) livres, complexo Hb-TH e mistura Hb+TH.....	127
Tabela 4 – Parâmetros relacionados aos espectros de fluorescência 3D.....	128
Tabela 5 – Parâmetros calculados em relação ao processo de FRET.....	133
Tabela 6 – Concentração de espécies presentes no plasma/soro humano.....	134

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ANS	Ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato
ATS	Ácido tiosalicílico
EB	Brometo de etídio
BSA	Albumina do Soro Bovino
C	Citosina
Cis	Cisteína
CIM	Concentração Inibitória mínima
ctDNA	DNA <i>Calf Thymus</i>
DC	Dicroísmo circular
DLS	Análise de Dispersão Dinâmica da luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EtHg <sup>+</sup>	Etilmercúrio
F	Fluorescência
F <sub>0</sub>	Fluorescência na ausência do ligante
FRET	Transferência de energia por ressonância de fluorescência
G	Guanina
GI <sub>50</sub>	Concentração mínima do fármaco capaz de gerar 50% de inibição do crescimento
IC <sub>50</sub>	Concentração mínima do fármaco capaz de produzir citotoxicidade de 50% da cultura celular
Hb	Hemoglobina humana
HSA	Albumina do soro humano
IS	Índice de seletividade
IV	Infravermelho
K <sub>b</sub>	Constante de ligação
K <sub>SV</sub>	Constante de Stern Volmer
MFA	Microscopia de força atômica
<i>n</i>	Número de sítios de ligação do complexo
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
PDB	Protein Data Bank

pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
T	Timina
TH	Timerosal
Trp	Triptofano
Tir	Tirosina
UV-vis	Ultravioleta-visível
$\Delta H$	Varição de entalpia
$\Delta S$	Varição de entropia
$\Delta G$	Varição da energia livre de Gibbs
3D	Tridimensional

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>SEÇÃO 1: INTRODUÇÃO GERAL</b>	
<b>1.1</b>	<b>Química supamolecular</b> .....	21
<b>1.2</b>	<b>Qual a importância dos estudos de interação macromolécula-ligante?</b> .....	22
1.2.1	DNA: os repositórios moleculares da informação genética.....	22
1.2.2	Proteínas: instrumentos que expressam a informação genética.....	24
<b>1.3</b>	<b>Interação macromolécula-ligante, como avaliar?</b> .....	25
<b>1.4</b>	<b>Justificativa e objetivo geral do estudo proposto</b> .....	33
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
<b>2</b>	<b>SEÇÃO 2: EXPERIMENTAL</b>	
<b>2.1</b>	<b>Reagentes e Soluções</b> .....	40
2.1.1	Estudos de interação com DNA.....	40
2.1.2	Estudos de interação com proteína.....	41
<b>2.2</b>	<b>Equipamentos utilizados</b> .....	42
<b>2.3</b>	<b>Procedimentos</b> .....	43
2.3.1	Estudos de interação com DNA.....	43
2.3.1.1	Determinação da concentração do ctDNA ( <i>Calf thymus</i> ).....	43
2.3.1.2	Interação ctDNA-ligante por fluorescência.....	43
2.3.1.3	Estudos por UV-vis.....	43
2.3.1.4	Avaliação do modo de ligação ctDNA-ligante.....	43
2.3.1.5	Eletroforese em gel de agarose.....	44
2.3.1.6	Ensaio biológicos.....	44
2.3.1.7	Estudos teóricos.....	45
2.3.2	Estudos de interação com proteína.....	46
2.3.2.1	Avaliação da interação hemoglobina-timerosal por fluorescência molecular.....	46
2.3.2.2	Método de Job.....	46
2.3.2.3	Avaliação do mecanismo de interação preferencial: ensaio de Ellman (determinação de tióis livres) .....	46
2.3.2.4	Avaliação de mudanças conformacionais na estrutura da proteína.....	46
2.3.2.5	Estudo de competição.....	47
2.3.2.6	Avaliação de efeitos químicos no processo de interação Hb-TH.....	47
2.3.2.6.1	Avaliação de sítios hidrofóbicos da hemoglobina.....	47
2.3.2.6.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	48

2.3.2.6.3	Análise de Dispersão Dinâmica da Luz (DLS).....	48
2.3.2.7	Avaliação de efeitos biológicos no processo de interação Hb-TH.....	48
2.3.2.7.1	Influência do timerosal no processo de glicação <i>in vitro</i> .....	46
2.3.2.7.2	Avaliação de mudanças estruturais empregando Tioflavina T (ThT).....	48
2.3.2.7.3	Avaliação da capacidade de ligação a O <sub>2</sub> .....	49
<b>2.4</b>	<b>Tratamento dos dados</b> .....	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>51</b>
<b>3</b>	<b>SEÇÃO 3: ARTIGO 1 (AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DO LQB-223 COM ctDNA)</b>	
<b>3.1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>54</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>55</b>
<b>3.3</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>56</b>
3.3.1	Avaliação da interação por UV-vis.....	56
3.3.2	Avaliação da interação por fluorescência molecular.....	57
3.3.3	Avaliação do modo de ligação do complexo LQB-223 e ctDNA.....	64
3.3.3.1	Ensaio com KI.....	64
3.3.3.2	Transferência de energia por contato.....	66
3.3.3.3	Estudo de competição com brometo de etídio.....	68
3.3.3.4	Estudo de desnaturação térmica do ctDNA.....	68
3.3.4	Efeito da força iônica.....	69
3.3.5	Eletroforese.....	70
3.3.6	Medidas de viscosidade.....	72
3.3.7	Estudos de dinâmica e <i>docking</i> molecular.....	73
<b>3.4</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>75</b>
<b>3.5</b>	<b>Artigo publicado</b> .....	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>77</b>
<b>4</b>	<b>SEÇÃO 4: ARTIGO 2 (AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE PIPERIDINAS COM ctDNA)</b>	
<b>4.1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>84</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>85</b>
<b>4.3</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>86</b>
4.3.1	Atividade antiproliferativa.....	86
4.3.2	Estudos de interação DNA-piperidinas.....	89

4.3.2.1	Avaliação da interação dos derivados piperidínicos com ctDNA por fluorescência molecular.....	89
4.3.2.2	Estudos por espectroscopia UV-visível.....	92
4.3.2.3	Avaliação do modo de interação DNA-ligante.....	94
4.3.2.3.1	Estudo de <i>quenching</i> pelo KI.....	94
4.3.2.3.2	Ensaio de competição com brometo de etídio (EB).....	96
4.3.2.4	Correlação dos valores de $K_b$ com $IC_{50}$ .....	96
4.3.2.5	Dinâmica molecular.....	98
<b>4.4</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>100</b>
<b>4.5</b>	<b>Artigo publicado.....</b>	<b>101</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>
<b>5</b>	<b>SEÇÃO 5: ARTIGO 3 (AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DO TIMEROSAL COM HEMOGLOBINA HUMANA)</b>	
<b>5.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>107</b>
<b>5.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>112</b>
<b>5.3</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>112</b>
5.3.1	Estudo cinético.....	112
5.3.2	Avaliação da interação empregando espectroscopia de fluorescência molecular.	113
5.3.2.1	Parâmetros de ligação.....	113
5.3.2.1.1	Método de Job.....	116
5.3.2.1.2	Avaliação da cooperatividade do sistema Hb-TH.....	116
5.3.2.1.3	Avaliação do mecanismo de interação preferencial: ensaio de Ellman (determinação de grupos tíóis) .....	118
5.3.2.2	Parâmetros termodinâmicos.....	123
5.3.2.2.1	Avaliação da força iônica.....	124
5.3.3	Avaliação de mudanças conformacionais na estrutura da proteína.....	125
5.3.3.1	Avaliação da interação por espectroscopia de absorção molecular no UV-vis.....	125
5.3.3.2	Fluorescência tridimensional (3D) .....	127
5.3.3.3	Fluorescência Sincronizada.....	129
5.3.3.4	Dicroísmo Circular.....	130
5.3.3.5	Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET).....	132
5.3.4	Avaliação de competidores no processo de interação Hb-TH.....	134
5.3.5	Avaliação de efeitos químicos no processo de interação Hb-TH.....	136
5.3.5.1	Avaliação de sítios hidrofóbicos da hemoglobina.....	136

5.3.5.2	Avaliação do perfil de migração eletroforética.....	137
5.3.5.3	Análise de Dispersão Dinâmica da luz (DLS).....	138
5.3.6	Avaliação de efeitos biológicos no processo de interação Hb-TH.....	138
5.3.6.1	Influência do timerosal no processo de glicação <i>in vitro</i> .....	138
5.3.6.2	Avaliação de mudanças estruturais empregando Tioflavina T (ThT).....	138
5.3.6.3	Avaliação da capacidade de ligação a O <sub>2</sub> .....	139
<b>5.4</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>141</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>142</b>
<b>6</b>	<b>SEÇÃO 6: CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS</b>	
<b>6.1</b>	<b>Conclusão Geral.....</b>	<b>150</b>
<b>6.2</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>150</b>

---

# Seção 1

## Introdução Geral

---

## SEÇÃO 1: INTRODUÇÃO GERAL

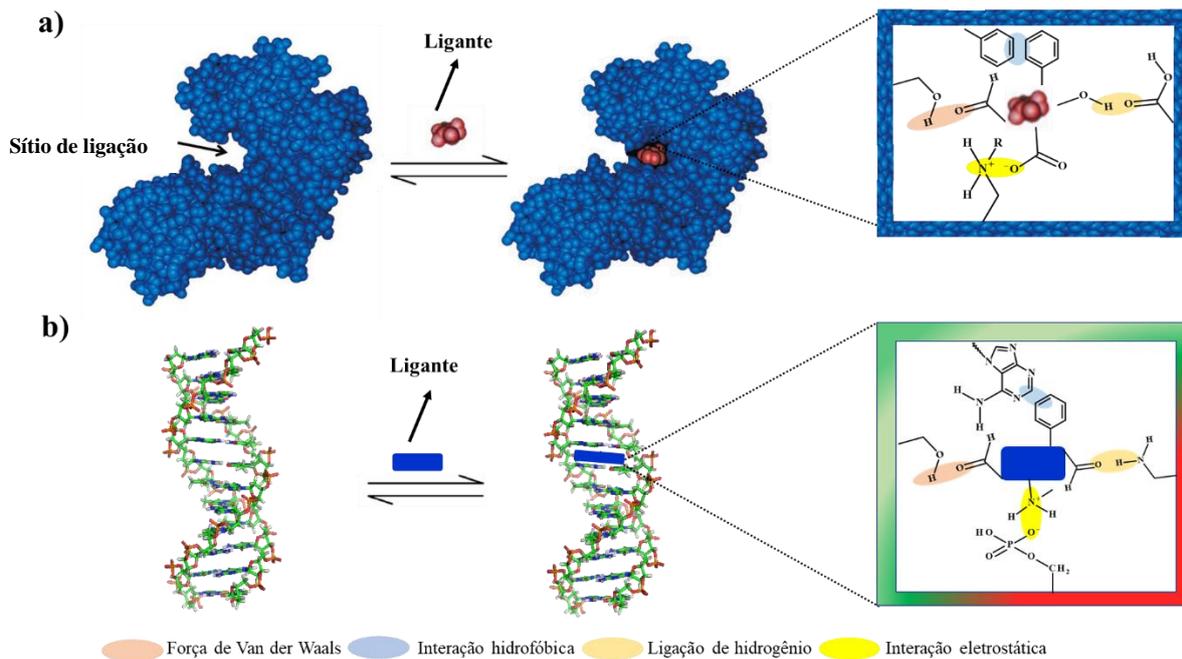
### 1.1 Química Supramolecular

Em 1978, o químico francês Jean-Marie Lehn conceituou a química supramolecular como sendo “*química além da molécula*”, a qual está fundamentada num domínio científico interdisciplinar que engloba características químicas, físicas e biológicas de espécies químicas de maior complexidade que as moléculas simples, ligadas entre si de forma auto organizadas por ligações não covalentes (BAZZICALUPI et al., 2014).

Em contraste com a química molecular, a qual estabelece sua base pautada na ligação covalente, a química supramolecular se alicerça em um grau de complexidade superior, para além da molécula, denominado de supermolécula(s) e sistemas polimoleculares organizados, mantidos por interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, entre outras.

Assim, a Figura 1 apresenta a formação de complexos supramoleculares proteína-ligante e DNA-ligante estabilizados por interações não covalentes, as quais são de fundamental importância nos processos biológicos entre substratos e proteínas receptoras, reações enzimáticas, reconhecimento celular, regulação da expressão gênica pelas proteínas ligadas ao DNA e na interação de DNA e fármacos. Dessa forma, o mapeamento dessas interações supramoleculares é a chave para a compreender e orientar muitos processos biológicos (YANG; LI; SNYDER, 2012).

**Figura 1 – Formação de complexos supramoleculares; a) proteína-ligante e b) DNA-ligante por ligações não covalentes.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

## 1.2 Qual a importância dos estudos de interação macromolécula-ligante?

Segundo Mcfedries e colaboradores (2013), diversas são as interações moleculares que permitem a vida, dentre elas destacam-se as interações entre proteínas/ácidos nucleicos e pequenas moléculas<sup>1</sup>. Diversas macromoléculas estão envolvidas em patologias, e são alvos biológicos como as enzimas, os ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos. Logo, o desenvolvimento de estratégias (químicas e/ou instrumentais) para estabelecer o mecanismo preferencial no qual moléculas interagem com macromoléculas alterando/modulando suas propriedades biológicas é de considerável importância nos campos da química, biologia e medicina (ALAM et al., 2018).

Neste contexto, para compreensão completa ou parcial do modo de ação de moléculas bioativas são necessários estudos das interações de todos os possíveis alvos químicos e biológicos, incluindo aminoácidos, hormônios, peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos, entre outros (YANG et al., 2012). Portanto, elucidar essas interações e entender como elas se relacionam com diferentes patologias é uma meta científica importante e desafiadora (SANTOS et al., 2017). Diante disso, será abordado a seguir alguns aspectos relacionados a importância de estudos de interação entre DNA/proteínas com pequenas moléculas.

### 1.2.1 DNA: os repositórios moleculares da informação genética

Como proposto pelos cientistas James Dewey Watson e Francis Crick (1953), a estrutura tridimensional do DNA consiste em duas cadeias helicoidais que se entrelaçam em um mesmo eixo formando uma dupla hélice. O esqueleto hidrofílico dos grupos alternantes desoxirribose e fosfatos carregados negativamente se encontram na parte externa da dupla fita interagindo com a água circundante; e as bases purínicas e pirimidínicas de ambas as fitas estão empilhadas no interior da dupla hélice (NELSON; COX, 2014). Cada fita é composta por uma combinação de quatro nucleotídeos (ligados a desoxirribose) que se mantêm unidos por ligação fosfodiéster, sendo as bases: adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C). A adenina (A) de uma fita sempre forma duas ligações de hidrogênio com a timina (T) da outra, enquanto a guanina (G) forma três ligações de hidrogênio com a citosina (C) da fita complementar. Assim, ao longo da hélice, os pares de bases são sempre AT (ou TA) e CG (ou GC) (METZLER, 2003).

O ácido desoxirribonucleico desempenha um papel importante no processo da vida, pois possui a capacidade de armazenar e transmitir a informação genética de uma geração para outra, sendo então considerados os “*repositórios moleculares da informação genética*” (NELSON;

---

<sup>1</sup> Compostos orgânicos de baixo peso molecular, que possuem afinidade com macromoléculas, passíveis de acarretar alterações conformacionais.

COX, 2014). Por consequência, contribui para a síntese biológica de proteínas e enzimas por meio dos processos de replicação e transcrição em células vivas (THOMAS; SUKUMARAN; SUDARSANAKUMAR, 2018). Dessa forma, o DNA controla direta ou indiretamente a estrutura e função das células, logo erros na expressão gênica podem provocar diversas patologias e exercem um papel secundário no desfecho e gravidade da doença animal (PORTUGAL, 2018).

Assim, pequenas moléculas podem ligar-se ao DNA, alterando e/ou inibindo o seu funcionamento natural, e este processo pode ser explorado para curar ou controlar uma doença (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Essa ligação pode ocorrer por dois diferentes mecanismos: pelo modo de ligação covalente, que envolve a ligação direta ligante-DNA por suas bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato; e não covalente através de interações eletrostáticas com a cadeia fosfatídica do DNA; interações nos sulcos (*groove*) maior e menor da macromolécula, ou por intercalação, a qual ocorre quando uma molécula (poli)aromática planar se interpõe entre os pares de bases consecutivos do DNA, ligando-se perpendicularmente ao eixo da hélice (MUKHERJEE; MONDAL; SINGH, 2017).

Nesse contexto, desde a descoberta da estrutura do DNA, esta macromolécula tem sido considerada um dos principais alvos para diversas moléculas terapêuticamente importantes, as quais estão associadas a diferentes classes de drogas, que apresentam desde atividade antitumoral até ação como antibióticos (HASANZADEH; SHADJOU, 2016; REHMAN et al., 2015), uma vez que estas moléculas podem afetar a expressão gênica, facilitando e/ou inibindo qualquer uma das propriedades dos sistemas de transcrição. Segundo Sobha e colaboradores (2012), o mecanismo de ação de alguns agentes anticâncer está relacionado à ligação ao DNA da célula neoplásica, impedindo a replicação e conseqüentemente levando a apoptose da mesma.

Nesse sentido, vale ressaltar que o DNA também é um alvo farmacológico para quimioterapia (KENNARD, 1993), onde a primeira evidência de que o câncer poderia ser tratado por compostos químicos ocorreu em 1942 quando Goodman e Gilman, relataram a redução de um tumor (linfoma), após tratamento com a mecloretamina (uma mostarda nitrogenada) inspirada no gás mostarda usado como arma química na Primeira Guerra Mundial (CHABNER; ROBERTS JR, 2005). No entanto, a concepção da cura do câncer só ocorreu cerca de 20 anos depois, quando foi demonstrada a cura de linfomas, leucemias e até certo ponto, tumores sólidos, empregando a ciclofosfamida, clorambucil e outros quimioterápicos (DE VITA JR; CHU, 2008). Todos esses compostos citados possuem como principal mecanismo de interação a ligação com o DNA via modo covalente (metilação/alquilação).

Desde então, muitos fármacos para uso na quimioterapia foram aprovados para comercialização, porém a busca pelo quimioterápico ideal permanece até os dias atuais (BARRA; NETTO, 2015). Mesmo diante dos grandes avanços nessa área, muitos estudos ainda deverão ser realizados objetivando propor fármacos mais eficazes e seguros.

Diante deste cenário, estudos sobre a avaliação da interação de pequenas moléculas com o DNA foram identificados como um dos principais temas durante os últimos anos (DORRAJI; JALALI, 2013; ZHAO et al., 2014; HASSAN; RAUF, 2015; TEMERK et al., 2016; AFRIN et al., 2017; MORAWSKA et al., 2018), uma vez que a investigação do mecanismo de ação bem como o *screening* de moléculas biologicamente ativas pode contribuir para concepção de novos medicamentos DNA-alvo mais seletivos e eficientes.

Além do DNA, as proteínas também são alvos biológicos importantes, logo será descrito a seguir algumas informações essenciais acerca dos estudos de interação com essa macromolécula.

### 1.2.2 Proteínas: instrumentos que expressam a informação genética

As proteínas são as macromoléculas de maior abundância e que mediam praticamente qualquer processo celular, desempenhando inúmeras funções vitais (NELSON; COX, 2014). A maioria dos fármacos após ser administrado e entrar na corrente sanguínea, ligam-se as proteínas plasmáticas e/ou outros componentes do sangue, como os glóbulos vermelhos. Sabe-se também que há uma barreira que limita o meio intracelular e extracelular, denominado membrana celular, assim para que as moléculas de fármacos desempenhem sua função é necessário atravessar essa barreira, dependendo de inúmeros fatores, tais como solubilidade do composto bioativo, tempo de meia vida, estabilidade (DU et al., 2016), bem como, da magnitude da ligação com proteínas plasmáticas, uma vez que somente as moléculas de fármaco livres são capazes atingir o sítio de ligação (YANG et al., 2006). Uma elevada afinidade entre proteína e fármaco leva a uma diminuição na concentração de fármaco livre no sangue e consequentemente a redução no efeito farmacodinâmico (SJÖHOLM; LJTJNGSTEDT, 1973). Em contrapartida, uma afinidade baixa provoca um tempo de vida curto e uma distribuição pequena. Assim, a ligação de pequenas moléculas a diferentes proteínas é um fator primordial para a determinação da farmacocinética e farmacodinâmica de compostos biologicamente ativos (YANG et al., 2012).

A principais proteínas constituintes do plasma sanguíneo são as albuminas séricas, e sua interação com diferentes ligantes e moléculas vem despertando o interesse no meio científico. As proteínas carreadoras mais estudadas são a albumina do soro humano (HSA) e a albumina

do soro bovino (BSA, usada como modelo da HSA devido a elevada homologia entre as proteínas), as quais possuem como principal função o transporte de diversos compostos endógenos e exógenos, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, íons metálicos, entre outros (GALKINA; PROSKURNIN, 2017). Estudos acerca da interação supramolecular de fármacos com as proteínas desta classe são de fundamental importância na obtenção de informações sobre os complexos formados e previsão sobre o efeito terapêutico (ELSADEK; KRATZ, 2012). Gupta e Lis (2010), reportaram uma outra função da HSA como um valioso biomarcador para monitorar a fisiopatologia de muitas doenças, incluindo câncer, artrite reumatoide, isquemia, obesidade pós-menopausa e outras patologias que necessitam de monitoramento do controle glicêmico.

Além da interação com as albuminas, vale ressaltar a importância de estudos com a hemoglobina, a qual é a principal constituinte dos glóbulos vermelhos. Esta proteína é responsável pelo transporte reversível de oxigênio e de dióxido de carbono para manter o pH do sangue (CHEN; ZHAO; WANG, 2010). Os sistemas de administração de fármacos baseados em eritrócitos são especialmente eficientes na manutenção de fármacos ativos na circulação, na sua liberação por várias semanas e no direcionamento para células selecionadas (VILLA et al., 2016).

Assim, a avaliação da interação Hb-droga pode fornecer informações importantes sobre as características estruturais que determinam a eficácia terapêutica das drogas (ROSSI et al., 2016). Portanto, diante exposto pode-se inferir que a caracterização das interações entre proteínas e substâncias bioativas é fundamental em estudos pré-clínicos para obter informações básicas sobre a biodisponibilidade dessas moléculas bem como para a concepção de novos fármacos (TUNÇ; ÇETINKAYA; DUMAN, 2013).

O mapeamento dessas interações pode ser realizado empregando técnicas instrumentais, as quais apresentam princípios e características distintas, que serão discutidos a seguir.

### **1.3 Interação macromolécula-ligante, como avaliar?**

Para a avaliação da interação entre diferentes ligantes e macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos podem ser empregadas diversas técnicas instrumentais, como: UV-visível, fluorescência molecular, eletroquímica, ressonância magnética nuclear (RMN), microscopia de força atômica (MFA), calorimetria, espectroscopia no infravermelho (IV), dicroísmo circular, espectrometria de massas, eletroforese (capilar e em gel), espectroscopia Raman, difração de raios-X, entre outras (CHANDEL et al, 2018; REHMAN et al., 2015a). Adicionalmente, podem ser obtidas informações por meio de ensaios *in silico* como *docking* e

dinâmica molecular. Essas técnicas e estratégias têm sido utilizadas como importantes ferramentas para caracterizar a natureza do complexo supramolecular formado e os efeitos da interação sobre a estrutura das diferentes macromoléculas.

Desta forma, a Tabela 1 apresenta alguns parâmetros de interação que podem ser obtidos empregando as principais técnicas *in vitro* e *in silico* para avaliação da interação entre ligantes e DNA/proteínas, bem como as vantagens e desvantagens das mesmas.

Tabela 1- Informações, parâmetros e vantagens/desvantagens sobre as principais técnicas para avaliação da interação ligante-proteína/DNA.

Técnica / Estratégia	Informações		Parâmetros	Vantagens	Desvantagens	Referências
	DNA	Proteínas				
UV-vis	X	X	Avaliação sobre formação de complexo Constante de ligação Parâmetros termodinâmicos Mecanismo de <i>quenching</i> (classificação) Conformação proteica	Simplicidade, baixo custo.	Baixa sensibilidade e seletividade. Não permite inferir sobre o modo/sítio de ligação com DNA ou proteína diretamente. Para o DNA é necessário a desnaturação.	REHMAN et al., 2015a; WILLIAMS & DAVITER, 2013.
Fluorescência molecular	X	X	Mecanismo de <i>quenching</i> (se houver) Constante de ligação Número de sítios de ligação Parâmetros termodinâmicos e cinéticos Distâncias e forças intermoleculares Modo de ligação com DNA Mudanças conformacionais Sítio preferencial de ligação das proteínas	Elevada sensibilidade e seletividade, grande faixa de concentração linear.	Necessita da presença de espécies fluorescentes, mas pode-se recorrer ao uso de sondas, interferências espectrais são passíveis quando as espécies emitem na mesma região.	WILLIAMS; DAVITER, 2013; YANG; LI; SNYDER, 2012; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013.
Métodos eletroquímicos	X	X	Constante de ligação Modo de ligação Parâmetros cinéticos Avaliação de processos redox Reversibilidade ou não do processo Forças intermoleculares	Simplicidade, rapidez, elevada sensibilidade e precisão.	Detecção indireta; caso o ligante não seja eletroativo, pode-se trabalhar com sensor de DNA (pH ~4,5), não mimetizando as condições fisiológicas. Ao se utilizar biosensor é necessário produzi-lo para cada ligante diferente.	SILVA et al, 2012; REHMAN, et al., 2015a; FLOOD; KAIFER, 2012.
Ressonância magnética nuclear	X	X	Epítipo do ligante Região preferencial de interação Constante de ligação Modo de ligação Parâmetros termodinâmicos	Resultados podem ser obtidas em diferentes temperaturas, solventes, valores de pH e força iônica.	Baixa sensibilidade, alto custo, necessita de concentrações altas e solventes deuterados. Os ligantes avaliados devem apresentar boa solubilidade em água.	WANUNU; TOR, 2012; WILLIAMS; DAVITER, 2013.
Microscopia de força atômica	X	X	Mudanças conformacionais da proteína Alterações na morfologia do DNA Forças intermoleculares	Elevada resolução, precisão e sensibilidade.	Necessita de preparo específico da amostra, utilizando elevadas concentrações do DNA ou proteína.	GARCIA et al., 2010; WHITED; PARK, 2014.
Estudos calorimétricos	X	X	Parâmetros termodinâmicos Constante de ligação; Número de sítios Modo de ligação com o DNA	Elevada precisão Reprodutibilidade.	Baixa sensibilidade e uso de elevadas concentrações. A solubilidade dos ligantes em água é uma limitação. Processo lento, trabalhoso, baixo rendimento.	REHMAN et al., 2015a; DU et al., 2016.
Infravermelho	X	X	Conformação e estabilidade das macromoléculas Parâmetros de ligação	Amostras podem ser analisadas em diferentes estados de agregação, como sólidos ou em solução. Necessita de pequenas quantidades de amostra, é rápida e de fácil execução.	Diversas varreduras da mesma amostra. Uso de solventes deuterados para melhorar a resolução espectral	BARRA; NETTO, 2015; BARTH, 2007.

Medidas de viscosidade	X		Modo de ligação	Baixo custo e necessita de pequenas quantidades da amostra.	Fornecer apenas informações qualitativas.	SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013.	
Dicroísmo circular	X	X	Avaliação de mudanças estruturais e conformacionais das macromoléculas Modo de ligação com DNA	Elevada sensibilidade.	Elevado tempo de aquisição dos espectros.	REHMAN, et al., 2015a; WANUNU; TOR, 2012; AJMAL et al., 2017.	
Espectrometria de massas	X	X	Estequiometria do complexo Constante de ligação Modo de ligação com DNA	Rápido, elevada sensibilidade. Permite determinar seletividade o ligante frente a vários alvos. Pequenas quantidades de amostra.	Técnica destrutiva, baixa eficiência na taxa de ionização de amostras complexas.	YANG; LI; SNYDER, 2012; WANUNU; TOR, 2012.	
Eletroforese	Capilar	X	X	Modo de ligação e constante de ligação Formação de complexos Mudança na conformação, carga e peso molecular	Simplicidade, baixo custo, rápida e alta resolução.	Baixa reprodutibilidade e sensibilidade.	YANG; LI; SNYDER, 2012; KAŠICKA, 2018; JAUMOT; GARGALLO, 2012.
	Gel	X	X	Mudança na carga molecular da proteína Modo de ligação com DNA Formação de complexos			CHOWDH; HARDING, 2001; NEAGA et al., 2016.
Espectroscopia Raman	X	X	Modo de ligação com DNA Mudanças conformacionais da proteína Parâmetros termodinâmicos	Espectros são registrados utilizando água como solvente.	Baixa sensibilidade devido ao fraco espalhamento Raman	JANGIR et al., 2012; BUMBRAH; SHARMA, 2016.	
Difração de raios-X	X	X	Modo de ligação com DNA Estrutura tridimensional do complexo	Técnica bem estabelecida, interpretação mais fácil quando comparado a RMN (por exemplo).	Processo lento, de difícil manuseio. Soluções e comportamento de moléculas em solução não podem ser examinados. Limitada a obtenção de cristais em condições de difratar a luz.	CHOWDH; HARDING, 2001. WANUNU; TOR, 2012.	
Equilíbrio de diálise		X	Estequiometria e constante de ligação Parâmetros termodinâmicos	Simplicidade e o equilíbrio da ligação é alcançado	Processo lento e adsorção inespecífica.	YANG; LI; SNYDER, 2012.	
Docking molecular	X	X	Energia de ligação Alteração na conformação do ligante Estrutura espacial do complexo Região preferencial de ligação Modo de ligação com o DNA	Rapidez e baixo custo	Considera estrutura rígida e o vácuo como meio. Não considera efeito do solvente e grau de protonação das moléculas.	REHMAN et al., 2015a. DU et al., 2016.	
Ressonância de Plasmônica de superfície		X	Mudanças conformacionais na estrutura da proteína e parâmetros termodinâmicos	Cinética em tempo real	Requer imobilização das moléculas e se faz necessário a escolha entre afinidade de ligação e sensibilidade.	DU et al., 2016.	

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

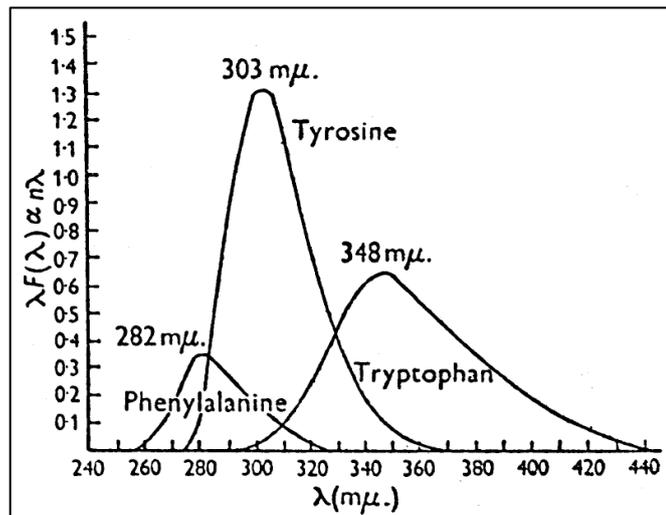
Embora exista um universo de técnicas capazes de fornecer informações acerca do processo de interação, a espectroscopia de fluorescência molecular é uma das técnicas mais empregadas neste tipo de avaliação, pois comparada às demais técnicas espectroscópicas, possui elevada sensibilidade, grande faixa de concentração linear, seletividade, além de suas medidas serem relacionadas ao ligante (macromolécula) livre, tratando-se de uma medida direta da espécie livre ou complexada, sem interferência espectral. Em geral, os ligantes que contêm grupos funcionais (poli)aromáticos possuem intensa fluorescência, em comparação com pequenas moléculas que possuam em sua estrutura radicais derivados de hidrocarbonetos alifáticos, carbonilas ou compostos altamente conjugados não aromáticos. Por fim, proteínas com resíduos de Trp e Tir apresentam fluorescência intrínseca possibilitando a avaliação do processo de interação de forma direta com a macromolécula.

Assim, os estudos relacionados à variação da intensidade do sinal em função de titulações fluorimétricas podem fornecer informações, como (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013): (i) O mecanismo de *quenching*, o qual refere-se a qualquer processo em que ocorre a diminuição na intensidade de fluorescência de uma espécie, podendo estar associado a vários mecanismos, como reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e extinção por colisão. A espécie que fornece um caminho não radioativo para desativação do fluoróforo é denominada *quencher*, isto é, ao entrar em contato com o fluoróforo no estado excitado essa espécie o desativa inibindo a emissão de fluorescência (LAKOWICZ, 2006); (ii) número de sítios de ligação relativo a estequiometria da interação macromolécula: ligante; (iii) constantes de ligação ( $K_b$ ), a qual fornece informações acerca da magnitude do complexo supramolecular formado; (iv) parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta G$ ), os quais são utilizados para a avaliação dos tipos de forças intermoleculares envolvidas no processo de interação bem como a espontaneidade do processo; (v) modo de ligação preferencial (intercalação, *groove* ou eletrostático para o DNA) e sítio preferencial de ligação (para proteínas); (vi) distâncias intermoleculares entre a molécula doadora e receptora energia; (vii) mudanças na conformação proteica, entre outros.

A definição de espécies fluorescentes em sistemas biológicos se iniciou em 1952, quando Debye e Edwards reportaram o fenômeno de fosforescência de aminoácidos aromáticos, e de acordo com a posição das bandas e tempos de decaimento propuseram a existência de fluorescência no ultravioleta. No entanto, a primeira concepção inequívoca em relação a essa característica espectroscópica de fluorescer foi concebida por Teale e Weber (1956), o qual avaliou a fluorescência dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e

triptofano) empregando fluorescência polarizada. O espectro de excitação de fluorescência e o rendimento quântico foram propostos como critérios para caracterizar uma espécie molecular em solução como uma entidade fluorescente, onde foi verificado que em meio neutro, os aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano apresentaram emissão em 282, 303 e 348  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Fig. 2). Além disso, apresentam cerca de 4, 21 e 20% de rendimento quântico respectivamente.

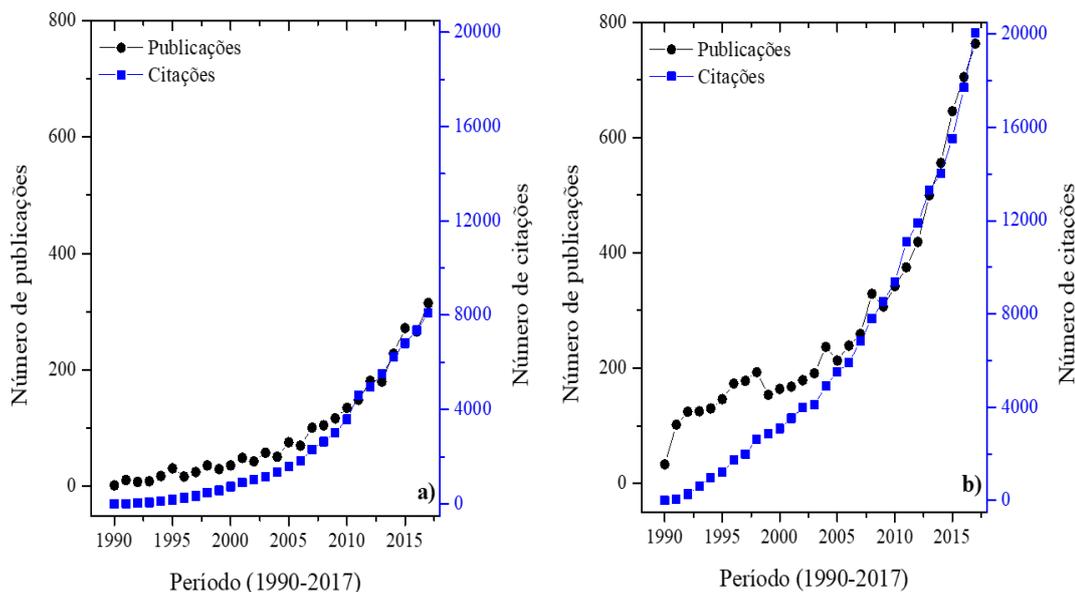
**Figura 2– Espectros de fluorescência dos aminoácidos aromáticos em meio aquoso.**



Fonte: Adaptado de Tealer e Weber, 1956.

A partir dessa evolução instrumental, diversos trabalhos foram sendo desenvolvidos empregando a técnica de fluorescência molecular. Para uma melhor visualização acerca do número de trabalhos e citações que relacionam esse tema, fez-se uma pesquisa na base de dados *Web of Science* no período de 1990 até 2017, uma vez que nos últimos 20 anos houve um notável crescimento no uso dessa técnica em ciências biológicas (LAKOWICZ, 2006). Para tanto, utilizou-se as seguintes palavras-chave: para os estudos de interação com o DNA “*molecular fluorescence e DNA interaction*” (Fig. 3a); e para proteínas devido ao grande número de trabalhos relacionados as palavras-chave “*molecular fluorescence e protein interaction*”, empregou-se termos mais específicos para a busca, como “*molecular fluorescence, HSA interaction ou hemoglobin interaction*” (Fig.3b).

**Figura 3 – Relação de publicações/citações que utilizaram a fluorescência molecular para a avaliação da interação de: a) DNA; b) proteínas.**



Fonte: Web of Science, 2020.

De acordo com as Figuras 3a e 3b, verifica-se que ocorreu um aumento gradativo tanto do número de trabalhos que relacionam esses temas, quanto do número de citações, indicando a relevância do trabalho científico. Um dos primeiros trabalhos que explorou a interação com ácidos nucleicos foi reportado por Akasaka e colaboradores (1970), onde foi relatada a interação da acridina *orange* (AO) com DNA de esperma de salmão empregando a técnica de fluorescência para avaliação da cinética da reação em uma escala de tempo de milissegundos (*stopped-flow mode*). Neste trabalho, é relatado o processo de dimerização da AO na parte externa do DNA e intercalação entre os pares de bases nitrogenadas da macromolécula. Na mesma década, Chien e colaboradores (1977), avaliaram a interação do fármaco bleomicina, o qual possui um amplo espectro de atividades antimicrobianas e atualmente é utilizado para tratamento de neoplasias em homens, com o DNA *Calf Thymus* (ctDNA, timo do bezerro) utilizando espectroscopia de fluorescência molecular. Neste estudo, foi reportado que o ctDNA atua como uma molécula *quencher*, suprimindo o sinal analítico da bleomicina, com uma constante de ligação de  $1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Além disso, foi verificado que este antibiótico interage com o ácido nucleico por intercalação. Em 1981, Bolton e colaboradores avaliaram a interação do fármaco antimalárico fluoroquina com diferentes tipos de DNA (ctDNA, tRNA e *poly(A)*), e verificaram que ocorre interação entre a macromolécula e o ligante, também sendo observado que a intercalação foi o modo preferencial neste processo, e desta forma, os autores creditaram a atividade biológica destas moléculas a interação com ácidos nucleicos.

Para as proteínas, um dos trabalhos pioneiros foi o reportado por Berns & Singer (1964), os quais avaliaram a interação de um corante (arsonato de (2-metoxi-6-cloro-9-acridinil) -*N-p*-aminobenzeno) com a albumina do soro bovino utilizando fluorescência molecular, e determinaram que ocorre interação entre a macromolécula e o ligante avaliado com uma constante de ligação na ordem de  $10^4 \text{ M}^{-1}$ . Quase uma década mais tarde, Stroupe & colaboradores (1975), investigaram a influência de esteroides na estrutura da globulina empregando a mesma técnica anteriormente citada, e verificaram que ocorre um *quenching* de fluorescência com formação de complexo supramolecular, e uma elevada constante de afinidade  $2,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ .

Apesar dos estudos de interação com DNA e proteínas terem iniciado em meados da década de 60, apenas após os anos 90 ocorreu uma maior difusão desse tema, o que pode estar relacionado tanto com os avanços da ciência para a melhoria da instrumentação das técnicas empregadas para avaliação, quanto na maior facilidade de obtenção das macromoléculas em sua forma pura.

Por fim, comparando os perfis das Figuras 3a e 3b, verifica-se que há maior número de publicações e citações nos estudos de interação com proteínas, sendo confirmado pelo índice H, o qual foi de 110 para o DNA e 151 para os estudos que abordam as proteínas. Essa ampla aplicabilidade das proteínas está relacionada ao fato de serem fluoróforos naturais, por meio dos resíduos de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (MUNISHKINA; FINK, 2007).

Em contrapartida, o DNA não apresenta fluorescência, logo as medidas analíticas são realizadas de forma indireta (*quenching* de fluorescência), com exceção de ligantes que aumentam a fluorescência ao se ligar à macromolécula, e desta forma, as medidas são realizadas de forma a monitorar o complexo formado (MARQUES et al., 2018). Diante desse fator, muitos trabalhos empregam a espectroscopia de absorção no UV-vis, que é uma das técnicas mais simples e amplamente utilizada na avaliação tanto da estabilidade do DNA quanto sua interação com ligantes (REHMAN et al., 2015b). No entanto, essa técnica não fornece informações precisas quando ligante e macromolécula absorvem radiação na mesma região. Como as medidas são baseadas na atenuação da radiação eletromagnética pela espécie absorvente, caso ligante, DNA e complexo formado apresentem comprimentos de onda de máxima absorção próximos, uma espécie pode influenciar na obtenção do sinal analítico da outra, causando interferência espectral e imprecisão nas medidas realizadas. Neste sentido, a aplicação da técnica no UV-vis para avaliação da interação de ligantes com DNA mostra variações mais acentuadas e melhor performance quando o ligante absorve preferencialmente no visível.

Esses dados são concordantes com o trabalho reportado recentemente por Galkina e Proskurnin, 2017, os quais relatam que a técnica de fluorescência molecular é utilizada majoritariamente (70%) nos estudos de interação com albuminas (proteínas), enquanto a técnica de absorção no UV-vis empregada principalmente nos ensaios com DNA (85%).

Portanto, a partir dessa abordagem acerca das técnicas que podem ser utilizadas para avaliar a interação, pode-se inferir que estas podem fornecer informações relevantes para mapear o processo de interação entre pequenas moléculas com DNA e proteínas, com destaque para a espectroscopia de fluorescência molecular e absorção no UV-vis visto que possuem maior aplicabilidade, sendo dessa forma, empregadas neste trabalho.

#### **1.4 Justificativa e objetivo geral do estudo proposto**

A importância de estudos utilizando estratégias/técnicas associadas à determinação de parâmetros quantitativos relacionados à interação com biomoléculas que atuam como alvos terapêuticos é uma área de fronteira da ciência, a qual versa sobre pesquisas relacionadas a seleção de candidatos a fármacos mais eficientes, *screening* de moléculas e implementação de alterações estruturais visando modular a atividade biológica desses compostos. Neste sentido, o estudo da interação com DNA e proteínas *in vitro* explorando diferentes técnicas espectroscópicas são recursos eficientes para inferir sobre possíveis mecanismos de ação quanto a atividade biológica ou toxicológica.

Assim, este trabalho buscou avaliar a interação entre compostos derivados dos pterocarpanos e piperidinas com o ctDNA (*Calf thymus*), bem como do timerosal com a hemoglobina humana, utilizando técnicas espectroscópicas, eletroforese e estudos teóricos, buscando compreender o mecanismo de ação dessas moléculas, uma vez que estas apresentam excelente atividade frente a diversas patologias.

## 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, Jun., 2017.
- AJMAL, M. R., et al. Insight into the Interaction of antitubercular and anticancer compound Clofazimine with Human Serum Albumin: spectroscopy and molecular modelling. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, India, v. 35, p. 46-57, Mai., 2016.
- AKASAKA, H.; SAKODA, M.; HIROMI, K. Kinetic studies on acridine orange-DNA interaction by fluorescence stopped-flow method. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Japão, v. 40, p. 1239-1241, Ago., 1970.
- ALAM, M. F.; VARSHNEY, S.; KHAN, M. A.; LASKAR, A. A.; YOUNUS, H. In vitro DNA binding studies of therapeutic and prophylactic drug citral. **International Journal of Biological Macromolecules**, India, v. 113, p. 300-308, Jul., 2018.
- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalointercaladores. **Revista Virtual de Química**, Brasil, v. 7, p. 1998-2016, Ago., 2015.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Suécia, v. 1767, p. 1073-1101, Jun., 2007.
- BAZZICALUPI, C., et al. Metals in supramolecular chemistry. **Inorganica Chimica Acta**, Espanha, v. 417, p. 3–26, Mar., 2014.
- BERNS, D. S.; SINGER, S. J. A fluorescence study of specific and nonspecific dye-protein interactions. **Immunochemistry**, Califórnia, v. 1, p. 209-217, Fev., 1964.
- BOLTON, P. H., et al. Interaction of the Antimalarial Drug Fluoroquine with DNA, tRNA, and Poly(a): <sup>19</sup>F-NMR Chemical-Shift and Relaxation, Optical Absorption, and Fluorescence Studies. **Biopolymers**, Califórnia, v. 20, p. 435-449, 1981.
- BUMBRAH, G. S.; SHARMA, R. M. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, India, v. 6, p. 209-215, Set., 2016.
- CHABNER, B. A.; ROBERTS JR. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, Estados Unidos, v. 5, p. 65-72, Jan., 2005.
- CHANDEL, T. I., et al. A mechanistic insight into protein-ligand interaction, folding, misfolding, aggregation and inhibition of protein aggregates: an overview. **International Journal of Biological Macromolecules**, India, v. 106, p. 1115-1129, Jan., 2018.
- CHEN, C.-Y.; ZHAO, B.; WANG, Z.-W. Interaction of thiacloprid with bovine hemoglobin using spectroscopic and molecular modeling methods. **Journal of Spectroscopy**, China, v. 24, p. 559-566, 2010.
- CHIEN, M.; GROLLMAN, A. P.; HORWITZ, S. B. Bleomycin-DNA Interactions: Fluorescence and Proton Magnetic Resonance Studied. **Biochemistry**, Nova York, v. 16, p. 3641-3647, 1977.
- CHOWDH, B. Z.; HARDING, S. E. **Protein-ligand interactions: structure and spectroscopy**. Estados Unidos: Oxford university Press, 2001.

- DE VITA JR, V. T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research**, New Haven, v. 68, p. 8643-8653, Out., 2018.
- DEBYE, P.; EDWARDS, J. O. A note on the phosphorescence of proteins. **Science**, v. 116, v. 143-144, 1952.
- DORRAJI, P. S.; JALALI, F. Investigation of the Interaction of Sertraline with Calf Thymus DNA by Spectroscopic Methods. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Irã, v. 24, p. 939-945, Jun., 2013.
- DU, X., et al. Insights into Protein-Ligand interactions: Mechanisms, Models, and Methods. **International Journal of Molecular Sciences**, China, v. 17 p. 144-178, Fev., 2016.
- ELSADEK, B.; KRATZ, F. Impact of albumin on drug delivery — New applications on the horizon. **Journal of Controlled Release**, Egito, v. 157, p. 4-28, Jan., 2012.
- FLOOD, A. H.; KAIFER, A. E. Supramolecular Electrochemistry. **Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials**, Hoboken: Wiley, 2012.
- GALKINA, P. A.; PROSKURNIN, M. A. Supramolecular interaction of transition metal complexes with albumins and DNA: Spectroscopic methods of estimation of binding parameters. **Applied Organometallic Chemistry**, Rússia, v. 32, p. 1-25, Fev., 2018.
- GARCIA, M. H., et al. New ruthenium(II) mixed metallocene derived complexes: Synthesis, characterization by X-ray diffraction and evaluation on DNA interaction by atomic force microscopy. **Inorganica Chimica Acta**, Espanha, v. 363, p. 3765–3775, Jun., 2010.
- GUPTA, D.; LIS, C. G. Pretreatment serum albumin as a predictor of cancer survival: A systematic review of the epidemiological literature. **Nutrition Journal**, Estados Unidos, v. 9, p. 1-16, Dez., 2010.
- HASANZADEH, M.; SHADJOU, N. Pharmacogenomic study using bio- and nanobioelectrochemistry: Drug–DNA interaction. **Materials Science and Engineering C**, Irã, v. 61, p. 1002-1017, Abr., 2016.
- 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., 2016.
- JANGIR, D. K., et al. Assessment of amsacrine binding with DNA using UV–visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Índia, v. 114, p. 38-43, Mai., 2012.
- JAUMOT, J.; GARGALLO, R. Experimental Methods for Studying the Interactions between G-Quadruplex Structures and Ligands. **Current Pharmaceutical Design**, Espanha, v. 18, p. 1900-1916, 2012.
- KAŠICKA, K. V. Electrophoresis: Proteins. **Encyclopedia of Toxicology**, Estados Unidos, v. 4, p. 546-548, 2014.
- KENNARD, O. DNA-drug interactions. **Pure and Applied Chemistry**, Reino Unido, v. 65, p. 1213-1222, 1993.
- LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3.ed. Baltimore: Springer, 2006.
- LEHN, J. M. **Química supramolecular conceitos e perspectivas**. Lisboa: Press, 1996.

- 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, Jan., 2018.
- McFEDRIES, A.; SCHWAID, A.; SAGHATELIAN, A. Methods for the Elucidation of Protein-Small Molecule Interactions. **Chemistry & Biology**, Estados Unidos, v. 20, p. 667-673, Mai., 2013.
- METZLER, D. E. **Biochemistry: The chemical reactions of living cells**. 2 ed. Estados Unidos: Academic Press, 2003.
- MORAWSKA, K., et al. Electrochemical and spectroscopic studies of the interaction of antiviral drug Tenofovir with single and double stranded DNA. **Bioelectrochemistry**, Polônia, v. 123, p. 227-232, Jun., 2018.
- MUKHERJEE, A.; MONDAL, S.; SINGH, B. Spectroscopic, electrochemical and molecular docking study of the binding interaction of a small molecule 5H-naphtho[2,1-f][1,2]oxathieaphine 2,2-dioxide with calf thymus DNA. **International Journal of Biological Macromolecules**, India, v. 101, p. 527-535, Mar., 2017.
- MUNISHKINA, L. A.; FINK, A. L. Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Estados Unidos, v. 1768, p. 1862-1885, Mar., 2007.
- NEAGA, I. O., et al. Study of nucleic acid-ligand interactions by capillary electrophoretic techniques: A review. **Talanta**, Bélgica, v. 148, p. 247-256, Fev., 2016.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6.ed. São Paulo: Sarvier, 2014.
- PORTUGAL, J. Challenging transcription by DNA-binding antitumor drugs. **Biochemical Pharmacology**, Espanha, v. 155, p. 336-345, Jul., 2018.
- REHMAN, S. U., et al. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, India, v. 576, p. 49-60, Jun., 2015a.
- 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**, India, v. 566, p. 7-14, Jan., 2015b.
- ROSSI, L.; Engineering erythrocytes for the modulation of drugs' and contrasting agents' pharmacokinetics and biodistribution. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Itália, v. 106, p. 73-87, Nov., 2016.
- SANTOS, R., et al. A comprehensive map of molecular drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, Reino Unido, v. 16, p. 19-34, Jan., 2017.
- SILVA, L. L., et al. Investigação eletroquímica e calorimétrica da interação de novos agentes antitumorais biscatiônicos com DNA. **Química Nova**, Brasil, v. 35, p. 1318-1324, Jun., 2012.
- SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Paquistão, v. 124, p. 1-19, Jul., 2013.
- SJÖHOLM, I.; LJUNGSTEDT, I. Studies on the Tryptophan and Drug-binding Properties of Human Serum Albumin Fragments by Affinity Chromatography and Circular Dichroism Measurements. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, p. 8434-8441, Mai., 1973.

SOBHA, S.; MAHALAKSHMI, R.; RAMAN, N. Studies on DNA binding behaviour of biologically active transition metal complexes of new tetradentate N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> donor Schiff bases: Inhibitory activity against bacteria. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, India, v. 92, p. 175-183, Feb., 2012.

STEED, J. W.; ATWOOD, J. L.; GALE, P. A. Definition and Emergence of Supramolecular Chemistry. **Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials**, Hoboken: Wiley, 2012.

STROUPE, S.D; CHENG, S.-L.; WESTPHAL, U. Steroid-Protein Interactions: Fluorescence Quenching of Progesterone-Binding Globulin and  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein Upon Binding of Steroids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Estados Unidos, v. 168, p. 473-482, Jan., 1975.

TEALE, F. W. J.; WEBER, G. Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids. **Biochemical Journal**, v. 65, p. 476-482, Jun., 1956.

TEMERK, Y., et al. Interactions of an anticancer drug lomustine with single and double stranded DNA at physiological conditions analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Egito, v. 769, p. 62-71, Mar., 2016.

THOMAS, R. K.; SUKUMARAN, S.; SUDARSANAKUMAR, C. Photobehaviour and in vitro binding strategy of natural drug, chlorogenic acid with DNA: A case of groove binding. **Journal of Molecular Structure**, India, v. 1178, p. 62-72, Oct., 2018.

TUNÇ, S.; ÇETINKAYA, A.; DUMAN, O. Spectroscopic investigations of the interactions of tramadol hydrochloride and 5-azacytidine drugs with human serum albumin and human hemoglobin proteins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Turquia, v. 120, p. 59-65, Jan., 2013.

VILLA, C. H., et al. Red blood cells: Supercarriers for drugs, biologicals, and nanoparticles and inspiration for advanced delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Estados Unidos, v. 106, p. 88-103, Mar., 2016.

WANUNU, M.; TOR, Y. **Methodos for Studying Nucleic Acid/Drug Interactions**. Estados unidos: CRC Press, 2012.

WHITED, A. M.; PARK, P. S.-H. Atomic force microscopy: A multifaceted tool to study membrane proteins and their interactions with ligands. **Biochimica et Biophysica Acta**, Estados Unidos, v. 1838, p. 56-68, Jan., 2014.

WILLIAMS, M.A.; DAVITER, T. **Protein-ligands interactions – Methods and applications**. 2 ed. London: Humana Press, 2013.

YANG, A.-P., et al. Interaction of Irbesartan with Bovine Hemoglobin Using Spectroscopic Techniques and Molecular Docking. **Journal of Spectroscopy**, China, v. 27, p. 119-128, 2012.

YANG, G. X.; LI, X.; SNYDER, M. Investigating metabolite–protein interactions: An overview of available techniques. **Methods**, Estados Unidos, v. 57, p. 459-466, Jun., 2012.

YANG, X.-X., et al. Monitoring drug–protein interaction. **Clinica Chimica Acta**, Singapura, v. 365, p. 9-29, Mar., 2006.

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.

---

# Seção 2

# Experimental

---

## SEÇÃO 2: EXPERIMENTAL

### 2.1 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados nos ensaios são de grau analítico de pureza. As soluções foram preparadas com água ultrapura com resistividade específica de 18,2 M $\Omega$  cm, a partir de um sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA, USA).

#### 2.1.1 Estudos de interação com DNA

O DNA sadio (*Calf thymus*, ctDNA)<sup>2</sup> tipo I na forma de fibras (Sigma-Aldrich) foi empregado nos estudos de interação. Este DNA é preparado a partir de tecido do timo de vitela de gênero não especificado. Para o preparo da solução de ctDNA, foram pesados entre 1,0-2,0 mg (SHAHABADI; MOGHADAM, 2012) do ácido nucleico e solubilizou-se em tampão fosfato (10 mM, pH = 7,40  $\pm$  0,10) para os ensaios com o pterocarpano LQB-223; e para as piperidinas empregou-se tampão Tris (10 mM, pH = 7,40  $\pm$  0,10) contendo NaCl (100 mM). Em seguida, as soluções foram armazenadas em frascos 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 mol L<sup>-1</sup> empregada para ajuste da força iônica foi preparada a partir da dissolução de 2,9223 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.

Para o preparo da solução tampão fosfato (10 mM, pH = 7,40  $\pm$  0,10) pesou-se 0,3549 g de fosfato de sódio dibásico anidro (Dinâmica) e solubilizou-se em água ultrapura. Ajustou-se o pH para 7,40 com uma solução de HCl. O sistema resultante foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL avolumando-se com água.

Para o preparo da solução tampão Tris (50 mM, pH = 7,40  $\pm$  0,10) pesou-se 1,5142 g de Tris (Sigma-Aldrich) e solubilizou-se em água ultrapura. Retirou-se uma alíquota de 25 mL da solução de NaCl (1,0 mol L<sup>-1</sup>) 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 250 mL.

Os derivados purificados das piperidinas e pterocarpano, foram cedidos pelo Prof<sup>o</sup> Ângelo de Fátima do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais; e

---

<sup>2</sup>É considerado o tipo de DNA de maior escolha nos estudos de interação devido à similaridade com o DNA de placenta humana, obtendo-se as seguintes proporções das bases (ctDNA/DNA placenta humana): AT (58,1 %), CG (41,9 %); AT (58%), CG (42%), respectivamente.

pela Prof<sup>a</sup> Camilla D. Buarque do Departamento de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, respectivamente. Estes compostos foram sintetizados pelos respectivos grupos de pesquisa e já tem suas rotas sintéticas determinadas e otimizadas, assim como a completa e inequívoca caracterização física baseada em técnicas espectroscópicas (infravermelho, ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectrometria de massas) (BUARQUE et al., 2011 e 2014; DAS et al., 2018). De forma geral, para o preparo da solução estoque destes compostos, pesou-se 1,0 mg e solubilizou-se em 2,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Após o preparo, as soluções estoques foram armazenadas em tubo criogênico (2 mL), sob refrigeração a  $4^\circ\text{C}$  (SILVA et al., 2016).

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-Aldrich) 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 para evitar a oxidação do íon iodeto. A solução final foi avolumada para 50 mL.

Para o preparo das soluções estoque das sondas brometo de etídio (2,0 mM, Sigma-Aldrich) e berenil (2,0 mM, Sigma-Aldrich) foram pesados 1,6 mg e 2,3 mg, respectivamente, e solubilizado em água ultrapura, sendo armazenadas em tubos criogênicos (2,0 mL). Todas as diluições posteriores foram realizadas no tampão utilizado para cada classe de composto.

### 2.1.2 Estudos de interação com proteína

Para os estudos de interação com proteína, empregou-se a hemoglobina humana (Sigma-Aldrich), sendo sua solução preparada por dissolução de 0,0100 g da mesma em 10 mL de água ultrapura; e a solução de timerosal mediante a pesagem de 0,0100 g em 10 mL de tampão fosfato (10 mM,  $\text{pH} = 7,40 \pm 0,10$ ) contendo NaCl (100 mM), o qual foi preparado de modo análogo aos estudos de interação com ctDNA.

As soluções estoque de ANS (3,16 mM, Sigma-Aldrich) e NEM (16,5 mM, Sigma-Aldrich,) foram preparadas pesando-se 0,0100 g de cada reagente e solubilizando em DMSO e etanol, respectivamente. As diluições posteriores foram realizadas no tampão citado anteriormente.

Para o ensaio dos competidores foram empregados: cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ , Vetec), acetato de magnésio ( $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , Merck), fosfato de potássio tribásico ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ , Vetec), bicarbonato de potássio ( $\text{KHCO}_3$ , Merck), D-glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , Merck), cloreto de ferro(III) ( $\text{FeCl}_3$ , Sigma-Aldrich-Aldrich), ácido oleico ( $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ , Vetec), linoleico ( $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ , Vetec),

palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ , Vetec) e esteárico ( $C_{18}H_{36}O_2$ , Vetec). Essas soluções foram preparadas por dissolução de 0,0100 g de cada reagente solubilizado em água ultrapura, exceto os ácidos graxos os quais foram solubilizados em etanol.

## 2.2 Equipamentos utilizados

Nos estudos de interação com ctDNA e hemoglobina humana, as medidas espectrofluorimétricas foram realizadas em um espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) utilizando cubetas de quartzo com capacidade de 4 mL, com 10 mm de caminho óptico. Nos ensaios com ctDNA empregando o pterocarpano LQB-223, as medidas também foram realizadas em um espectrofluorímetro com leitor de microplacas (EnSpire<sup>®</sup>, Perkin Elmer, Alemanha) equipado com lâmpada de xenônio, empregando microplacas de 96 poços de 200  $\mu$ L.

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

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. Nos estudos de avaliação da temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) do ctDNA, as amostras foram aquecidas utilizando um banho sistema de aquecimento modelo SP12/200ED (SPlabor, Brasil). O ensaio de viscosidade foi realizado utilizando um viscosímetro Cannon-Fenske (modelo 50) imerso em banho termostático a  $25,8 \pm 0,2^\circ$  C.

Nos ensaios da dispersão dinâmica de luz (DLS) empregou-se o instrumento (Microtrack, EUA) Zetatrack (5 mW Solid-State Diode lasers  $\lambda$ , 780 nm) para medir o raio hidrodinâmico da hemoglobina na presença de timerosal.

Nos estudos de eletroforese em gel de agarose para o ctDNA, as bandas foram visualizadas pelo Odyssey FC Imaging System (LI-COR). E para os ensaios de eletroforese da hemoglobina utilizou-se uma cuba de eletroforese Vert i10 BioRad (Loccus, Brasil).

A captação de oxigênio pela hemoglobina humana pura foi medida polarograficamente utilizando-se um eletrodo do tipo OXIGY conectado a um oxígrafo (Hansatech Instrument, Inglaterra), em uma câmara de vidro fechada e termostatizada ( $28^\circ$  C) contendo tampão fosfato (pH 7,4), equipada com agitador magnético, num volume final de 1 mL.

Para o ensaio de dicroísmo circular empregou-se um espectropolarímetro Jasco (modelo J-815), com sistema de resfriamento tipo Peltier e cubetas de quartzo de 1.0 mm e 10 mm. Cada espectro representa a média de 4 scans a 50 nm min<sup>-1</sup>.

## 2.3 Procedimentos

### 2.3.1 Estudos de interação com DNA

#### 2.3.1.1 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<sup>-1</sup> a partir do sinal de absorvância em 260 nm após diluição na proporção de 1:100. Para avaliar se a solução de ctDNA estava livre de proteínas, calculou-se a razão do sinal de absorvância a 260 e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), obtendo valores entre 1,8-1,9 (SHAHABADI; HADIDI, 2012).

#### 2.3.1.2 Interação ctDNA-ligante por fluorescência

Para as duas classes de compostos avaliadas nesse trabalho, as titulações espectrofluorimétricas foram executadas mantendo-se constante a concentração do ligante e variando-se gradativamente a quantidade de ctDNA (Tabela 1). Após o tempo de incubação (60 min) as medidas analíticas foram realizadas a temperatura ambiente para as piperidinas e em três temperaturas (22, 30 e 38°C) para o pterocarpano, utilizando os seguintes parâmetros instrumentais no leitor de microplacas: altura (h) de 6,3 mm e número de *flashes* igual a 200.

#### 2.3.1.3 Estudos por UV-vis

Para avaliar a formação do complexo, realizou-se medidas das absorvâncias para os ligantes livres (10 µM), ligados ao ctDNA, bem como do ctDNA livre (100 µM). Os espectros UV-vis dos ligantes, complexos e ctDNA foram registrados na faixa de comprimento de onda de 220-400 nm, com tampão fosfato (10 mM, pH = 7,40 ± 0,10) como a solução do branco.

#### 2.3.1.4 Avaliação do modo de ligação ctDNA-ligante

Para avaliar o modo de ligação dos compostos com o ctDNA, utilizou-se uma solução estoque de KI (0,3 mol L<sup>-1</sup>) contendo 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, mantendo-se constante a concentração dos compostos e aumentando a concentração de iodeto de potássio (Tabela 1) na presença e ausência de ctDNA. No ensaio de competição, empregou-se uma solução de brometo de etídio (EB, 2,0 mM), mantendo fixo a concentração da sonda e da macromolécula com adições crescentes dos ligantes avaliados (Tabela 1).

**Tabela 1- Concentrações utilizadas nos ensaios realizados para cada classe de compostos avaliada.**

Classe	Concentrações utilizadas		
	Titulação fluorimétrica	KI	EB
Pterocarpano	$C_{\text{composto}} = 20 \mu\text{M}$	$C_{\text{composto}} = 20 \mu\text{M}$	$C_{\text{EB}} = 3 \mu\text{M}$
	$C_{\text{ctDNA}} = 53 \text{ a } 848 \mu\text{M}$	$C_{\text{ctDNA}} = 50 \mu\text{M}$	$C_{\text{ctDNA}} = 2 \mu\text{M}$
		$C_{\text{KI}} = 20 \text{ a } 200 \text{ mM}$	$C_{\text{composto}} = 2 \text{ a } 20 \mu\text{M}$
Piperidinas	$C_{\text{composto}} = 10 \mu\text{M}$	$C_{\text{composto}} = 10 \mu\text{M}$	$C_{\text{EB}} = 2 \mu\text{M}$
	$C_{\text{ctDNA}} = 10 \text{ a } 200 \mu\text{M}$	$C_{\text{ctDNA}} = 100 \mu\text{M}$	$C_{\text{ctDNA}} = 6 \mu\text{M}$
		$C_{\text{KI}} = 15 \text{ a } 150 \text{ mM}$	$C_{\text{composto}} = 10 \text{ a } 60 \mu\text{M}$

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Por transferência de energia de contato, os espectros de excitação e absorção foram medidos para o composto avaliado, ctDNA livre e as sondas berenil e brometo de etídio na ausência e presença do DNA, numa faixa de 200 a 350 nm. A concentração do composto/sondas foi de 10  $\mu\text{M}$ , enquanto para o ctDNA foi de 100  $\mu\text{M}$ . Os parâmetros instrumentais utilizados na espectroscopia de fluorescência molecular foram estabelecidos  $\lambda_{\text{em}}$  (berenil) = 460 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  (EB) = 590 nm e  $\lambda_{\text{em}}$  (LQB-223) = 400 nm. Nos estudos de avaliação da temperatura de desnaturação ( $T_m$ ), as soluções foram aquecidas lentamente de 35 a 100°C, e a absorvância foi monitorada a 260 nm para amostras contendo ctDNA 20  $\mu\text{M}$  na ausência e presença de LQB-223 (40  $\mu\text{M}$ ) (SARWAR et al., 2015).

### 2.3.1.5 Eletroforese em gel de agarose

Os ensaios de eletroforese (tanto para DNA quanto hemoglobina) foram realizados em colaboração com o Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (UFAL). O ctDNA (5  $\mu\text{M}$ ) foi incubado com o LQB-223 em diferentes proporções (1: 1, 1: 2,5, 1: 5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1: 100, 1: 125, 1: 150, 1: 175 e 1: 200). Posteriormente foi submetido ao ensaio de deslocamento de mobilidade eletroforética através de géis de agarose a 1% (m/m) com tampão de corrida TEA (mistura de Tris base, ácido acético e EDTA), tensões entre 40 e 80 V e corado com brometo de etídio (0,3  $\text{pg mL}^{-1}$ ).

### 2.3.1.6 Ensaios biológicos

Os derivados piperidínicos foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa frente a sete linhagens de células tumorais humanas, sendo estas: mama (MCF-7), ovário resistente

(NCI-ADR/RES), ovário (OVCAR-03), pulmão (NCI-H460), cólon (HT-29), próstata (PC-3) e glioma (U251), além da célula normal HaCat, obtidas junto ao Frederick Cancer Research & Development Center – National Cancer Institute - Frederick, MA, USA, onde os ensaios de atividade biológica foram realizados no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP). Todos os compostos foram avaliados em triplicata, utilizando como controle positivo o quimioterápico doxorrubicina, e a concentração que inibe 50% do crescimento celular ( $GI_{50}$ ) foi determinada por meio da análise de regressão linear da curva dose-resposta para cada linhagem celular. A partir da razão entre a dose tóxica para 50% das células e sua atividade antiproliferativa foi possível obter o índice de seletividade dessa classe de compostos. A síntese, caracterização e resultados biológicos destas moléculas foram publicadas recentemente (DAS et al., 2018).

O pterocarpano LQB-223 foi testado quanto a sua atividade antiproliferativa frente às linhagens de leucemia promielocítica (HL-60), leucemia mieloide crônica (K-562), carcinoma de cólon (HCT-8), glioblastoma (SF-295) e melanoma (MDA-MB435) obtidas pelo mesmo centro de pesquisas citado anteriormente. A análise foi realizada em triplicata, utilizando a doxorrubicina como controle positivo, sendo a síntese, caracterização e resultados biológicos publicados por Buarque e colaboradores (2011 e 2014).

#### 2.3.1.7 Estudos teóricos

Os estudos teóricos (*docking* e dinâmica molecular) foram realizados em colaboração com o Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamentos e o Laboratório de Química Medicinal.

Assim, as coordenadas iniciais para a construção do modelo molecular foram obtidas a partir da estrutura cristalina de raios-X do DNA sintético dodecâmero d(CGCGAATTCGCG, PDB 1BDNA) obtida a partir do *Protein Data Bank* com 1,9 Å de resolução.

Os átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura cristalina do DNA usando o programa DESMOND ([www.deshawresearch.com/downloads/download\\_desmond.cgi/](http://www.deshawresearch.com/downloads/download_desmond.cgi/)). Os valores de pKa da estrutura do 1BNA foram calculados através do programa empírico PROPKA3.1 em condições fisiológicas (BAS; ROGERS; JENSEN, 2008; OLSSON et al., 2011). Um total de 22 contra íons ( $Na^+$ ) foram colocados em posições eletrostáticas ótimas por todo o sistema, para obter eletroneutralidade. Finalmente, o sistema completo foi colocado em uma caixa ortorrômbica de moléculas de água ( $x = 43,8$ ;  $y = 44,9$ ;  $z = 60,9$  Å).

As moléculas de DNA e água foram descritas pelo campo de força OPLS-2005, implementado no programa DESMOND. O sistema foi relaxado por 10 ns por meio do

Quantum Mechanic/Molecular Mechanic Molecular Dynamic a 300 K, pressão constante (1 atm) usando o modelo Simple Point Charge (SPC) e NaCl a uma concentração de 100 mM. As alterações conformacionais do sistema durante as simulações foram monitoradas pelo desvio médio da raiz (RMSD), como mostra a Equação 1:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N m_i (r_i - r_i^0)^2}{\sum_{i=1}^N m_i}} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde  $m_i$  representa a massa do átomo, e  $r_i^0$  e  $r_i$  são as coordenadas do átomo  $i$  no estado de referência e durante as simulações de MD, respectivamente (AJLOO et al., 2015).

### 2.3.2 Estudos de interação com proteína

#### 2.3.2.1 Avaliação da interação hemoglobina-timerosal por fluorescência molecular

Na titulação espectrofluorimétrica, manteve-se fixa a concentração da proteína (4  $\mu\text{M}$ ) e adicionou-se incrementos crescentes de timerosal ao meio (0-800  $\mu\text{M}$ ), empregando como parâmetro instrumental  $\lambda_{\text{exc}} = 260 \text{ nm}$ , e janela (slit) de excitação e emissão ajustados em 10 e 5 nm, respectivamente.

#### 2.3.2.2 Método de Job

Neste ensaio variou-se a fração molar das duas espécies (hemoglobina e timerosal) de 0 a 1, mantendo a soma das concentrações fixa em 10  $\mu\text{M}$ .

#### 2.3.2.3 Avaliação do mecanismo de interação preferencial: ensaio de Ellman (determinação de tióis livres)

Para quantificar os grupos tióis livres na Hb (2  $\mu\text{M}$ ) empregou-se o ensaio de Ellman, utilizando como reagente o DTNA monitorando-se os sinais de absorvância em 344 nm. A cisteína foi utilizada como referência para a construção da curva analítica, onde manteve-se fixa a concentração de DTNA (10  $\mu\text{M}$ ) e variou-se a concentração de cisteína (1 a 20  $\mu\text{M}$ ). Além disso, avaliou-se a adição dos reagentes EtHgCl (8  $\mu\text{M}$ ), NEM (16  $\mu\text{M}$ ), ATS (5  $\mu\text{M}$ ) e TH (8  $\mu\text{M}$ ) quanto ao conteúdo de grupos tióis livres.

#### 2.3.2.4 Avaliação de mudanças conformacionais na estrutura da proteína

Os espectros de absorção da proteína livre e ligada ao timerosal, bem como do ligante livre foram registrados na faixa de comprimento de onda de 200-600 nm, com tampão fosfato (10 mM, pH = 7,40  $\pm$  0,10, com 100 mM de NaCl) como a solução do branco.

No estudo por fluorescência tridimensional (3D), os espectros de emissão em 3D da fluorescência intrínseca da Hb (4  $\mu\text{M}$ ) na ausência e na presença timerosal (40  $\mu\text{M}$ ) foram obtidos empregando uma faixa de comprimento de excitação de 220-450 nm e de emissão de 220-500 nm.

Nos ensaios por fluorescência sincronizada, os espectros foram obtidos por meio da variação simultânea dos monocromadores de emissão e excitação. O valor do  $\Delta\lambda$  ( $\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{exc}}$ ) entre os comprimentos de onda de emissão e excitação foi mantido fixo, sendo aplicado um  $\Delta\lambda = 15$  nm e  $\Delta\lambda = 60$  nm para monitorar os resíduos de tirosina e triptofano, respectivamente (WANG et al., 2013).

Para o ensaio de dicroísmo circular a concentração da hemoglobina foi de 4  $\mu\text{M}$ , medindo-se na faixa de 190 a 240 nm; e para monitorar a banda de Soret se utilizou cubeta com caminho óptico de 10 mm (Hb = 5  $\mu\text{M}$ , 370 a 440 nm).

Para calcular a distância crítica entre o doador (fluoróforos da Hb) e receptor de energia (timerosal) durante o processo de interação realizou-se o ensaio baseado na Transferência de Energia por Ressonância de fluorescência (FRET) (AJMAL et al., 2016), realizando espectros de absorção e emissão do ligante (20  $\mu\text{M}$ ) e proteína (10  $\mu\text{M}$ )/complexo, respectivamente.

#### 2.3.2.5 Estudo de competição

Nos estudos de competição avaliou-se o efeito de 10 espécies presentes no plasma/soro humano, são elas: Ca(II), Mg(II), ânion fosfato e hidrogenocarbonato, glicose, Fe(III), ácido oleico, linoleico, palmítico e esteárico. A concentração da proteína foi fixada em 4  $\mu\text{M}$ , com adições crescentes de timerosal (10-400  $\mu\text{M}$ ), e diferentes proporções dos competidores. Utilizou-se como parâmetro de avaliação a razão das constantes de ligação na presença e ausência do competidor.

#### 2.3.2.6 Avaliação de efeitos químicos no processo de interação Hb-TH

##### 2.3.2.6.1 Avaliação de sítios hidrofóbicos da hemoglobina

Para avaliação da hidrofobicidade da hemoglobina, utilizou-se como sonda o ANS (ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfonato), mantendo-se fixa a concentração da proteína (4  $\mu\text{M}$ ) e do timerosal (4  $\mu\text{M}$ ), com adições crescentes da sonda (4-256  $\mu\text{M}$ ), empregando como parâmetros instrumentais:  $\lambda_{\text{ex}} = 360$  nm e  $\lambda_{\text{em}} = 475$  nm, e janela (slit) de excitação e emissão ajustados em 10 e 10 nm, respectivamente.

#### 2.3.2.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A técnica de eletroforese foi utilizada para avaliar o efeito da migração eletroforética da hemoglobina (61,5  $\mu\text{M}$ ) na ausência e na presença do timerosal (61,5  $\mu\text{M}$  - 6,15mM). As amostras foram aplicadas em um gel com 14% de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) em condições não – desnaturante (sem SDS e  $\beta$ -mercapto etanol no tampão de amostra). Empregou-se uma alíquota de 30  $\mu\text{L}$  da amostra, e a concentração de SDS no tampão do eletrodo foi reduzida a 50% (0,75 g) da concentração final. A eletroforese foi realizada a uma corrente constante de 90 mV.

#### 2.3.2.6.3 Análise de Dispersão Dinâmica da Luz (DLS)

Esse ensaio foi realizado em colaboração com o Grupo de Catálise e Reatividade Química, onde foi avaliado o raio hidrodinâmico da hemoglobina (4  $\mu\text{M}$ ) na presença e ausência de diferentes concentrações de timerosal (4 e 200  $\mu\text{M}$ ). Após o preparo das amostras com diferentes proporções do ligante, as mesmas são passadas por um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  e inseridas em uma cubeta de 1,5 mL. O software foi programado para realizar a média de 30 corridas, cada uma com duração de 15 s.

#### 2.3.2.7 Avaliação dos efeitos biológicos no processo de interação Hb-TH

##### 2.3.2.7.1 Influência do timerosal no processo de glicação *in vitro*

Esse ensaio foi executado em colaboração com o Laboratório de Eletroquímica, onde a glicação *in vitro* da hemoglobina (Hb) foi realizada, de acordo com o método descrito por Sahebi e Divsalar (2016), com algumas modificações. As amostras de Hb (25  $\mu\text{M}$ ) foram preparadas por incubação com glicose e frutose (80 mM) no escuro a 37 °C, com agitação constante por 1 semana. A glicação da Hb foi então avaliada na presença e ausência de timerosal em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25 e 50  $\mu\text{M}$ ). Todas as amostras foram preparadas em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) e a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) foi quantificada empregando os parâmetros instrumentais:  $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

##### 2.3.2.7.2 Avaliação de mudanças estruturais empregando Tioflavina T (ThT)

A fluorescência da tioflavina T (ThT) foi mensurada de acordo com o método descrito por Sahebi e Divsalar (2016) com algumas modificações, para monitorar a agregação da Hb. A concentração final de proteína na amostra foi de 5  $\mu\text{M}$  enquanto a concentração de ThT foi de

15  $\mu\text{M}$ . A intensidade de fluorescência das amostras foi então detectada em  $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 2.3.2.7.3 Avaliação da capacidade de ligação a $\text{O}_2$

Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o Laboratório de Bioenergética “Anibal Vercesi” da UFAL. A hemoglobina humana (Hb) foi usada a 15  $\mu\text{M}$  preparado em atmosfera inerte (argônio). Os eritrócitos (Eri) de voluntários sadios (CAE 02840318.2.0000.5013) foram obtidos por punção venosa em tubos contendo EDTA, sendo a concentração proteica igual 325  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O plasma foi descartado e os eritrócitos foram submetidos a quantificação de proteínas totais. Em todos os ensaios foi utilizado tampão fosfato (10 mM com NaCl 100 mM a  $\text{pH} = 7,4$ ) isento de oxigênio. A dosagem de proteína seguiu o método espectrofotométrico (595 nm) de Bradford (1976), o qual baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorvância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorvância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA (2mg/mL) foi utilizada como padrão.

As amostras de sangue venoso de voluntários foram obtidas através de punção de veia em tubos com vácuo (Olen) contendo anticoagulante EDTA. Para separar os eritrócitos do plasma, as amostras foram centrifugadas (modelo 80-2B CENTRILAB, Brasil) a 1400 rpm por 10 min a temperatura ambiente.

Devido a capacidade de ligação do oxigênio com a hemoglobina, a mesma foi diluída em tampão fosfato preparado em atmosfera inerte. Para isso, o tampão fosfato (10 mM,  $\text{pH} = 7,40 \pm 0,10$ ) foi submetido a borbulhamento de argônio durante 15 min, sob agitação, para que o oxigênio do tampão fosse expulso. Dessa forma, a diluição da hemoglobina, foi realizada próximo do experimento. Os experimentos com hemoglobina humana pura (5  $\mu\text{M}$ ) foram realizados a 28°C em tampão fosfato (10 mM,  $\text{pH} = 7,40 \pm 0,10$ ; com 100 mM de NaCl). Para testar o efeito do timerosal (preparado em tampão fosfato desoxigenado) na captação de oxigênio da hemoglobina, foram realizados ensaios com concentrações de 1,24  $\mu\text{M}$  e 2,49  $\mu\text{M}$  de timerosal/mL de tampão. A hemoglobina foi incubada com o timerosal, protegida da luz durante 3 min e 5 min antes do ensaio. A concentração de hemoglobina foi determinada por espectrofotometria empregando um  $\epsilon = 3,31 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ .

## **2.4 Tratamento dos dados**

Após a aquisição dos dados, todos os resultados foram tratados empregando o programa Origin Lab versão 9.0 (Northampton, USA) e o Excel 2016 (Microsoft Office), onde foi possível obter informações para o cálculo dos parâmetros de ligação dos compostos ao ctDNA e TH-Hb.

## REFERÊNCIAS

- AJLOO, D. et al. Synthesis characterization, spectroscopy, cytotoxic activity and molecular dynamic study on the interaction of three palladium complexes of phenanthroline and glycine derivatives with calf thymus DNA. **Inorganica Chimica Acta**, Irã, v. 430, p. 144-160, Mai., 2015.
- AJMAL, M. R. et al. Interaction of new kinase inhibitors cabozantinib and tofacitinib with human serum alpha-1 acid glycoprotein. A comprehensive spectroscopic and molecular Docking approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, India, v. 159, p. 199-208, Abr., 2016.
- BAS, D. C.; ROGERS, D. M.; JENSEN, J. H. Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. **Proteins**, França, v. 73, p. 765-783, Nov., 2008.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, Georgia, v. 72, p. 248-254, Mai., 1976.
- BUARQUE, C. D. et al. 11a- N-Tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223), a promising prototype for targeting MDR leukemia cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Brasil, v. 78, p. 190-197, Mar., 2014.
- BUARQUE, C. D. et al. Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.19, p. 6885-6891, Set., 2011.
- DAS, S. et al. Highly functionalized piperidines: Free radical scavenging, anticancer activity, DNA interaction and correlation with biological activity. **Journal of Advanced Research**, Brasil, v. 9, p. 51-61, Jan., 2018.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, Reino Unido, v. 227, p. 680-685, Ago., 1970.
- OLSSON, M. H. M. et al. PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, Dinamarca, v. 7, p. 525-537, Jan., 2011.
- SAHEBI E DIVSALAR. Synergistic and inhibitory effects of propolis and aspirin on structural changes of human hemoglobin resulting from glycation: an in vitro study. **Journal of the Iranian Chemical Society**, Irã, v.13, p. 2001–2011, Jun., 2016.
- SARWAR, T. et al. Multi-spectroscopic and molecular modelling studies on the interaction of esculetin with calf thymus DNA. **Molecular BioSystems**, India, v. 11, p. 522–531, 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)  $\beta$ -carbolines and their Mannich bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.22, p.6867–6875, Out., 2014.
- SHAHABADI, N.; HADIDI, S. Spectroscopic studies on the interaction of calf thymus DNA with the drug levetiracetam. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Iran, v. 96, p. 278–283, Mai., 2012.

SILVA, M. M. et al. Interaction of  $\beta$ -Carbolines with DNA: spectroscopic studies, correlation with biological activity and molecular docking. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 27, p. 1558-1568, Set., 2016.

SILVA-JÚNIOR, E. F. et al. Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of thiophen-2-iminothiazolidine derivatives for use against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v. 24, p. 4228-4240, Set., 2016.

WANG, R. et al. Study of the interaction between bovine hemoglobin and analogs of biphenyldicarboxylate by spectrofluorimetry. **Journal of Luminescence**, China, v. 144, p. 79-86, Jul., 2013.

---

# Seção 3

## Pterocarpano e ctDNA

---

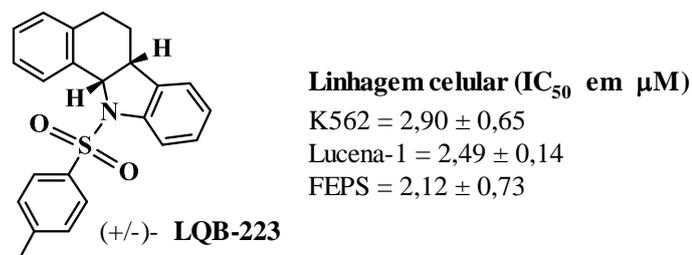
### 3 ARTIGO 1: AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DO LQB-223 COM ctDNA

#### 3.1 Introdução

Os alcalóides carbazólicos e isoflavonóides pterocarpanos constituem uma grande e importante classe de produtos naturais. Esses compostos envolvem subclasses com estruturas tricíclicas e tetracíclicas (SCHMIDT; REDDY; KNÖLKER, 2012; DEWICK, 2009; BOLAND; DONNELLY, 1998; CHAKRABORTY et al., 1997) e muitos deles apresentam atividade anticâncer (ADJAKLY et al., 2013; OISHI et al., 2010; ASCHE; DEMEUNYNCK, 2007; MARTIN et al., 2002; KAUFMAN et al., 1997; VON ANGERER; PREKAJAC, 1986).

Recentemente, Costa e colaboradores sintetizaram o composto 11a-*N*-arilsulfonil-tetrahydro-5H-benzo[*a*]carbazol **LQB-223** (Fig. 1), estruturalmente semelhante aos isoflavonóides, que apresentou potente atividade biológica contra as linhagens celulares de leucemia promielocítica (HL-60), cólon (HCT-8), melanoma (MDA-MB435), eritroleucemia (K562), Lucena-1 e FEPS, ambas derivadas da linhagem K562. Este composto foi amplamente estudado *in vitro* (mecanismo de ação, bioseletividade, efeito antiproliferativo em algumas linhagens celulares, incluindo células com fenótipo MDR e atividade leishmanicida) e *in vivo* (atividade antimalárica) (CORTOPASSI et al., 2014; BUARQUE et al., 2014; BUARQUE et al., 2011).

**Figura 1 – Estrutura química do LQB-223 e atividade antileucêmica.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Vale mencionar que este composto apresenta um grupo farmacofórico arilsulfonamida, presente em compostos dotados de atividade anti-HIV, antimicrobiana, anticâncer e anti-inflamatória (BANO et al., 2011; SCHENONE et al., 2006; STRANIX et al., 2006; MILLER; SEYDEL; DOUKAS, 1972). Buarque e colaboradores (2014) mostraram que o grupo arilsulfonamida do tipo tosil é muito importante para a atividade anticancerígena no **LQB-223**, uma vez que uma redução drástica do efeito citotóxico foi observada. A atividade antitumoral seletiva do **LQB-223** ocorre sem reduzir a viabilidade das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), células do sistema imune (BUARQUE et al., 2014), com um bom índice de seletividade para as linhagens celulares MDA-MB435 e HL-60 (14,4 e 7,2, respectivamente)

(BUARQUE et al., 2011), sugerindo que o **LQB-223** é um candidato promissor para o tratamento de leucemias não responsivas com menor probabilidade de efeitos colaterais (BUARQUE et al., 2014).

Existem vários exemplos na literatura de flavonóides e isoflavonóides estruturalmente semelhantes ao **LQB-223** que apresentam atividade anticâncer pela inibição da síntese de DNA em linhagens de células HL-60 (FALCÃO et al., 2005) e indução de apoptose pela inibição do ciclo celular na prometáfase (MILITÃO et al., 2006).

Os trabalhos mais recentes sobre a interação de pequenas moléculas/DNA destacam o mecanismo de ação dos compostos bioativos (HASSAN; RAUF, 2016; ZHAO et al., 2014; DORRAJI; JALALI, 2013; SHAHABADI; MOGHADAM, 2012; GUO et al., 2011). Neste contexto geral, as interações DNA-ligante são particularmente importantes no que diz respeito à obtenção de fármacos, uma vez que o DNA é o alvo intracelular para uma ampla gama de compostos e pequenas moléculas que podem interagir com as proteínas associadas a DNA, híbridos DNA-RNA e diretamente com a dupla hélice de ácidos nucleicos (RAUF et al., 2005).

Tendo em vista as diferentes atividades biológicas demonstradas pelos derivados pterocarpanos, é importante entender o mecanismo de ação desses compostos. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o processo de interação do ctDNA (*Calf thymus*) com o composto bioativo **LQB-223** que mostrou atividade contra linhagens tumorais explorando técnicas espectroscópicas, análise eletroforética e estudos por *docking* e dinâmica molecular simulando condições fisiológicas.

### 3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

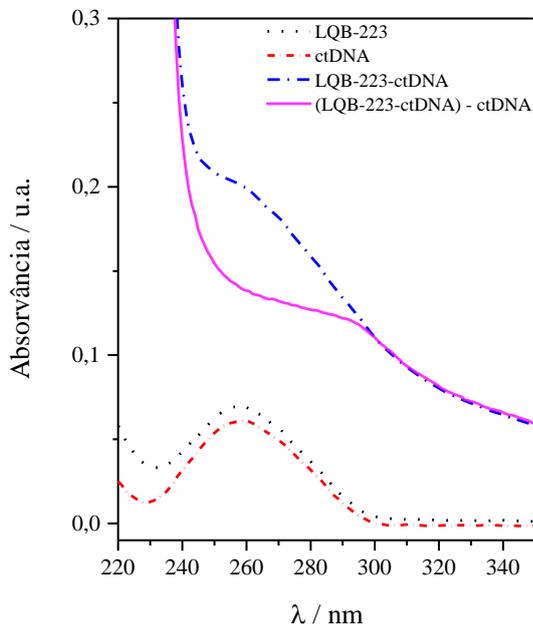
- i) Determinar parâmetros de ligação, como: constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), constante de ligação ( $K_b$ ), estequiometria DNA-ligante ( $n$ ); e parâmetros termodinâmicos  $\Delta S$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta G$ ;
- ii) Explorar a técnica UV-vis visando avaliar o mecanismo de *quenching* dominante no processo de interação;
- iii) Determinar o modo de ligação DNA-ligante;
- iv) Investigar o efeito da força iônica no processo;
- v) Avaliar o perfil de migração eletroforética;
- vi) Realizar experimentos de dinâmica e *docking* molecular, buscando determinar a energia de ligação relativa ao complexo formado.

### 3.3 Resultados e Discussão

#### 3.3.1 Avaliação da interação por UV-vis

A espectroscopia de absorção no UV-vis é uma das técnicas mais simples, amplamente utilizada na avaliação da estabilidade do DNA e no processo de interação com ligantes. Os espectros de absorção molecular para o LQB-223 na ausência e presença do ctDNA são mostrados na Figura 2. O composto avaliado e o ctDNA apresentam comprimentos de onda de máxima absorção próximo a 258 nm, entretanto, adicionando ctDNA à solução do composto, ocorre um deslocamento para maiores comprimentos de onda ( $\Delta\lambda \sim 5$  nm) e um aumento na intensidade do sinal de absorvância, caracterizando efeito batocrômico e hiperacrômico, respectivamente. Esses resultados confirmam a interação entre o ligante e a macromolécula (JALALI; DORRAJI, 2014; SIRAJUDDIN et al., 2013). Assim, em geral, quando o ligante interage com o DNA e forma um complexo, mudanças nos valores de absorvância e na posição da banda podem ocorrer devido às transições eletrônicas  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$  do ligante  $\pi \rightarrow \pi^*$  do DNA.

**Figura 2 – Espectro de absorção no UV-vis do LQB-223 (10  $\mu$ M), ctDNA (10  $\mu$ M), LQB-223-ctDNA e (LQB-223-ctDNA) – ctDNA. Condição: pH = 7,4 (Fosfato 10 mM).**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

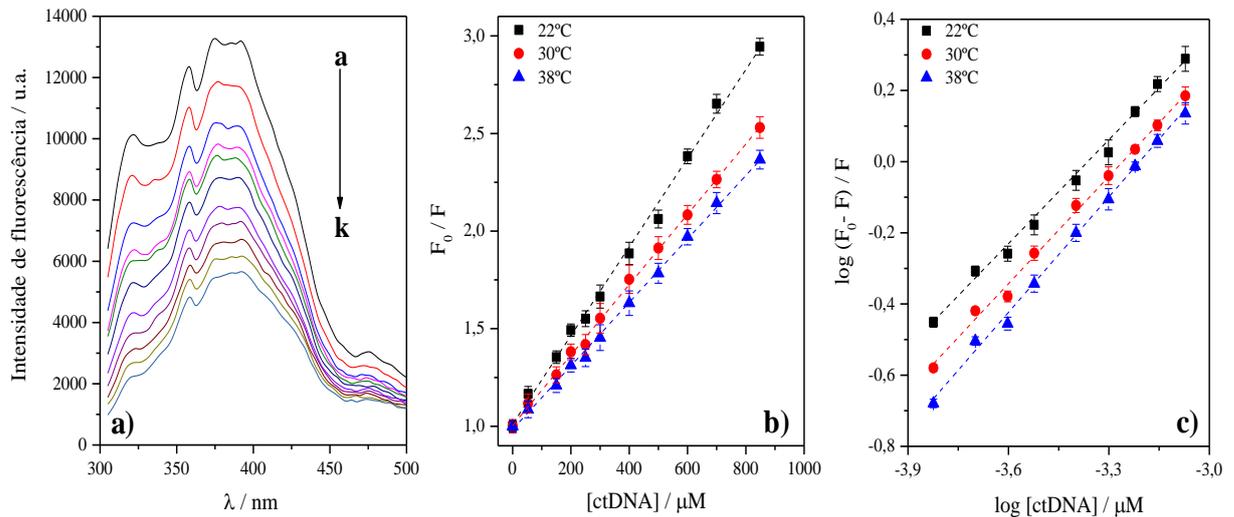
Na avaliação espectral, verificou-se que o valor da absorvância, no comprimento de onda de máxima absorção, do complexo LQB-223-ctDNA ( $A_{\text{complexo}} = 0,2036$ ) era diferente da soma dos valores das absorvâncias do LQB-223 livre e do ctDNA livre ( $A_{\text{LQB-223}} + A_{\text{ctDNA}} = 0,1309$ ), evidenciando que não ocorre efeito aditivo da lei Beer (SILVA et al., 2016). Portanto, as transições  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$  foram favorecidas na formação do complexo supramolecular.

Além disso, o espectro resultante da subtração do complexo (LQB-223-ctDNA) e o espectro do ctDNA livre não se sobrepõem ao espectro LQB-223 livre (Fig. 2), confirmando a interação entre o composto e a macromolécula (SAEIDIFAR; MANSOURI-TORSHIZI; SABOURY, 2015).

### 3.3.2 Avaliação da interação por fluorescência molecular

Nos estudos empregando fluorescência molecular foi observado que o composto **LQB-223** apresenta emissão máxima em 375 nm após ser excitado em 260 nm. Assim, em virtude desta característica espectroscópica o composto foi titulado com o ctDNA, onde observou-se que ao adicionar quantidades crescentes da macromolécula ao sistema, houve diminuição gradual na intensidade de fluorescência devido à redução na concentração livre do ligante (TIAN et al., 2016). A supressão do sinal de fluorescência evidencia a ocorrência de interação entre o composto avaliado e o ctDNA, o qual atua como uma espécie *quencher* (ZHANG; HU; PAN, 2011). A Figura 3a apresenta o perfil espectral da titulação do **LQB-223** com o ctDNA, simulando condições fisiológicas.

**Figura 3 – Interação do LQB-223 com o ctDNA empregando espectroscopia de fluorescência molecular. a) Perfil espectral de fluorescência do composto LQB-223 (20 µM) na presença de diferentes concentrações do ctDNA (0, 53, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700 e 848 µM, curvas a-k, respectivamente); b) Gráfico de Stern-Volmer para o processo *quenching* a três diferentes temperaturas; c) Curva logaritma dupla do ctDNA para o processo de interação do LQB-223 a três diferentes temperaturas. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos (n = 3). Condição: pH = 7,4 (Fosfato 10 mM).**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

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

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q]$$

Equação (1)

em que,  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de ctDNA, respectivamente,  $[Q]$  é a concentração de ctDNA e  $K_{SV}$  é a constante de Stern-Volmer (SUBASTRI et al., 2016). O valor de  $K_{SV}$  foi obtido a partir da relação linear  $F_0/F$  vs  $[Q]$ .

Em virtude da variação na fluorescência intrínseca do composto na presença de ctDNA também é possível calcular a constante de ligação ( $K_b$ ), entre o ligante e a macromolécula (ctDNA). Assim, a constante de ligação ( $K_b$ ) e o número de sítios de ligação ( $n$ ) do complexo supramolecular formado foi calculada a partir de uma titulação fluorimétrica (ZHU et al., 2013). Estes parâmetros foram calculados de acordo com a seguinte equação (OZLUER; KARA, 2014):

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

Os valores de  $K_b$  e  $n$  são obtidos a partir da relação  $\log[(F_0 - F) / F]$  vs  $\log[\text{ctDNA}]$ . As Figuras 3b e 3c apresentam os perfis das curvas para o composto **LQB-223** a partir da linearização das equações (1) e (2), respectivamente. Os valores de  $K_{SV}$ ,  $K_b$  e  $n$  estão apresentados na Tabela 1.

Como mencionado, a diminuição do sinal analítico na presença de quantidades crescentes da macromolécula é um indicativo que ocorreu interação (LI; ZHANG; TAO, 2014). No entanto, é fundamental que ocorra transferência de energia do composto **LQB-223** para o ctDNA, sendo esse processo denominado de *quenching*, o qual pode ocorrer de várias formas, com destaque para o *quenching* dinâmico (colisional) e estático (formação de complexo) (ZHANG et al., 2012). De acordo com a Tabela 1, observou-se que os valores de  $K_{SV}$  variaram de 2,23 a  $1,64 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  (22-38°C), confirmando o processo de interação entre o **LQB-223** e o ctDNA. Como reportado por Rehman e colaboradores (2015a), a determinação do mecanismo de *quenching* é de fundamental importância para o entendimento da natureza do processo de interação, e pode ser realizada por meio de experimentos em diferentes temperaturas, calculando-se os respectivos valores das constantes ( $K_{SV}$ ), ou alternativamente, a partir do estudo por UV-vis.

Tabela 1 – Parâmetros de ligação e termodinâmicos da interação do composto LQB-223 com o ctDNA.

Temperatura (°C)	Constante de Stern-Volmer		Parâmetros de ligação			Parâmetros termodinâmicos		
	$K_{SV}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	$r^a$	$K_b$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	$n$	$r^a$	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
22	2,23 ± 0,05	0,9981	1,98 ± 0,01	0,98 ± 0,03	0,9972	-18,45		
30	1,80 ± 0,02	0,9994	1,94 ± 0,01	1,01 ± 0,02	0,9979	-19,44	+18,01	+123,6
37	1,64 ± 0,02	0,9991	2,90 ± 0,01	1,08 ± 0,02	0,9985	-20,43		

<sup>a</sup> r é o coeficiente de correlação linear.

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Nesse sentido, baseado na Tabela 1, pôde-se observar que o valor de  $K_{sv}$  diminui em função do aumento da temperatura, indicando que o processo de *quenching* preferencial é estático, ou seja, ocorre formação de complexo supramolecular não fluorescente ctDNA-ligante. Assim, ocorre desestabilização do estado fundamental do composto **LQB-223** em função das interações não covalentes com ctDNA. Caso o valor de  $K_{sv}$  aumentasse em função do aumento da temperatura, o tipo de *quenching* seria o dinâmico, visto que em temperaturas mais altas há um aumento do coeficiente de difusão, e por consequência, um maior número de choques entre o ligante fluorescente e a espécie *quencher* (ctDNA) (ZHANG et al., 2010).

Como previamente avaliado por UV-vis, a formação do complexo **LQB-223**-ctDNA ocorreu com propriedades espectroscópicas diferentes do ligante e do DNA livre, indicando que houve uma mudança no estado fundamental do ligante. Estes resultados servem como um subsídio para classificar o tipo de *quenching* preferencial (SILVA et al., 2016). Como as mudanças ocorreram no estado fundamental (WU et al., 2011) devido à formação do complexo **LQB-223**-ctDNA, pode-se inferir que o processo de interação se deu por *quenching* estático, confirmando os resultados obtidos por fluorescência.

As constantes de ligação ( $K_b$ ) obtidas, as quais indicam a magnitude da interação DNA-ligante foi de  $1,94 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  (30°C), que segundo Silva e colaboradores (2016) é considerada de baixa afinidade, uma vez que constantes de elevada afinidade apresentam  $K_b \geq 10^5$ .

No entanto, o valor de  $K_b$  obtido neste trabalho corrobora com outros estudos de interação com DNA, que relatam valores de constante com 3 ordens de grandeza para moléculas bioativas como, salmeterol ( $6,14 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ), diflusinal ( $7,90 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ), 2-imidazolidinotona ( $1,40 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ), levetiracetam ( $4,90 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ) e melasamina ( $1,27 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ), os quais também interagem via *groove* (ZHAO et al., 2014; HUSAIN et al., 2015a; AHMADI et al., 2010; SHAHABADI; HADIDI, 2012; SHAHABADI; FILI; KHEIRDOOSH, 2013). Por meio dos valores de  $n$  apresentados na Tabela 1, verifica-se que a estequiometria foi de 1:1 (ligante: ctDNA).

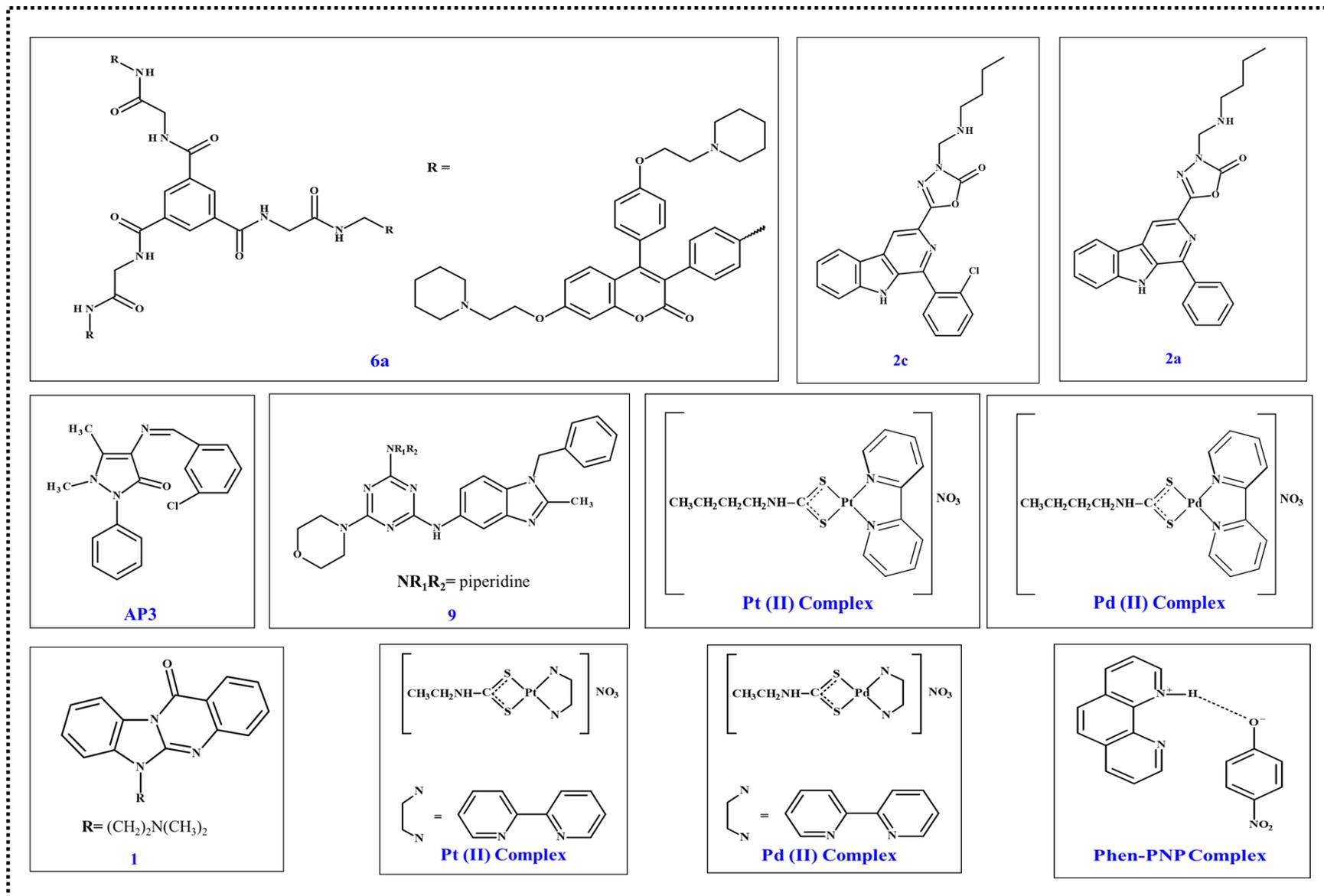
Embora três ordens de magnitude representem uma baixa afinidade de ligação entre **LQB-223** e ctDNA, esses dados são consistentes com estudos que exibiram boa atividade biológica associada a constantes de ligação com DNA (Tabela 2 e Esquema 1), indicando que a interação com DNA deve ser um dos possíveis mecanismos de ação, mas não o único.

Tabela 2 - Avaliação comparativa da interação do DNA e parâmetros de atividade biológica de trabalhos recentes da literatura.

Ligantes	Condições experimentais				Atividade biológica	Constante de ligação ( $10^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	Técnica	Modo de ligação	Referência
	Tampão	pH	NaCl (mM)	Tipo de DNA					
6a	Fosfato (10 mM)	7,4	50	ctDNA	Anticâncer <sup>a</sup> : 8,38 $\mu\text{M}$ (pulmão)	4,30	UV-Vis	Intercalação	ZHANG, L. et al., 2016.
2c	Tris (50 mM)	7,2	100	ctDNA	Anticâncer <sup>a</sup> : 4,65 $\mu\text{M}$ (mama)	0,33	Fluorescência	Intercalação	SILVA et al., 2016.
2a	Tris (50 mM)	7,2	100	ctDNA	Anticâncer <sup>a</sup> : 2,23 $\mu\text{M}$ (próstata)	1,90	Fluorescência	Intercalação	SILVA et al., 2016.
AP3	Fosfato (10 mM)	7,4	-	dsDNA	Anti-inflamatória <sup>b</sup> : 55.06 %	1,30	Fluorescência	Intercalação	ARSHAD et al., 2014.
9	Fosfato (10 mM)	7,0	-	ctDNA	Anticâncer <sup>a</sup> : 3,15 $\mu\text{M}$ (melanoma)	26,0	Fluorescência	Intercalação	SINGLA; LUXAMI; PAUL, 2015.
Pt-complex	Tris (10 mM)	7,0	-	ctDNA	Anticâncer <sup>c</sup> : 14,3 $\mu\text{M}$ (leucemia)	0,57	UV-Vis	Intercalação	MANSOURI-TORSHIZI et al., 2008.
Pd-complex	Tris (10 mM)	7,0	-	ctDNA	Anticâncer <sup>c</sup> : 18,0 $\mu\text{M}$ (leucemia)	3,17	UV-Vis	Intercalação	MANSOURI-TORSHIZI et al., 2008.
1	Tris (10 mM) com 1mM (EDTA)	7,0	500	ssDNA	Anticâncer <sup>a</sup> : 2,10 (Adenocarcinoma cervical humano)	8,50	Fluorescência	Intercalação	VIA et al., 2001.
Pt-complex	Tris (10 mM)	7,0	-	ctDNA	Anticâncer <sup>c</sup> : 89 $\mu\text{M}$ (leucemia)	0,028	UV-Vis	Intercalação	ISLAMI-MOGHADDAM et al., 2009.
Pd-complex	Tris (10 mM)	7,0	-	ctDNA	Anticâncer <sup>c</sup> : 55 $\mu\text{M}$ (leucemia)	1,80	UV-Vis	Intercalação	ISLAMI-MOGHADDAM et al., 2009.
Phen complex	Tris (0,1 M)	7,4	-	ctDNA	Antimicrobiana <sup>d</sup> : 26 mm (E. Coli) Antifúngica <sup>d</sup> : 46 mm (A. Niger)	2,30	Fluorescência	-	KHAN; AHMAD, 2010.

<sup>a</sup>: Valores de IC<sub>50</sub><sup>b</sup>: % inibição do edema<sup>c</sup>: Valores de CC<sub>50</sub> (50% da concentração citotóxica)<sup>d</sup>: Diâmetro da zona de inibição

Esquema 1 - Estruturas dos ligantes presentes na Tabela 2.



Finalmente, deve-se destacar a alta seletividade biológica do **LQB-223** associado às linhagens celulares MDA-MB435 e HL-60, em comparação com compostos como a doxorubicina, que apresenta alta afinidade ao DNA ( $K_b = 2,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ ) (AGUDELO et al., 2016), no entanto, baixa seletividade em comparação com células saudáveis e cancerígenas (BUARQUE et al., 2014; BUARQUE et al., 2011).

Além disso, os valores de  $K_b$  podem ser usados para determinar os parâmetros termodinâmicos envolvidos no processo de interação (REHMAN et al., 2015b). Ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas são as quatro principais interações não covalentes que desempenham um papel importante na interação DNA-ligante (HAQ, 2002; HUSAIN et al., 2015b). A formação de complexos entre diferentes ligantes e o DNA é estudada a diferentes temperaturas possibilitando a determinação de vários parâmetros termodinâmicos como variação da entalpia ( $\Delta H$ ) e entropia ( $\Delta S$ ) por meio da aplicação da equação de Van't Hoff representada abaixo (ZHANG et al., 2010):

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

onde  $K_b$  representa a constante de ligação,  $T$  a temperatura em Kelvin (K) e  $R$  a constante do gás ideal ( $8,314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ). Enquanto que o valor da energia livre de Gibbs pode ser calculado em função dos valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  (Equação 4):

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

Como critério, a interação por forças eletrostáticas é dominante quando  $\Delta H < 0$  (ou  $\Delta H \approx 0$ ) e  $\Delta S > 0$ , enquanto que interações hidrofóbicas são consideradas a principal força quando  $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$ . Por fim, as ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals são associadas com  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$  (ZHANG et al., 2013). Além disso, é possível avaliar a espontaneidade do processo de interação por meio do cálculo da energia livre de Gibbs (ZHANG et al., 2010). Diante disso, de acordo com a Tabela 1, pôde-se observar que os valores de  $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$ , indicando que a formação do complexo **LQB-223**-ctDNA é entalpicamente desfavorável e entropicamente favorável, e as principais forças envolvidas nesse processo de interação são as hidrofóbicas. A variação de entropia positiva provavelmente está relacionada ao deslocamento das moléculas de água do DNA, aumentando a dispersão do sistema. Os valores de  $\Delta G < 0$ , indicam que a interação ocorre espontaneamente.

### 3.3.3 Avaliação do modo de ligação do complexo entre LQB-223 e ctDNA

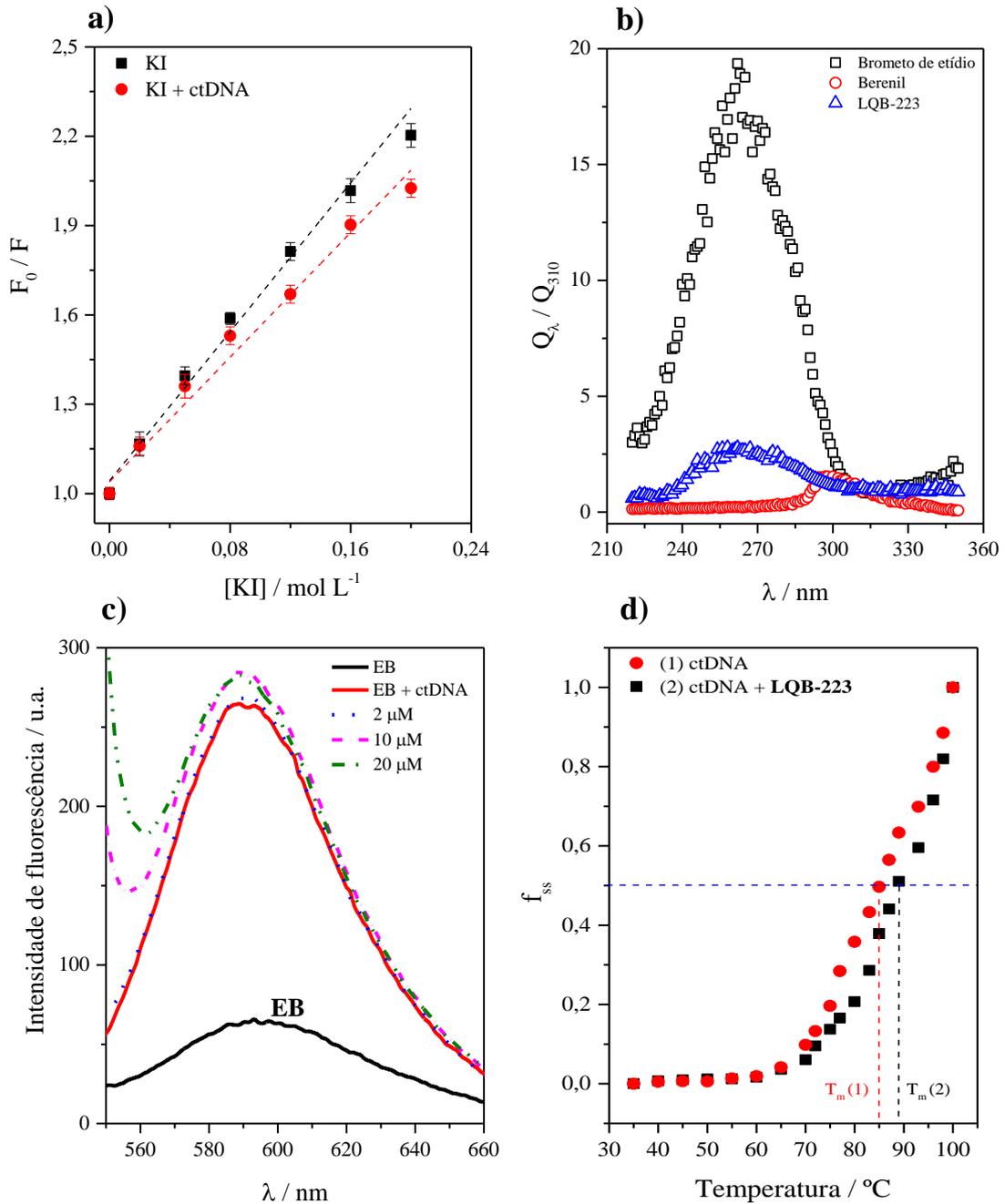
O modo de ligação entre o composto **LQB-223** e o ctDNA, foi avaliado por meio do ensaio com KI, transferência de energia por contato, competição com brometo de etídio (EB) e avaliação do perfil de desnaturação térmica do ctDNA ( $T_m$ ).

#### 3.3.3.1 Ensaio com KI

Segundo Sarwar e colaboradores (2015a), o íon iodeto é considerado um inibidor aniônico da fluorescência de pequenas moléculas em meio aquoso. No entanto, para que ocorra essa supressão é necessário que essas moléculas estejam acessíveis ao íon iodeto. Desta forma, emprega-se como critério a comparação do valor da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), descrita anteriormente, que indica a acessibilidade do íon iodeto ao fluoróforo, na ausência e presença de DNA (ZHOU; ZHANG; WANG, 2014).

Uma vez que o DNA possui uma cadeia fosfatídica carregada negativamente, espera-se uma repulsão entre esses grupos fosfatos e o iodeto como supressor aniônico (SARWAR et al., 2015b). Assim, se uma molécula está intercalada entre os pares de bases do DNA, a acessibilidade desse íon é restrita, impedindo que o inibidor aniônico tenha acesso ao fluoróforo, levando a uma diminuição do valor de  $K_{SV}$  na presença do DNA (SAVARIZ et al., 2014). No entanto, quando o modo de ligação se dá, preferencialmente, via *groove* ou eletrostático, os ligantes apresentam um grau de proteção menor, logo estão mais acessíveis ao íon iodeto circundante, assim a probabilidade de colisão entre a molécula pequena e o ânion iodeto é facilitada tanto na ausência quanto na presença de DNA. Dessa forma, os valores de  $K_{SV}$  na presença de DNA tendem a ser maiores quando comparado à condição na ausência da macromolécula (REHMAN et al., 2014). A Figura 4a mostra os resultados para essa avaliação.

**Figura 4 – Avaliação do modo de ligação DNA-ligante; a) Ensaio de *quenching* pelo KI. Gráfico de Stern-Volmer para o *quenching* de fluorescência do LQB-223 pelo KI na ausência e presença do ctDNA (50  $\mu\text{M}$ ), os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos ( $n = 3$ ); b) Transferência de energia por contato entre o LQB-223 e brometo de etídio/berenil, intercalante e groove, respectivamente; c) Titulação de fluorescência do complexo ctDNA-EB com LQB-223, excitado a 525 nm; d) Perfil da temperatura de desnaturação térmica do ctDNA (20  $\mu\text{M}$ ) na ausência e presença do LQB-223. Absorvância foi medida em 260 nm.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A partir da Figura 4a, verifica-se que o valor de  $K_{SV}$  foi maior na ausência de ctDNA ( $K_{SV} = 5,97 \pm 0,27 \text{ L mol}^{-1}$ ), quando comparado ao valor na presença de ctDNA ( $K_{SV} = 5,07 \pm 0,28 \text{ L mol}^{-1}$ ), levando a uma variação de 17,8%. Apesar de alguns autores (SARWAR et al., 2015a; SARWAR et al., 2015b; REHMAN et al., 2014) utilizarem o ensaio com iodeto de

potássio como parâmetro para determinar o modo de ligação preferencial de pequenas moléculas com o DNA, esse ensaio não pode ser utilizado como única estratégia para a avaliação do modo de ligação, uma vez que fornece apenas informações acerca do grau de proteção do ligante pela biomolécula. Nesse contexto, existem trabalhos que mostram tendência contrária em relação aos valores de  $K_{SV}$  na presença e ausência do ligante. Shahabadi e colaboradores (2015) estudando a interação do cloridrato de R,S-venlafaxina com ctDNA, obtiveram valores de  $K_{SV}$  para titulação com iodeto igual a 61,22 e 55,94 L mol<sup>-1</sup> na ausência e presença de ctDNA, respectivamente. Devido a essa proximidade dos valores (variação de 9,4%), caracterizaram o modo de ligação como *groove*. Contudo, Cui e colaboradores (2012) avaliando a interação entre 3'-azida-3'-deamino daunorubicina e ctDNA obtiveram valores de  $K_{SV}$  frente a titulação com KI de 1,01 e 0,91×10<sup>3</sup> L mol<sup>-1</sup> na ausência e presença do ctDNA, respectivamente. Neste trabalho a variação de  $K_{SV}$  foi de 9,6% e os autores caracterizaram o modo de ligação preferencial como intercalação.

Infelizmente na titulação do ligante com KI não existe uma referência mínima quanto a variação percentual de  $K_{SV}$  na ausência e presença de DNA que leve a classificação segura do modo de ligação com a macromolécula, visto que compostos que interagem no *groove* menor, podem levar a resultados similares a intercalantes clássicos (BASU; KUMAR, 2014; BASU; BHOWMIK; KUMAR, 2013; HYUN et al., 1997). Assim, o teste de KI em si não é suficiente para fornecer evidências para classificar o modo de ligação, e outras experiências são necessárias. Portanto, realizou-se a transferência de energia de contato de fluorescência, um ensaio que fornece informações precisas em relação à interação DNA-ligante.

### 3.3.3.2 Transferência de energia por contato

Este ensaio é baseado na transferência de energia de uma molécula doadora para uma receptora, e é utilizado para prever com maior confiabilidade o modo de ligação de moléculas que interagem via *groove* menor e que em alguns ensaios se comportam como intercalantes, e vice-versa. Apesar de existirem critérios bem estabelecidos para distinguir entre intercalação e *groove*, essas controvérsias podem surgir (SUH; OH; CHAIRES, 2001).

Nesse contexto, o método para avaliar a transferência de energia das bases do ctDNA para o ligante é descrito pela seguinte expressão:

$$\frac{Q_{\lambda}}{Q_{310}} = \left( \frac{I_{\lambda} \epsilon_{310}}{I_{310} \epsilon_{\lambda}} \right)_{\text{ligado}} \left( \frac{I_{310} \epsilon_{\lambda}}{I_{\lambda} \epsilon_{310}} \right)_{\text{livre}} \quad \text{Equação (4)}$$

onde  $I$  e  $\epsilon$  correspondem a intensidade de fluorescência medida no modo de excitação e o coeficiente de extinção molar em um dado comprimento de onda ( $\lambda$ ) e em 310 nm, respectivamente,  $Q$  refere-se à eficiência quântica. O comprimento de onda 310 nm, foi escolhido para normalização em virtude da absorvância do ctDNA ser negligenciável (SUH; CHAIRES, 1995).

A transferência de energia a partir das bases do ácido nucleico para o ligante provoca um aumento na intensidade de fluorescência do ligante se este estiver intercalado ao DNA (HYUN et al., 1997). A transferência de energia de uma molécula doadora para uma receptora depende da sobreposição espectral, distância e orientação entre as moléculas. Para um fluoróforo intercalado, a distância é praticamente negligenciável, uma vez que o fluoróforo encontra-se entre os pares de bases do DNA, e o plano da molécula intercalada é praticamente sobreposto às bases do DNA (VIOLA et al., 2000) e, conseqüentemente, a energia pode ser transferida facilmente. Entretanto, quando o composto está ligado nos sulcos da biomolécula (*groove*), a eficiência da transferência não é grande, devido a maior distância entre os pares de bases e o ligante, bem como a orientação dos dipolos que não favorece essa transferência (SUH; CHAIRES, 1995).

Para analisar o perfil espectral do **LQB-223**, este ensaio foi realizado com dois compostos que possuem modo de ligação bem estabelecido, brometo de etídio (EB) e berenil, que se ligam ao DNA via intercalação e *groove*, respectivamente. De acordo com a Figura 4b, observou-se que o EB ligado ao DNA apresenta maior eficiência quântica, chegando a 260 nm, indicando forte transferência de energia do ctDNA para o ligante (VIOLA et al., 2000; HYUN et al., 1997; SUH; CHAIRES, 1995). Um comportamento oposto foi observado para o berenil, que interage com o ctDNA via *groove* menor. Para o **LQB-223**, observou-se um comportamento espectral similar ao berenil, indicando que o modo de ligação preferencial dessa molécula com o ctDNA pode ser via *groove*. Entretanto, deve-se considerar que parte da molécula pode interagir com o DNA via intercalação, de maneira não preferencial. Chattopadhyay e colaboradores (2014 e 2013) avaliaram a interação do conjugado acridona-pterocarpano e cumarina-pterocarpano com o DNA, compostos que apresentam semelhança com o **LQB-223**. Nesses estudos, os dois compostos interagiram com o DNA no sulco menor, onde o derivado cumarínico-pterocarpano formou uma entidade não convencional, e ambos os mecanismos (intercalação e *groove*) podem ocorrer simultaneamente, no entanto, um sempre será preferível ao outro.

### 3.3.3.3 Ensaio de competição com brometo de etídio

Adicionalmente, para confirmar que o composto avaliado realmente interage preferencialmente via *groove* foi realizado um ensaio de competição com o brometo de etídio (EB), o qual apresenta baixa emissão de fluorescência em sua forma livre, no entanto, quando o mesmo intercala com DNA, ocorre um aumento considerável na intensidade de fluorescência (BASU; KUMAR, 2014), como pode ser observado na Figura 4c.

A presença de uma molécula que apresenta mesmo modo de ligação ao DNA no sistema pode deslocar o EB da macromolécula, e conseqüentemente levar a uma diminuição da intensidade de fluorescência, uma vez que parte do EB estaria na forma não intercalada (ZHANG et al., 2012). Assim, nos estudos realizados observou-se que a intensidade de emissão do complexo EB-DNA praticamente não sofria alteração à medida que a concentração dos compostos aumentava. Desta forma, pode-se concluir que o modo de ligação do composto **LQB-223** não ocorre de forma similar ao brometo de etídio, sugerindo que o mecanismo de ligação preferencial ocorre via *groove*, corroborando com os resultados da transferência de energia por contato. Esses dados são concordantes com os trabalhos de Chattopadhyay et al., (2014 e 2013) que avaliaram a interação entre conjugados acridona-pterocarpanos e cumarinas-pterocarpanos com DNA, onde não foi verificado deslocamento do EB da macromolécula, propondo como modo de ligação preferencial via *groove* para ambos os ligantes.

Além disso, o ensaio de competição foi realizado com a sonda Hoechst 33258, que se liga seletivamente via *groove* ao DNA (BASU; KUMAR, 2014). Entretanto, resultados satisfatórios não foram obtidos devido ao complexo Hoechst 33258-ctDNA ( $\lambda_{em} \approx 420-480$  nm) e ligante avaliado ( $\lambda_{em} \approx 380-430$  nm) apresentarem bandas de emissão largas e com faixa de emissão próximas. Dessa forma, houve interferência espectral, não permitindo uma avaliação conclusiva. Assim, outros ensaios foram realizados para confirmar de forma inequívoca o modo de ligação.

### 3.3.3.4 Estudos de desnaturação térmica do ctDNA

Sabe-se que a dupla hélice do DNA é considerada estável devido às ligações de hidrogênio e interações entre as bases, entretanto com o aumento da temperatura essas forças se enfraquecem acarretando na separação das fitas. A temperatura na qual tem-se 50% na forma de fita simples e 50% na forma de fita dupla é denominada como temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) e está fortemente relacionada com a estabilidade da estrutura dupla hélice (ZHANG et al., 2010).

Por intercalação de pequenas moléculas no interior da dupla hélice de DNA, há um aumento na temperatura de desnaturação do DNA ( $T_m$ ) acima de 5°C. Esta maior variação positiva na temperatura de desnaturação é atribuída ao aumento da estabilidade da dupla hélice de DNA devido a intercalação de compostos entre as bases. No entanto, quando a molécula não interage por intercalação não é observado aumento acima de 5° C no valor de  $T_m$  (SILVA et al., 2016). Desta forma, para confirmar o modo de ligação do composto **LQB-223** com a macromolécula, realizou-se o ensaio da desnaturação térmica do DNA, para auxiliar na elucidação do modo de ligação. Para calcular o percentual de DNA na forma de fita simples foi empregando a equação abaixo:

$$f_{ss} = \frac{A - A_0}{A_f - A_0} \quad \text{Equação (5)}$$

onde  $f_{ss}$ , corresponde a fração de DNA na forma de fita simples,  $A_f$  e  $A_0$  representa os valores de absorvância máximo (DNA totalmente na forma de fita simples) e mínimo (DNA totalmente na forma de fita dupla) a 260 nm, respectivamente. Portanto,  $f_{ss} \rightarrow 0$  implica que o ctDNA está em sua maioria na forma de fita dupla,  $f_{ss} \rightarrow 1$  indica que o ctDNA está predominantemente na forma de fita simples e  $f_{ss} = 0,5$  mostra que 50% está na forma de fita simples e 50% na forma de fita dupla. Assim, a temperatura de desnaturação térmica do ctDNA ( $T_m$ ) foi definida quando  $f_{ss}$  corresponde a 0,5. Ao plotar  $f_{ss}$  versus temperatura (Fig. 4d), o valor de  $T_m$  pode ser obtido.

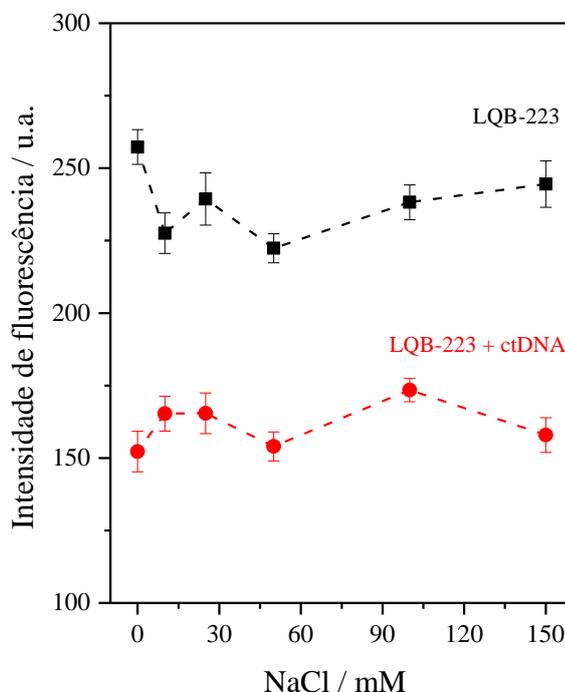
Verificou-se que o valor de  $T_m$  do ctDNA na ausência do composto foi de  $85,0 \pm 0,5$  °C, enquanto que na presença foi de  $89,1 \pm 0,4$  °C, obtendo-se uma variação de aproximadamente 4°C. Esses dados demonstram que não ocorreram mudanças significativas na estabilidade da estrutura dupla hélice da biomolécula, indicando que o mecanismo de ligação preferencial é não intercalante. Este resultado corrobora com os ensaios prévios de transferência de energia de contato de fluorescência e a competição com brometo de etídio.

### 3.3.4 Efeito da força iônica

A interação eletrostática é também um modo de ligação não covalente de pequenas moléculas ao DNA, e está associada com a interação no exterior ou na superfície da dupla hélice, diferentemente do modo de ligação via intercalação e *groove* (SARWAR et al., 2015a). Dessa forma, para avaliar o papel da interação eletrostática na ligação composto **LQB-223**-ctDNA, empregou-se o cloreto de sódio (NaCl) para ajuste da força iônica no meio. A adição do NaCl no mesmo sistema DNA-ligante, reduz a repulsão entre os grupos fosfatos carregados

negativamente do DNA, uma vez que há um aumento na  $[\text{Na}^+]$  (SUN et al., 2011). Assim, esse efeito foi avaliado na interação DNA-ligante (Fig. 5).

**Figura 5 - Efeito da força iônica na interação DNA-ligante na presença de incrementos de NaCl (0-150 mM) a 30°C. O comprimento de onda de excitação foi 260 nm. os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos (n = 3).**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

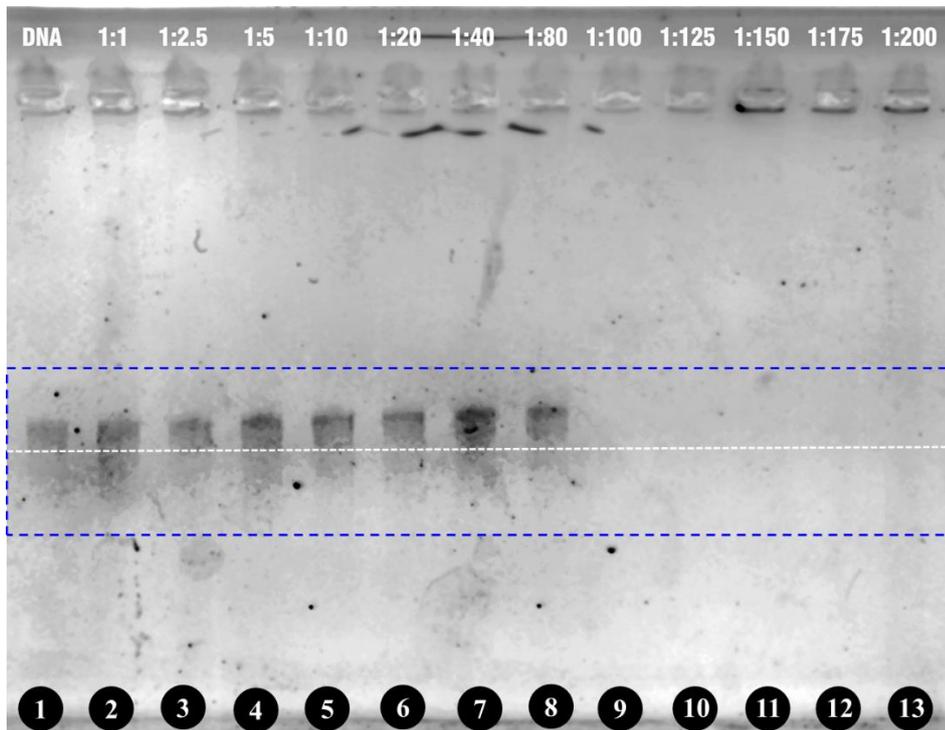
Nota-se a partir da Figura 5, que a adição de NaCl conduziu a um ligeiro aumento na intensidade de fluorescência do **LQB223**-ctDNA em relação a condição de ausência de NaCl, porém nenhuma diferença significativa foi observada ao se adicionar quantidades crescentes do eletrólito forte. Esses resultados sugerem que as interações eletrostáticas desempenham um papel pouco significativo no processo de interação **LQB-223**-ctDNA (SHI et al., 2015). O perfil da força iônica foi concordante com os estudos termodinâmicos, os quais indicaram que as interações hidrofóbicas são as preferenciais que atuam na estabilização do complexo com ctDNA. Adicionalmente, esses dados corroboram com o trabalho de Rehman e colaboradores (2015a) que reportaram que não ocorreu efeito da força iônica na interação do chlorambucil-ctDNA, um sistema onde o ligante interage preferencialmente via *groove*.

### 3.3.5 Eletroforese

Existem na literatura compostos com similaridade estrutural com os derivados pterocarpanos que possuem a capacidade de clivar o DNA (CHAUDHURI et al., 1995). Assim, para verificar se ocorre fragmentação do ácido nucleico após ligação com o **LQB-223**, avaliou-se a interação entre o composto **LQB-223** e o ctDNA por eletroforese em gel de agarose.

O efeito da adição de quantidades crescentes do ligante ao ctDNA foi analisado por monitoramento da mobilidade eletroforética em gel de agarose, que é altamente dependente do campo elétrico aplicado (HOLMES; STELLWAGEN, 1990; STELLWAGEN, 1985). A migração de moléculas de DNA em gel de agarose é efetuada por um mecanismo dependente tanto das mudanças na intensidade das bandas quanto da mobilidade eletroforética na matriz do gel (STELLWAGEN, 2009). A Figura 6 mostra o perfil dos resultados dessa avaliação.

**Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1% (m/m) com concentrações crescentes de LQB-223. Canaleta 1: ctDNA (5,0  $\mu$ M), canaletas 2-13: LQB-223-ctDNA (1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:100, 1:125, 1:150, 1:175 e 1:200, respectivamente).**



Fonte: realizado em colaboração com o Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LBFI-UFAL), 2020.

Os resultados mostraram um ligeiro atraso na taxa de migração do ctDNA quando incubado com concentrações crescentes do composto (canaleta 2-8: 1: 1 a 1:80 proporção de DNA: ligante). Estes resultados sugerem que a ligação entre o DNA e o **LQB-223** leva a formação de um complexo supramolecular (XIE et al., 2015) devido à extensão da migração a uma taxa mais lenta quando comparado com a banda de ctDNA livre na eletroforese em gel de agarose.

Para o ctDNA na presença de maiores concentrações de **LQB-223** (1:100 a 1:200) não foi observada migração no gel de agarose a 1% (m/m), possivelmente devido à formação do complexo (ou agregado molecular) **LQB-223**-ctDNA ter uma elevada massa molecular (como

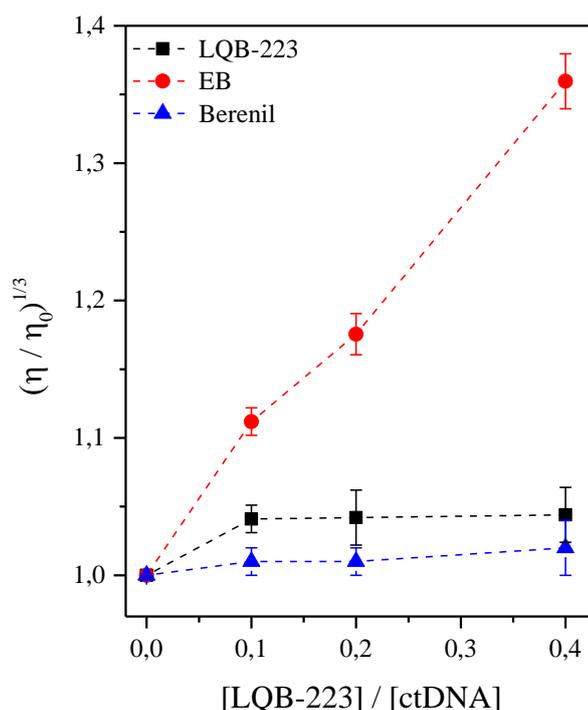
visto na Fig. 6). Além disso, não houve fragmentação após a ligação do composto com DNA, uma vez que apenas uma única banda foi observada.

### 3.3.6 Medidas de viscosidade

Os ensaios de viscosidade são considerados fundamentais e de grande confiabilidade na avaliação do modo de ligação de pequenas moléculas ao DNA. Segundo Husain e colaboradores (2015a), quando um ligante interage preferencialmente via intercalação ocorre um aumento considerável na viscosidade da solução de DNA, devido a uma maior separação dos pares de bases nitrogenadas ao acomodar o ligante. Entretanto, caso o mecanismo preferencial seja via *groove*, não são observadas diferenças significativas na viscosidade, visto que os ligantes estão interagindo na parte externa da dupla hélice.

Nesse sentido, para fins comparativos realizou-se as medidas de viscosidade para o **LQB-223** e para as sondas brometo de etídio e berenil, que interagem por intercalação e *groove*, respectivamente (SHANKARAI AH et al., 2016). Os resultados para este estudo estão apresentados no gráfico  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  versus [ligante]/[ctDNA], onde  $\eta$  e  $\eta_0$  corresponde a viscosidade do DNA na presença e ausência do composto (Fig. 7). A equação  $\eta = (t-t_0)/t_0$  foi utilizada para calcular os valores de viscosidade, corrigindo com o tempo de fluxo do tampão ( $t_0$ ) das soluções contendo ctDNA ( $t$ ) (ZHOU et al., 2016).

**Figura 7 – Efeito de concentrações crescentes do LQB-223 e as sondas EB e berenil na viscosidade do ctDNA (25  $\mu$ M). Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos (n = 3).**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

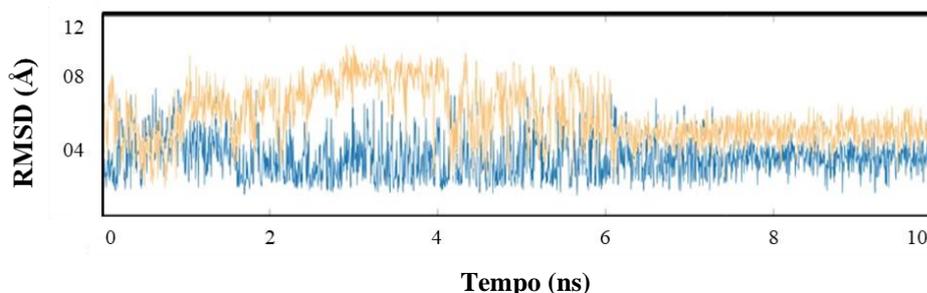
De acordo com a Figura 7, pôde-se observar que com aumento da concentração do composto **LQB-223**, não ocorreram mudanças significativas nos valores de viscosidade, indicando que esse composto interage preferencialmente via *groove*. Este resultado foi consistente com o perfil observado para brometo de etídio (EB) (alta variação) e berenil (baixa variação), e corrobora com outras moléculas que se ligam via *groove*, como a paeoniflorina e a sinafloxacina, que apresentaram pouca alteração na viscosidade do ctDNA (SHAHABADI; FILI; KHEIRDOOSH, 2013). Assim, a avaliação de viscosidade foi concordante com o ensaio de transferência de energia por contato.

### 3.3.7 Estudos de dinâmica e *docking* molecular

A dinâmica molecular (MD) em combinação com a simulação de *docking* molecular têm sido amplamente empregada no reconhecimento de estudos de interação entre macromoléculas e fármacos (AJLOO et al., 2015; AJLOO et al., 2013; AJLOO et al., 2008; AJLOO et al., 2007).

O gráfico dos valores de  $C\alpha$ -RMSD para o ctDNA e LQB-223 em função do tempo foi construído para avaliar a qualidade e a convergência das trajetórias da MD. A curva do ctDNA sofreu algumas pequenas flutuações, mas mostra que o sistema atinge um estado estável após cerca de seis nano segundos (Fig. 8).

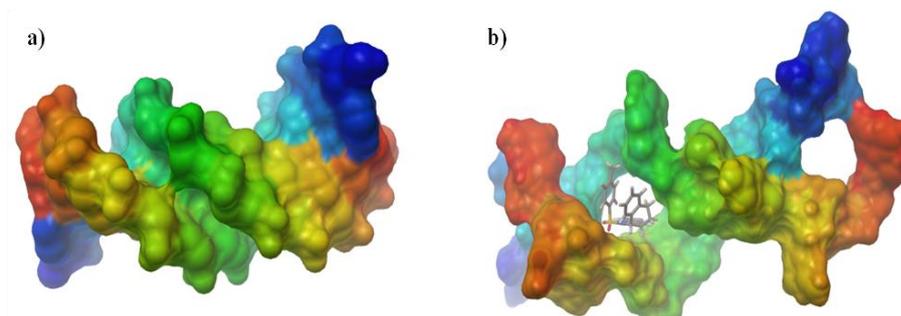
**Figura 8 – Tempo de evolução do  $C\alpha$ -RMSDs (em Å) do ctDNA (azul) e LQB-223 (laranja).**



Fonte: realizado em colaboração com o Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamentos (LabTCoM-UFAL), 2020.

A simulação da MD mostra que o LQB-223 é capaz de interagir com o DNA no sulco menor (Fig. 9b), corroborando com os estudos de Chattopadhyay e colaboradores (2014 e 2013). É possível observar que a estrutura do ctDNA foi modificada pelo ligante, íons e presença de água, quando comparada com a estrutura extraída do website do PDB (Fig. 9a).

**Figura 9 - Visão comparativa entre ctDNA do a) PDB e b) ctDNA/LQB-223 gerado por simulação MD.**

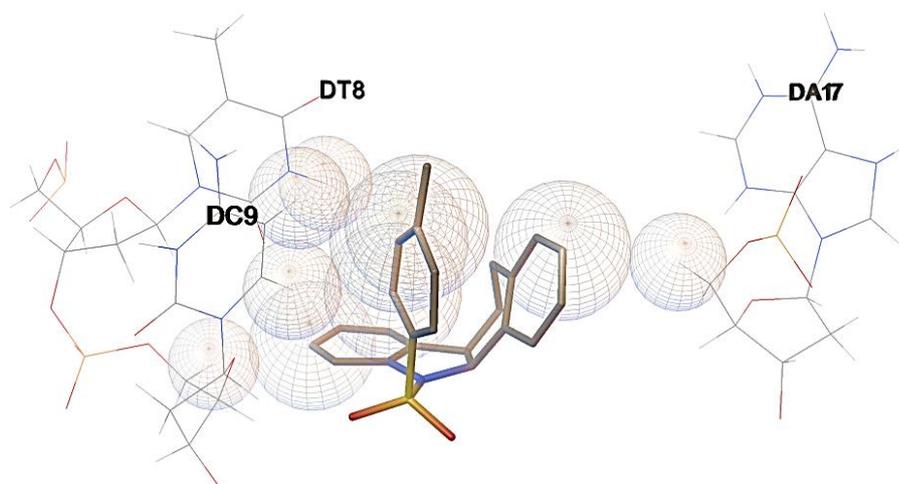


Fonte: realizado em colaboração com o Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamentos (LabTCoM-UFAL), 2020.

Após simulações MD na presença do ligante, a energia de ligação ( $E_b$ ) foi determinada usando o programa AUTODOCK TOOLS 1.5.6. O LQB-223 foi capaz de interagir com três nucleosídeos, DT8, DC9 e DA17, com grande afinidade,  $E_b = -7,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ , similar aos análogos do pterocarpano em outros estudos (CHATTOPADHYAY; KUNDU; MAITRA, 2014; CHATTOPADHYAY et al., 2013). Todas as interações observadas ocorrem via modo hidrofóbico.

Na Figura 10 é mostrada uma visão de perto das interações do complexo. É possível observar que o sistema de anéis planares está alinhado com o sulco menor e é capaz de interagir, via  $\pi$ -stacking, com o anel aromático do resíduo DT8. Adicionalmente, o grupo 4-metilfenil é dirigido para fora do *groove* menor e é capaz de interagir com o fenil a partir do resíduo DC9, via interações  $\pi$ -stacking.

**Figura 10 - Interações do complexo ctDNA-LQB-223. Esferas em cinza significam interações hidrofóbicas.**



Fonte: realizado em colaboração com o Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamentos (LabTCoM-UFAL), 2020.

Finalmente, a porção fenilciclohexanil está localizada no *groove* menor e é capaz de interagir hidrofobicamente com o CH<sub>2</sub> no grupo fosfato da cadeia lateral. Assim, os estudos de *docking* e dinâmica molecular corroboram com os resultados da avaliação do modo de ligação e avaliação das principais forças que estabilizam o complexo.

### 3.4 Conclusão

A interação do LQB-223 com o ctDNA foi avaliada empregando técnicas espectroscópicas (fluorescência molecular e UV-vis), eletroforese e estudos por *docking* e dinâmica molecular. De acordo com os resultados, o composto interage com o ctDNA formando um complexo supramolecular não-fluorescente por *quenching* estático. O valor constante de ligação para fluorescência molecular foi  $1,94 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$  (30°C) e a estequiometria do complexo DNA-ligante foi de 1:1. Além disso, também foi possível inferir que as interações hidrofóbicas desempenharam um papel significativo no processo de interação. Adicionalmente, o modo de ligação via *groove* foi o preferencial entre o LQB-223 e ctDNA, sendo caracterizado por transferência de energia por contato de fluorescência, ensaio de competição com EB e avaliação da temperatura de desnaturação térmica do ctDNA ( $T_m$ ). Estes dados são confirmados por estudos de viscosidade. Pelos estudos de eletroforese, nenhuma fragmentação do DNA foi observada, uma vez que apenas uma única banda foi vista, e a mobilidade eletroforética foi afetada pela concentração de ligante. Estudos de *docking* e dinâmica molecular mostraram que o LQB-223 interage com os resíduos DT8, DC9 e DA17, hidrofobicamente com modo de ligação via *groove*, confirmando os resultados espectroscópicos. Portanto, o mecanismo de ação do LQB-223 pode estar associado à interação com DNA, como o principal alvo biológico.

## 3.5 Artigo publicado

International Journal of Biological Macromolecules 96 (2017) 223–233



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijbiomac](http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac)

## Interaction between bioactive compound 11a-N-tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223) and *Calf thymus* DNA: Spectroscopic approach, electrophoresis and theoretical studies



Marina M. Silva<sup>a</sup>, Eduarda O.O. Nascimento<sup>a</sup>, Edeílido F. Silva Júnior<sup>a</sup>, João Xavier de Araújo Júnior<sup>a,b</sup>, Camilla C. Santana<sup>b</sup>, Luciano Aparecido M. Grillo<sup>b</sup>, Rafaela S. de Oliveira<sup>c</sup>, Paulo R.R. Costa<sup>d</sup>, Camilla D. Buarque<sup>c</sup>, Josué Carinhanha C. Santos<sup>a,\*</sup>, Isis M. Figueiredo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Chemistry and Biotechnology Institute (IQB), Federal University of Alagoas (UFAL), Campus A.C. Simões, Tabuleiro dos Martins, 57072-970, Maceió-AL, Brazil

<sup>b</sup> Nursing and Pharmacy School (ESENFAR), Federal University of Alagoas (UFAL), Campus A.C. Simões, Tabuleiro dos Martins, 57072-970, Maceió-AL, Brazil

<sup>c</sup> Department of Chemistry, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro, Rua Marquês de São Vicente, 225, Gávea, 22435-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>d</sup> Bio-organic Chemistry Laboratory, Research Institute of Natural Products Health Sciences Center, Block H, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 October 2016

Received in revised form 9 December 2016

Accepted 9 December 2016

Available online 14 December 2016

## Keywords:

11a-N-tosyl-5-carbapterocarpan  
11a-N-arylsulfonyl-tetrahydro-5H-benzo[a]carbazole  
CT DNA interaction  
Spectroscopic techniques  
Theoretical studies  
Electrophoresis

## ABSTRACT

The interaction of small molecules with DNA has been quite important, since this biomolecule is currently the major target for a wide range of drugs in clinical use or advanced clinical research phase. Thus, the present work aimed to assess the interaction process between the bioactive compound 11a-N-tosyl-5-carba-pterocarpan, (LQB-223), that presents antitumor activity, with DNA, employing spectroscopic techniques, electrophoresis, viscosity and theoretical studies. Through UV-vis and molecular fluorescence spectroscopy, it was possible to infer that the preferential quenching mechanism was static, characterized by non-fluorescent supramolecular complex formation between the LQB-223 and DNA. The binding constant was  $1.94 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1}$  (30 °C) and, according to the thermodynamic parameters, the main forces involved in the interaction process are hydrophobic. Potassium iodide assay, competition with ethidium bromide, fluorescence contact energy transfer and melting temperature profile of DNA were employed to evaluate the binding mode. Except for KI assay, all results obtained indicated minor groove as the preferential binding mode of LQB-223 to DNA. These observations were supported by ionic strength assay, viscosity and molecular dynamics and docking studies. Finally, electrophoresis analysis demonstrated that the interaction does not promote DNA fragmentation, but it leads to variation in the migration profile after increasing the ligand concentration.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Carbazole alkaloids and pterocarpan isoflavonoids constitute a large and important class of natural products. These compounds comprise sub-classes with tricyclic and tetracyclic structures [1–4] and many of them present anticancer activity [5–10].

Costa and co-workers are experienced in the synthesis of 5-carba-pterocarpan, 1-carba-isoflavanones, 5-carba-11-aza-

pterocarpan and pterocarpanquinones based on Palladium-catalyzed oxyarylation and azaarylation of dihydronaphthalenes and a-arylation of  $\alpha$ -tetralones as the key steps to produce compounds with anti-cancer, antiparasitic and anti-viral properties-activity [11–14].

Recently, Costa and co-workers synthesized the compound 11a-N-arylsulfonyl-tetrahydro-5H-benzo[a]carbazole LQB-223 (Fig. 1), structurally similar to isoflavonoids, that present potent biological activity against promyelocytic leukemia (HL-60), erythroleukemia (K562), colon (HCT-8) and melanoma (MDA-MB435) cell lines. This compound was extensively studied *in vitro* (mechanism of action, bioselectivity, scope of antiproliferative effect on some cell lines,

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [josue@iqb.ufal.br](mailto:josue@iqb.ufal.br), [jcarinhanha@yahoo.com.br](mailto:jcarinhanha@yahoo.com.br) (J.C.C. Santos),[figueiredo.isis@gmail.com](mailto:figueiredo.isis@gmail.com) (I.M. Figueiredo).<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.044>

0141-8130/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## REFERÊNCIAS

- ADJAKLY, M. et al. Genistein and daidzein: different molecular effects on prostate cancer. **Anticancer Research**, França, v. 33, p. 39-44, Jan., 2013.
- AGUDELO, D. et al. Review on the binding of anticancer drug doxorubicin with DNA and tRNA: Structural models and antitumor activity. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, Canadá, v. 158, p. 274-279, Mai., 2016.
- AHMADI, F. et al. Experimental and computational approach to the rational monitoring of hydrogen-bonding interaction of 2-Imidazolidinethione with DNA and guanine. **Food and Chemical Toxicology**, Irã, v. 48, p. 29-36, Jan., 2010.
- AJLOO, D. et al. Effect of two imidazolium derivatives of ionic liquids on the structure and activity of adenosine deaminase. **International Journal of Biological Macromolecules**, Irã, v. 55, p. 47-61, Abr., 2013.
- AJLOO, D. et al. Effects of surfactant: salt and solvent on the structure and activity of adenosine deaminase: molecular dynamic and spectrophotometric studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, Irã, v. 43, p. 151-158, Ago., 2008.
- AJLOO, D. et al. Kinetic: thermodynamic and statistical studies on the inhibition of adenosine deaminase by aspirin and diclofenac. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, Irã, v. 22, p. 395-406, Ago., 2007.
- AJLOO, D. et al. Synthesis characterization, spectroscopy, cytotoxic activity and molecular dynamic study on the interaction of three palladium complexes of phenanthroline and glycine derivatives with calf thymus DNA. **Inorganica Chimica Acta**, Irã, v. 430, p. 144-160, Mai., 2015.
- ARSHAD, N. et al. Spectroscopic, electrochemical DNA binding and in vivo anti-inflammatory studies on newly synthesized Schiff bases of 4-aminophenazone. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Paquistão, v. 138, p. 331-346, Set., 2014.
- ASCHE, C.; DEMEUNYNCK, M. Antitumor carbazoles. **Anti-cancer Agents Medicinal Chemistry**, França, v. 7, p. 247-267, 2007.
- BANO, K. et al. Synthesis and biological evaluation of some new 2-pyrazolines bearing benzene sulfonamide moiety as potential anti-inflammatory and anti-cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Índia, v. 46, p. 5763-5768, Dez., 2011.
- BASU, A.; KUMAR, G. S. Minor groove binding of the food colorant carmoisine to DNA: Spectroscopic and calorimetric characterization studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Índia, v. 62, p. 317-326, Dez., 2014.
- BASU, P.; BHOWMIK, D.; KUMAR, G. S. The benzophenanthridine alkaloid chelerythrine binds to DNA by intercalation: photophysical aspects and thermodynamic results of iminium versus alkanolamine interaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Índia, v. 129, p. 57-68, Dez., 2013.
- BOLAND, G. M.; DONNELLY, D. M. X. Isoflavonoids and related compounds. **Natural Product Reports**, Irlanda, v. 15, p. 241-260, Jan., 1998.
- BUARQUE, C. D. et al. 11a-N-Tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223), a promising prototype for targeting MDR leukemia cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Brasil, v. 78, p. 190-197, Mar., 2014.

- BUARQUE, C. D. et al. Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.19, p. 6885-6891, Set., 2011.
- CHAKRABORTY, D. P., in: HERZ, W.; GRIESEBACH, H.; KIRBY, G.W. (Ed.). **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. Viena: Springer, 1997, p. 299.
- CHATTOPADHYAY, S. K. Acridone-pterocarpan conjugate: a hybrid molecular probe for recognition of nucleic acids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, India, p. 8145-8153, Nov., 2013.
- CHATTOPADHYAY, S. K.; KUNDU, I.; MAITRA, R. The coumarin-pterocarpan conjugate— a natural product inspired hybrid molecular probe for DNA recognition. **Organic & Biomolecular Chemistry**, India, v. 12, p. 8087-8093, Ago., 2014.
- CHAUDHURI, S. K. et al. Isolation and structure identification of an active DNA strand-scission agent(+)-3,4-di-hydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan. **Journal of Natural Products**, Estados Unidos, v. 58, p. 1966-1969, Dez., 1995.
- CORTOPASSI, W.A. et al. Theoretical and experimental studies of new modified isoflavonoids as potential inhibitors of topoisomerase I from *Plasmodium falciparum*. **PLOS ONE**, Brasil, v. 9, p. 1-7, Mar., 2014.
- CUI, F. et al. Interaction of 3'-azido-3'-deamino daunorubicin with DNA: Multispectroscopic and molecular modeling. **International Journal of Biological Macromolecules**, China, v. 50, p. 1121-1126, Mai., 2012.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products – a Biosynthetic Approach**. 3 ed. Nova York: Wiley & Sons, 2009.
- DORRAJI, P. S.; JALALI, F. Investigation of the interaction of sertraline with calf thymus DNA by spectroscopic methods. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Irã, v. 24, p. 939-945, Jun., 2013.
- FALCÃO, M. J. C. et al. Cytotoxic flavonoids from *Platymiscium floribundum*. **Journal of Natural Products**, Brasil, v. 68, p. 423-426, Fev., 2005.
- GUO, H. et al. Multi-spectroscopic method study the interaction of anti-inflammatory drug ketoprofen and calf thymus DNA and its analytical application. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 79, p. 92-96, Jun., 2011.
- HAQ, I. Thermodynamics of drug-DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Reino Unido, v. 403, p. 1-15, Jul., 2002.
- 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**, India, v.153, p. 510-516, Jan., 2016.
- HOLMES, D. L.; STELLWAGEN, N. C. The electric field dependence of DNA mobilities in agarose gels: a reinvestigation. **Electrophoresis**, Estados Unidos, v. 11, p. 5-15, 1990.
- HUSAIN, M. A. et al. Spectroscopic and molecular docking evidence of aspirin and diflunisal binding to DNA: a comparative study. **RSC Advances**, India, v. 5, p. 64335-64345, Mai., 2015a.

- HUSAIN, M. A. et al. Ibuprofen causes photocleavage through ROS generation and intercalates with DNA: a combined biophysical and molecular docking approach. **Physical Chemistry Chemical Physics**, India, v. 17, p. 13837-13850, Mar., 2015b.
- HYUN, K. M. et al. Can energy transfer be an indicator for DNA intercalation? **Biochimica et Biophysica Acta**, Coreia do Sul, v. 1334, p. 312-316, Mar., 1997.
- ISLAMI-MOGHADDAM, M. et al. Synthesis, Characterization, Cytotoxic and DNA Binding Studies of Diimine Platinum(II) and Palladium(II) Complexes of Short Hydrocarbon Chain Ethyldithiocarbamate Ligand. **Journal of the Iranian Chemical Society**, Irã, v. 6, p. 552-569, Set., 2009.
- JALALI, F.; DORRAJI, P. S. Interaction of anthelmintic drug (thiabendazole) with DNA: Spectroscopic and molecular modeling studies. **Arabian Journal of Chemistry**, Irã, v. 10, p. S3947-S3954, Mai., 2014.
- KAUFMAN, P. B. et al. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, Estados Unidos, v. 3, p. 7-12, Set., 1997.
- KHAN, I. M.; AHMAD, A. Synthesis, spectral investigations, antimicrobial activity and DNA-binding studies of novel charge transfer complex of 1,10-phenanthroline as an electron donor with  $\pi$ -acceptor p-Nitrophenol. **Journal of Molecular Structure**, India, v. 977, p. 189-196, Ago., 2010.
- LI, Y.; ZHANG, G.; TAO, M. Binding properties of herbicide chlorpropham to DNA: Spectroscopic, chemometrics and modeling investigations. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, China, v. 138, p. 109-117, Set., 2014.
- MANSOURI-TORSHIZI, et al. 2,2'-Bipyridinebutyldithiocarbamatoplatinum(II) and palladium(II) complexes: Synthesis, characterization, cytotoxicity, and rich DNA-binding studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Irã, v.16, p. 9616-9625, Nov., 2008.
- MARTIN, G. et al. Antitumoral activity of a new series of 5,6-dihydrobenzo (a) carbazoles. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, Argentina, v. 2, p. 77-84, 2002.
- MILITÃO, G. C. G. et al. Induction of apoptosis by pterocarpanes from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sciences**, Brasil, v. 78, p. 2409-2417, Abr., 2006.
- MILLER, G. H.; SEYDEL, J. K.; DOUKAS, P. H. Sulfonamide structure-Activity relationship in a cell-free system – correlation of inhibition of folate synthesis with antibacterial activity and physicochemical parameters. **Journal of Medicinal Chemistry**, Alemanha, v. 15, p. 700-706, Jul., 1972.
- OISHI, S. et al. Kinesin spindle protein (KSP) inhibitors with 2,3-fused indole scaffolds. **Journal of Medicinal Chemistry**, Japão, v. 53, p. 5054-5058, Jun., 2010.
- OZLUER, C.; KARA, H. E. S. In vitro DNA binding studies of anticancer drug idarubicin using spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Turquia, v. 138, p. 36-42, Set., 2014.
- RAUF, S. et al. Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Austrália, v. 37, p. 205-217, Fev., 2005.

- REHMAN, S. U. et al. Interaction of 6 mercaptopurine with calf thymus DNA – Deciphering the binding mode and photoinduced DNA damage. **PLOS ONE**, India, v. 9, p. 1-11, Abr., 2014.
- REHMAN, S. U. et al. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, India, v. 576, p. 49-60, Jun., 2015a.
- 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**, India, v. 566, p. 7-14, Jan., 2015b.
- SAEIDIFAR, M.; MANSOURI-TORSHIZI, H.; SABOURY, A. A. Biophysical study on the interaction between two palladium(II) complexes and human serum albumin by Multispectroscopic methods. **Journal of Luminescence**, Irã, v. 167, p. 391-398, Nov., 2015.
- SARWAR, T. et al. Multi-spectroscopic and molecular modelling studies on the interaction of esculetin with calf thymus DNA. **Molecular BioSystems**, India, v. 11, p. 522–531, Nov., 2015a.
- 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**, India, v. 73, p. 9-16, Fev., 2015b.
- SAVARIZ, F. C. et al. Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl)  $\beta$ -carboline and their Mannich bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v. 22, p. 6867-6875, Dez., 2014.
- SCHENONE, S. et al. New 1,3,4-thiadiazole derivatives endowed with analgesic and anti-inflammatory activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Itália, v.14, p. 1698-1705, Mar., 2006.
- SCHMIDT, A.W.; REDDY, K.R.; KNÖLKER, H.-J. Occurrence biogenesis, and synthesis of biologically active carbazole alkaloids. **Chemical Reviews**, Alemanha, v. 112, p. 3193–3328, Abr., 2012.
- SHAHABADI, N. et al. Racemic R,S-venlafaxine hydrochloride-DNA interaction: experimental and computational evidence. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Irã, v. 145, p. 540-552, Jun., 2015.
- SHAHABADI, N.; FILI, S. M.; KHEIRDOOSH, F. Study on the interaction of the drug mesalamine with calf thymus DNA using molecular docking and spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Irã, v.128, p. 20-26, Nov., 2013.
- SHAHABADI, N.; HADIDI, S. Spectroscopic studies on the interaction of calf thymus DNA with the drug levetiracetam. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Irã, v. 96, p. 278-283, Out., 2012.
- SHAHABADI, N.; MOGHADAM, N. H. Determining the mode of interaction of calf thymus DNA with the drug sumatriptan using voltammetric and spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Irã, v. 99, p. 18-22, Dez., 2012.
- SHANKARAIHAH, N. et al. Design and synthesis of C3-tethered1,2,3-triazolo- $\beta$ -carboline derivatives: anticancer activity, DNA-binding ability, viscosity and molecular modeling studies. **Bioorganic Chemistry**, India, v. 64, p. 42-50, Nov., 2016.

- SHI, J.-H. 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, Jun., 2015.
- SILVA, M. M. et al. Interaction of  $\beta$ -Carbolines with DNA: spectroscopic studies, correlation with biological activity and molecular docking. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 27, p. 1558-1568, Set., 2016.
- SINGLA, P.; LUXAMI, V.; PAUL, K. Triazine–benzimidazole hybrids: Anticancer activity, DNA interaction and dihydrofolate reductase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, India, v. 23, p. 1691–1700, Abr., 2015.
- 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, Jul., 2013.
- STELLWAGEN, N. C. Effect of the electric field on the apparent mobility of large DNA fragments in agarose gels. **Biopolymers**, Estados Unidos, v. 24, p. 2243-2255, 1985.
- STELLWAGEN, N. C. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. **Electrophoresis**, Estados Unidos, v. 30, p. S188-S195, Mar., 2009.
- STRANIX, B. R. et al. Lysine sulfonamides as novel HIV-protease inhibitors: *n*-Acylaromatic  $\alpha$ -amino acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Canadá, v.16, p. 3459-3462, Jul., 2006.
- SUBASTRI, A. et al. Exploration of disulfiram dealings with calf thymus DNA using spectroscopic, electrochemical and molecular docking techniques. **Journal of Luminescence**, India, v.170, p. 255-261, Fev., 2016.
- SUH, D.; CHAIRES, J. B. Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Estados Unidos, v. 3, p. 723-728, Jun., 1995.
- SUH, D.; OH, Y.-K.; CHAIRES, J. B. Determining the binding mode of DNA sequence specific compounds. **Process Biochemistry**, Coreia do Sul, v. 37, p. 521-525, Dez., 2001.
- SUN, Y. et al. Studies on the arctiin and its interaction with DNA by spectral methods. **Journal of Luminescence**, China, v. 131, p. 2299-2306, Nov., 2011.
- TIAN, Z. et al. Spectroscopic and molecular modeling methods to study the interaction between naphthalimide-polyamine conjugates and DNA. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, China, v. 158, p. 1-15, Mai., 2016.
- VIA, L. D. et al. Synthesis, in vitro antiproliferative activity and DNA-interaction of benzimidazoquinazoline derivatives as potential anti-tumor agentes. **II farmaco**, Itália, v. 56, p. 159-167, Mar., 2001.
- VIOLA, G. et al. Interactions between DNA and benzo- and tetrahydrobenzofurocoumarins: thermodynamic and molecular modeling studies. **II Farmaco**, Italia, v. 55, p. 276-286, Abr., 2000.
- VON ANGERER, E.; PREKAJAC, J. Benzo[a]carbazole Derivatives. Synthesis, estrogen receptor binding affinities and mammary tumor inhibitng activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Alemanha, v. 29, p. 380–386, Mai., 1986.

- WU, X. et al. Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to human serum albumin at subdomain IIA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 79, p. 1202-1209, Set., 2011.
- XIE, J. et al. Spectroscopic analyses on interaction of melamine, cyanuric acid and uric acid with DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 149, p. 714-721, Oct., 2015.
- ZHANG, G. et al. Studies on the interaction of aminocarb with calf thymus DNA by spectroscopic methods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, China, v. 98, p. 206-212, Oct., 2010.
- ZHANG, G.; HU, X.; PAN, J. Spectroscopic studies of the interaction between pirimicarb and calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 78, p. 687-694, Feb., 2011.
- ZHANG, L. et al. Anticancer activity and DNA binding property of the trimers of triphenylethylene-coumarin hybrids. **Chinese Chemical Letters**, China, v. 27, p. 1708-1716, Nov., 2016.
- ZHANG, S. et al. Investigation on the interaction between luteolin and calf thymus DNA by spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 97, p. 521-525, Nov., 2012.
- ZHANG, S. et al. Molecular spectroscopic studies on the interaction of ferulic acid with calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 112, p. 78-83, Ago., 2013.
- 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, Nov., 2014.
- ZHOU, X. et al. Intercalation of the daphnetin-Cu(II) complex with calf thymus DNA. **RSC Advances**, China, v. 6, p. 5408-5418, Jan., 2016.
- ZHOU, X.; ZHANG, G.; WANG, L. Probing the binding mode of psoralen to calf thymus DNA. **International Journal of Biological Macromolecules**, China, v. 67, p. 228-237, Jun., 2014.
- ZHU, P. et al. Study of DNA interactions with bifenthrin by spectroscopic techniques and molecular modeling. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 112, p. 7-14, Ago., 2013.

---

---

# Seção 4

## Piperidinas e ctDNA

---

---

## 4 ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE PIPERIDINAS COM ctDNA

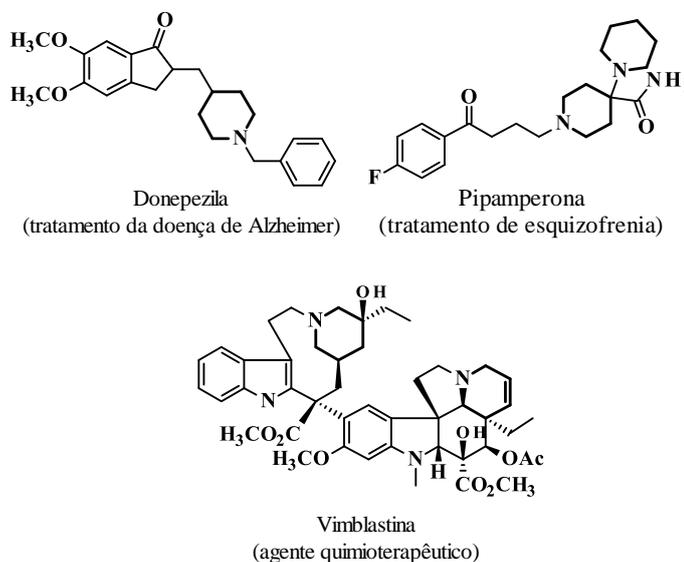
### 4.1 Introdução

Compostos heterocíclicos contendo nitrogênio são amplamente encontrados em produtos naturais e farmacêuticos (BEHENNA et al., 2012). Muitos deles desempenham funções essenciais no organismo humano e apresentam propriedades biológicas (PATIL; BARI; 2014).

As piperidinas e seus derivados compreendem uma importante classe de N-heterociclos de interesse biológico. Compostos que possuem a porção piperidina exibem uma ampla gama de propriedades biológicas, incluindo anti-hipertensiva (PETIT et al., 1991), antibacteriana (ZHOU et al., 2007), antimalárica (MISRA et al., 2009), anti-inflamatória (HO; CRIDER; STABLES; 2001), analgésica (RAO et al., 1995; GANGAPURAM; REDDA, 2006), antioxidante (RAVINDERNATH; REDDY, 2017) e atividade antiproliferativa (AELURI et al., 2012).

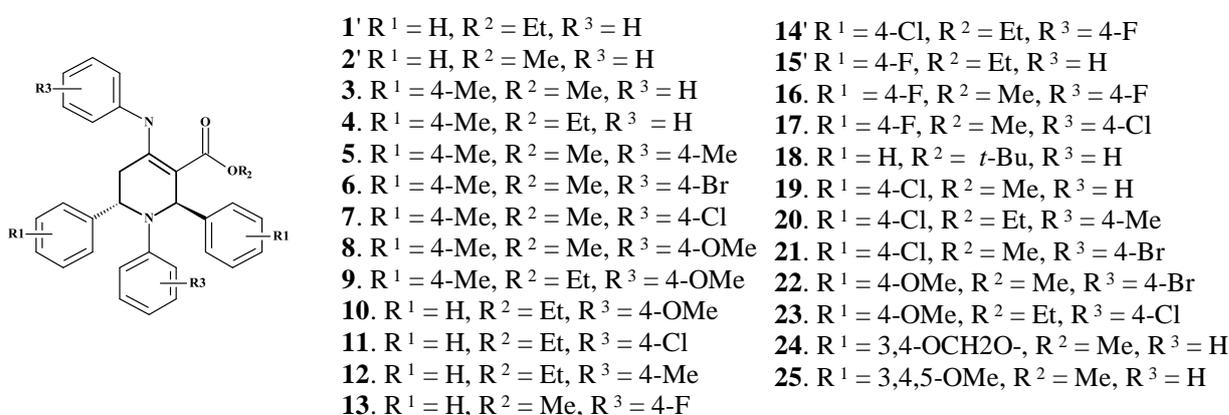
Vários compostos contendo o núcleo piperidínico são empregados na clínica atual como fármaco para o tratamento de doenças. Donepezila (Fig. 1), um potente inibidor não competitivo e reversível da acetilcolinesterase, é prescrito para tratar pacientes com doença de Alzheimer (WILKINSON, 1999). Pipamperona (Fig. 1), outro derivado de piperidina 1,4-substituído, é indicado para pacientes com esquizofrenia (SCHOTTE et al., 1996). Vimblastina (Fig. 1), um alcaloide de ocorrência natural derivado da *Catharanthus roseus*, é usado como agente anticancerígeno para uma ampla variedade de câncer, incluindo câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de mama, bexiga, linfomas e leucemia (KOSJEK et al., 2013).

**Figura 1 - Exemplos de derivados de piperidina com potentes atividades biológicas.**



Devido às suas propriedades biológicas pronunciadas, vários métodos foram desenvolvidos para a síntese de derivados de piperidinas (BRAHMACHARI; DAS, 2012). Recentemente, foi descrita a síntese de piperidinas funcionalizadas por meio de reações multicomponentes catalisadas pelo nitrato de bismuto (BRAHMACHARI; DAS, 2012). Neste trabalho, será relatado a avaliação da atividade de 25 compostos previamente sintetizados (Fig. 2) como inibidores da proliferação de células cancerígenas. Além disso, as interações dos compostos selecionados com o DNA foram avaliadas, uma vez que várias patologias têm o DNA como principal alvo biológico.

**Figura 2 - Estruturas dos derivados de piperidina previamente sintetizados.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

## 4.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- i) Determinar as constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), constantes de ligação ( $K_b$ ), estequiometria DNA-ligante ( $n$ ) e a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ );
- ii) Explorar a técnica UV-Vis visando avaliar o mecanismo de *quenching* dominante no processo de interação;
- iii) Determinar o modo de ligação DNA-ligante;
- iv) Correlacionar os valores das constantes de ligação ( $K_b$ ) obtidas com os valores de  $GI_{50}$ , buscando relacionar a interação com ctDNA e inferir sobre o mecanismo de ação da atividade antiproliferativa.
- v) Realizar experimentos de dinâmica e *docking* molecular, buscando determinar a energia de ligação relativa ao complexo formado e as forças preferenciais que regem esse processo de interação.

### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Atividade antiproliferativa

Como o núcleo piperidínico está presente em muitos compostos ativos, buscou-se investigar o efeito dos compostos **1-25** na proliferação de oito linhagens de células cancerígenas de várias origens, incluindo U251 (glioma), MCF7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário resistente), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, não pequenas células), PC-3 (próstata) e HT29 (cólon). O efeito antiproliferativo destes derivados de piperidinas também foram avaliados contra a linhagem celular HaCaT (queratinócito humano) a fim de verificar a sua toxicidade frente as células normais. A proliferação celular foi determinada por medidas espectrofotométricas empregando sulforodamina B como um corante de ligação de proteína e doxorubicina (DOX; 0,025-25 mg/mL) como medicamento de referência. As concentrações dos compostos que provocaram a inibição do crescimento celular em 50% (GI<sub>50</sub>) e seus índices de seletividade (IS) estão resumidos na Tabela 1. O IS é definido como a razão do GI<sub>50</sub> do composto puro numa linhagem celular normal (isto é, linhagem celular HaCat) pelo GI<sub>50</sub> do mesmo composto puro em uma linha celular de câncer.

PC-3 foi a linhagem celular mais sensível, entre todos os compostos avaliados, os derivados de piperidina **1, 2, 3, 7, 10, 16, 21, 22, e 25** foram os mais ativos contra essa linhagem, com valores de GI<sub>50</sub>  $\leq 25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , destacando os compostos **1 e 25**, que exibiram valores de GI<sub>50</sub> de 6,3 e 6,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 1). Como o valor do IS indica uma atividade diferencial de um composto teste, vale ressaltar que os compostos **1 e 25** também apresentaram os maiores valores de IS ( $\geq 39,0$ ; Tabela 1) para a linhagem celular PC-3. Estes valores de IS são, pelo menos, 10 vezes superiores ao valor esperado para um composto candidato altamente seletivo em ensaios pré-clínicos *in vitro* (STONE et al., 2013; SUFIAN et al., 2013). Além desses resultados importantes, vale mencionar que os compostos **3, 2 e 10** também apresentaram um elevado grau de seletividade ( $\geq 10,0$ ) para as células PC-3 (Tabela 1). De fato, Ogbole e colaboradores (2014) classificam como compostos não citotóxicos qualquer substância que possua valor de IS maior que 20, enquanto aqueles que apresentam IS  $\geq 10$  são considerados como um composto citotóxico fraco.

**Tabela 1 – Atividade citotóxica (valores de  $GI_{50}^a$  em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e índices de seletividade ( $IS^b$ , dado entre parênteses) de piperidinas funcionalizadas e doxorrubicina (DOX) frente a diferentes linhagens celulares de câncer e HaCat.**

Compostos	Linhagem celular <sup>c</sup>							
	U251	MCF7	NCI/ADR-RES	786-0	NCI-H460	PC-3	HT29	HaCaT
1	>250	>250	>250	113,9 (>2,2)	>250	6,3 (>39,7)	>250	>250
2	>250	>250	>250	20,0 (>12,5)	>250	17,2 (>14,5)	>250	>250
3	>250	>250	>250	23,0 (>10,9)	>250	7,8 (>32,0)	>250	>250
4	>250	>250	>250	160,7 (>1,5)	>250	56,9 (>4,4)	>250	>250
5	>250	>250	>250	71,8 (>3,5)	>250	>250	>250	>250
6	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
7	181,8 (0,5)	48,9 (2,0)	38,7 (2,5)	62,1 (1,5)	94,7 (1,0)	14,4 (6,7)	111,0 (0,9)	95,9
8	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
9	>250	>250	>250	74,7 (>3,3)	>250	>250	>250	>250
10	>250	39,4 (>6,3)	>250	14,2 (>17,6)	>250	25,0 (>10,0)	83,5 (>3,0)	>250
11	>250	>250	194,8 (>1,3)	241,9 (>1,0)	>250	>250	>250	>250
12	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
13	>250	189,8 (>1,3)	48,7 (>5,1)	>250	>250	39,0 (>6,4)	69,1 (>3,6)	>250
14	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
15	>250	>250	90,5 (>2,7)	166,8 (>1,5)	>250	>250	>250	>250
16	208,5 (0,3)	26,2 (2,4)	17,5 (3,6)	0,4 (156,0)	57,3 (1,9)	10,2 (6,1)	4,1 (15,2)	62,4
17	193,8 (0,1)	>250	>250	12,1 (10,8)	207,2 (0,6)	>250	>250	130,8
18	>250	>250	>250	63,2 (>4,0)	>250	>250	>250	>250
19	>250	71,5 (>3,5)	>250	46,9 (>5,3)	>250	134,2 (>1,9)	106,2 (>2,3)	>250
20	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
21	96,7 (0,4)	45,5 (0,8)	71,7 (0,5)	82,5 (0,5)	112,6 (0,3)	16,0 (0,4)	188,3 (0,2)	38,6
22	58,2 (1,1)	67,6 (0,9)	19,8 (3,1)	54,4 (1,1)	26,3 (2,3)	10,6 (5,8)	90,0 (0,7)	62,0
23	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
24	>250	146,0 (>1,7)	>250	>250	>250	45,5 (>5,5)	>250	>250
25	>250	>250	23,3 (>10,9)	>250	>250	6,4 (>39,1)	>250	>250
<b>DOX</b>	0,03 (1,0)	0,07 (0,4)	0,3 (0,1)	0,03 (1,0)	0,01 (3,0)	0,1 (0,3)	0,2 (0,1)	0,03

<sup>a</sup>  $GI_{50}$  concentração do composto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) que inibe 50% do crescimento celular; <sup>b</sup> O índice de seletividade foi determinado como a razão entre o valor de  $GI_{50}$  para HaCat e o valor de  $GI_{50}$  obtido para a linhagem de células cancerígenas; <sup>c</sup> U251, células de glioma; MCF7, células de câncer de mama; NCI/ADR-RES, células de câncer de ovário resistentes a múltiplas drogas; 786-0, células de câncer renal; NCI-H460, câncer de pulmão de não pequenas células; PC-3, células de câncer de próstata; HT29, células de câncer de cólon; HaCat, queratinócitos humanos.

Fonte: elaborado em colaboração com o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (UNICAMP), 2018.

Os compostos **2**, **3**, **10**, **16** e **17** também foram promissores exibindo valores de  $GI_{50}$  inferiores a  $25 \mu\text{g/mL}$  e valores de IS superiores a 10,0 para a linhagem celular de rim (786-0). O derivado de piperidina **16**, com  $GI_{50}$  de  $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , foi a série mais ativa para essa linhagem celular (Tabela 1). O IS do composto **16** foi de 156,0, o que significa que este derivado é muito mais ativo contra esta linhagem de células renais do que para as células de queratinócitos (células HaCaT). Em comparação com outros tipos de câncer, a quimioterapia é bastante ineficaz para o câncer de células renais. Muitos agentes anticancerígenos foram testados contra o câncer de células renais, mas a maioria mostraram taxas de resposta inferiores a 10% (RINI et al., 2000; LILLEBY, 2005; STADLER et al., 2006). Além da menor eficiência, os perfis de toxicidade dos principais compostos para tratar o câncer de células renais parecem ainda ser um problema, o que torna a quimioterapia uma abordagem ineficiente (NELSON et al., 2007). Levando em conta todas as considerações acima, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que o derivado de piperidina **16** é um composto líder para estudos adicionais em modelos *in vivo*.

Em geral, as células U251, MCF7, NCI/ADR-RES, NCI-H460 e HT29 foram menos sensíveis aos compostos testados. O composto mais ativo contra as células U251 foi o derivado **22** ( $GI_{50}$  de  $58,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Tabela 1). A linhagem NCI/ADR-RES foi resistente à maioria dos derivados de piperidinas, com exceção dos compostos **16**, **22** e **25**, que mostraram valores de  $GI_{50}$  de 17,5, 19,8 e  $23,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 1). O composto **22** também foi ativo contra as células NCI-H460 ( $GI_{50}$  de  $26,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Tabela 1). Por fim, o composto **16** foi o mais ativo contra MCF7 ( $GI_{50}$  de  $26,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e HT29 ( $GI_{50}$  de  $4,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Tabela 1). Todos os compostos foram consideravelmente mais tóxicos para as linhagens celulares de câncer estudadas do que para as células normais HaCaT e os valores de IS dos derivados de piperidina são, em geral, superiores aos apresentados pela doxorrubicina (DOX), um composto de referência anticâncer utilizado neste estudo (Tabela 1).

### 4.3.2 Estudos de interação DNA-piperidinas

#### 4.3.2.1 Avaliação da interação dos derivados piperidínicos com o ctDNA por fluorescência molecular

A interação entre os derivados de piperidina e ctDNA foi avaliada pela técnica de espectrofluorimetria, pois apresenta características como rapidez, elevada sensibilidade e fornece informações sobre o modo de ligação do ligante com a macromolécula (AFRIN et al., 2017; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Assim, selecionou-se os derivados de piperidina 7, 8, 9, 10, 16, 21, 22 e 25, os quais apresentam atividade biológica variada (baixa a alta) contra diferentes linhagens de células tumorais humanas. O composto **8** foi considerado o controle negativo, pois apresentou  $GI_{50} > 250 \mu\text{g mL}^{-1}$  para todas as linhagens de células avaliadas, enquanto o composto **16** foi considerado o mais ativo e seletivo, principalmente para linhagem 786-0 (células de câncer renal) com  $GI_{50} = 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  e índice de seletividade igual a 156. Dessa forma, o composto **16** usado como modelo para a apresentação dos resultados.

Como os compostos avaliados possuem fluorescência intrínseca, estes foram titulados com o ctDNA, mantendo-se fixa a concentração do ligante e variando a concentração da macromolécula. Nesse ensaio, verificou-se que os compostos apresentaram máxima emissão na faixa de 350 a 442 nm, quando excitados entre 246-278 nm, apresentando decréscimo do sinal analítico ao adicionar quantidades crescentes de ctDNA ao sistema (Fig. 3a). Essas mudanças espectrais representam um forte indício de que está ocorrendo interação entre o DNA e os ligantes avaliados (LI, J. et al., 2012). Segundo Mukherjee e Sing (2017) esse fenômeno é denominado de *quenching*, e pode ocorrer por diferentes mecanismos geralmente classificados por *quenching* dinâmico, o qual ocorre quando os fluoróforos (piperidinas) no estado excitado ( $F^*$ ) são desativados ao entrar em contato com uma molécula *quencher* ( $Q = \text{ctDNA}$ ) durante a existência do estado excitado; e o *quenching* estático que se refere à formação de um complexo supramolecular não-fluorescente ( $F-Q$ ) no estado fundamental, sendo independente de processos difusionais ou colisões moleculares (DARABI et al., 2014). A equação que descreve esse processo está representada abaixo:

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

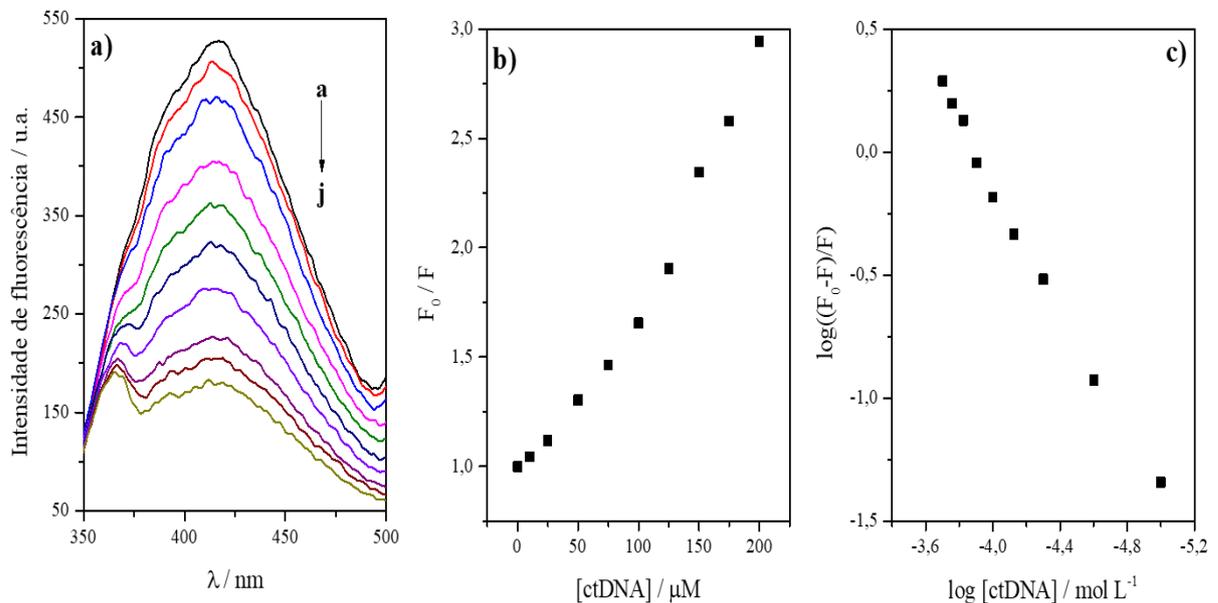
em que  $F_0$  e  $F$  representam as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do ligante, respectivamente;  $K_q$  é a constante de velocidade de *quenching* bimolecular difusional ( $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $\tau_0$  é o tempo de vida médio, tipicamente  $10^{-8} \text{ s}$  (AFRIN et al., 2017; DEHKHODAEI et al., 2017),  $[Q]$  refere-se a concentração da espécie *quencher*, neste caso o ctDNA e  $K_{sv}$  é a constante de Stern-Volmer, calculada através da linearização da Equação 1,

apresentada na Figura 3b. Para analisar a força da ligação ctDNA-ligante, calculou-se a constante de interação ( $K_b$ ), além do parâmetro  $n$ , relativo ao número de sítios de ligação (Fig. 3c) na macromolécula de acordo com a equação abaixo (MOVAHEDI; REZVANI et al., 2017):

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

Os valores da constante de ligação e número de sítios são obtidos através dos coeficientes angular e linear da curva  $\log[(F_0-F)/F]$  vs  $\log[ctDNA]$ .

**Figura 3 - Interação do derivado 16 com ctDNA empregando espectroscopia de fluorescência molecular; a) Perfil espectral de fluorescência do composto 16 (10  $\mu$ M) na presença de concentrações crescentes de ctDNA (0, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200  $\mu$ M, curvas a-j respectivamente); b) Gráfico de Stern-Volmer para o processo de *quenching* a 25°C; c) Curva logaritma dupla para o processo de interação 16-ctDNA a 25°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Adicionalmente, a partir do valor de  $K_b$  calculou-se o parâmetro termodinâmico relativo a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) objetivando avaliar a espontaneidade do processo de interação por meio da Equação 3 descrita abaixo (SHUJHA et al., 2010).

$$\Delta G = -RT \ln(K_b) \quad \text{Equação (3)}$$

onde T representa a temperatura em Kelvin (K) e R a constante do gás ideal (8,314472 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>). A Tabela 2 mostra os resultados obtidos para essa avaliação.

Tabela 2 - Parâmetros de interação do ctDNA com derivados de piperidina a 25 °C.

Compostos	Constante de Stern-Volmer		Parâmetros de ligação				Parâmetro termodinâmico
	$K_{sv}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	$r$	$K_q$ ( $10^{11} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$K_b$ ( $10^4 \text{ L mol}^{-1}$ )	$n$	$r$	$\Delta G$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )
7	$5,80 \pm 0,17$	0,9959	5,80	$1,67 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,04$	0,9960	-24,1
8	$4,29 \pm 0,29$	0,9862	4,29	$0,92 \pm 0,01$	$1,10 \pm 0,01$	0,9760	-22,6
9	$10,4 \pm 0,5$	0,9897	10,4	$2,19 \pm 0,01$	$1,09 \pm 0,06$	0,9916	-24,8
10	$8,98 \pm 0,30$	0,9954	8,98	$4,26 \pm 0,01$	$1,19 \pm 0,02$	0,9989	-26,4
16	$9,58 \pm 0,59$	0,9852	9,58	$8,00 \pm 0,01$	$1,26 \pm 0,04$	0,9972	-27,9
21	$6,08 \pm 0,32$	0,9917	6,08	$0,10 \pm 0,01$	$0,70 \pm 0,02$	0,9968	-6,47
22	$21,9 \pm 0,6$	0,9978	21,9	$6,02 \pm 0,01$	$1,31 \pm 0,04$	0,9987	-27,3
25	$9,68 \pm 0,75$	0,9796	9,68	$2,88 \pm 0,01$	$1,14 \pm 0,09$	0,9810	-25,4

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Os valores de  $K_{SV}$  variaram de 4,29 a  $21,9 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ , indicando a extensão do decréscimo do sinal na presença da molécula *quencher* (Tabela 2). Para caracterizar o mecanismo de *quenching* dominante no processo avaliou-se o parâmetro  $K_q$  que, de acordo com Dehkhodaei e colaboradores (2017) quando essa constante de velocidade for menor que  $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , o mecanismo de *quenching* preferencial será dinâmico, enquanto que para valores de  $K_q$  superiores é indicativo de *quenching* estático. Dessa maneira, como observado na Tabela 2, os valores de  $K_q$  variaram de 4,29 a  $21,9 \times 10^{11} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , sendo superiores a constante difusional limitante, logo caracterizando o mecanismo dominante como *quenching* estático, que ocorre pela formação de complexo supramolecular não fluorescente no estado fundamental.

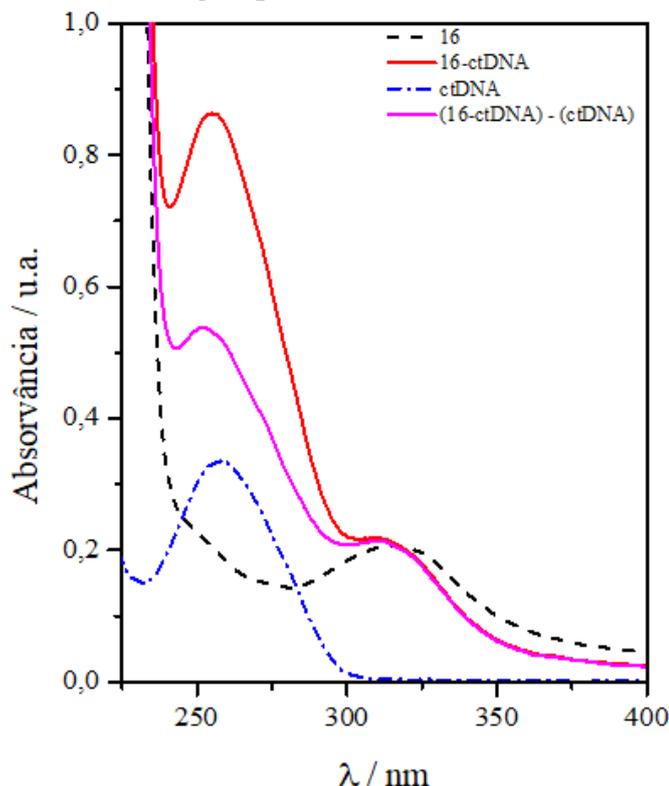
Verifica-se que os valores de  $K_b$  variaram de 0,10 a  $8,0 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$  (Tabela 2), demonstrando a magnitude da interação ctDNA-ligante, a qual para a maioria dos ligantes é considerada de média afinidade, com exceção do composto **21** que apresentou constante na ordem de  $10^2$ , sendo classificada de baixa afinidade (SILVA C. M. et al., 2017). Assim, em termos gerais observou-se que os valores das constantes de ligação com ctDNA seguiram a seguinte ordem: **16** > **22** > **10** > **25** > **9** > **7** > **8** > **21**, sendo o composto mais ativo e seletivo (**16**) o que exibiu maior valor de  $K_b$  e por consequência, os menos ativos (**8** e **21**) os que apresentaram os menores valores de constantes de ligação.

Os resultados obtidos são concordantes com trabalhos da literatura, que avaliaram a interação de diferentes compostos com o núcleo piperidínico com DNA, como morfina ( $K_b = 0,39 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ ) (LI; DONG, 2009), vincristina ( $K_b = 1,70 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ ) (MOHAMMADGHOLI; RABBANI-CHADEGANI; FALLAH, 2013), vimblastina ( $K_b = 0,17 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ ) (TYAGI et al., 2012) e berberina ( $K_b = 1,55 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ ) (LI, X. L. et al., 2012). Adicionalmente, para todos os compostos o modo de ligação preferencial foi por intercalação. Por fim, nota-se que os valores de  $n$  foram próximos a unidade, mostrando relação estequiométrica 1:1 (DNA:ligante) e, os valores de  $\Delta G$  foram todos negativos, caracterizando o processo de interação como espontâneo (ZHANG et al., 2013).

#### 4.3.2.2 Estudos por espectroscopia UV-visível

A espectroscopia UV-visível é uma técnica simples e eficiente para detectar a formação de complexos entre diferentes ligantes e macromoléculas (AFRIN et al., 2017). Assim, a Figura 4 mostra o espectro de absorção do composto **16** na ausência e presença do DNA, e o DNA livre.

**Figura 4 - Espectros de absorção UV-vis do composto 16 (10  $\mu$ M), ctDNA (100  $\mu$ M), complexo 16-ctDNA e (16-ctDNA) - ctDNA. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 10 mM, 100 mM NaCl).**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Observa-se a partir da Figura 4, que ao adicionar ctDNA ao sistema ocorreu um aumento na absorvância, denominado de efeito hipercrômico, indicando que está ocorrendo interação entre o ligante e a biomolécula, com possível formação de complexo (SARWAR et al., 2015). Para confirmar a existência dessa interação, fez-se um espectro da diferença entre o complexo ctDNA-piperidina e o ctDNA livre, verificando-se que os espectros de absorção dos derivados piperidínicos não são sobreponíveis. Estas mudanças espectrais são melhores observadas a partir dos valores de absorvância (Tabela 3) da mistura **16**-ctDNA ( $A_{\text{complexo}} = 0,8626$ ), e a soma dos valores das absorvâncias do composto livre e ligado ao ctDNA ( $A_{16} + A_{\text{ctDNA}} = 0,5407$ ).

**Tabela 3 - Valores de absorvância dos derivados de piperidina (10  $\mu$ M), ctDNA (100  $\mu$ M) e complexo composto-ctDNA. Condições: pH = 7,4 (Tris-HCl 10 mM, 100 mM NaCl).**

Compostos	$A_{\text{composto}} / \text{a.u.}$	$A_{\text{ctDNA}} / \text{a.u.}$	$A_{\text{complexo}} / \text{a.u.}$	$\Delta A$
<b>7</b>	0,3639	0,3330	0,9546	0,2577
<b>8</b>	0,1831	0,3333	0,8271	0,3107
<b>9</b>	0,1924	0,3331	0,8538	0,3283
<b>10</b>	0,2327	0,2878	0,8601	0,3396
<b>16</b>	0,2074	0,3333	0,8626	0,3219
<b>21</b>	0,2761	0,3332	0,9165	0,3072
<b>22</b>	0,3354	0,3333	0,8531	0,1844
<b>25</b>	0,1765	0,3333	0,8654	0,3553

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Por meio da equação  $\Delta A = A_{\text{complexo}} - (A_{\text{composto}} + A_{\text{ctDNA}})$ , verifica-se que o valor de  $\Delta A \neq 0$  ( $\Delta A = 0,3219$ ), o qual indica que ocorreram alterações no estado fundamental, caracterizando um mecanismo preferencial de *quenching* estático, devido à formação de complexo macromolécula-ligante (DANTAS et al., 2017), reforçando a proposta obtida pelos resultados por fluorescência molecular. Entretanto, caso o *quenching* dinâmico fosse o mecanismo predominante no processo de interação, não seriam esperadas alterações espectrais, uma vez que este afeta somente o estado excitado (SILVA M. M. et al., 2017; MOVAHEDI; REZVANI, 2017). Comportamento similar foi observado para os demais compostos avaliados, como mostrado na Tabela 3.

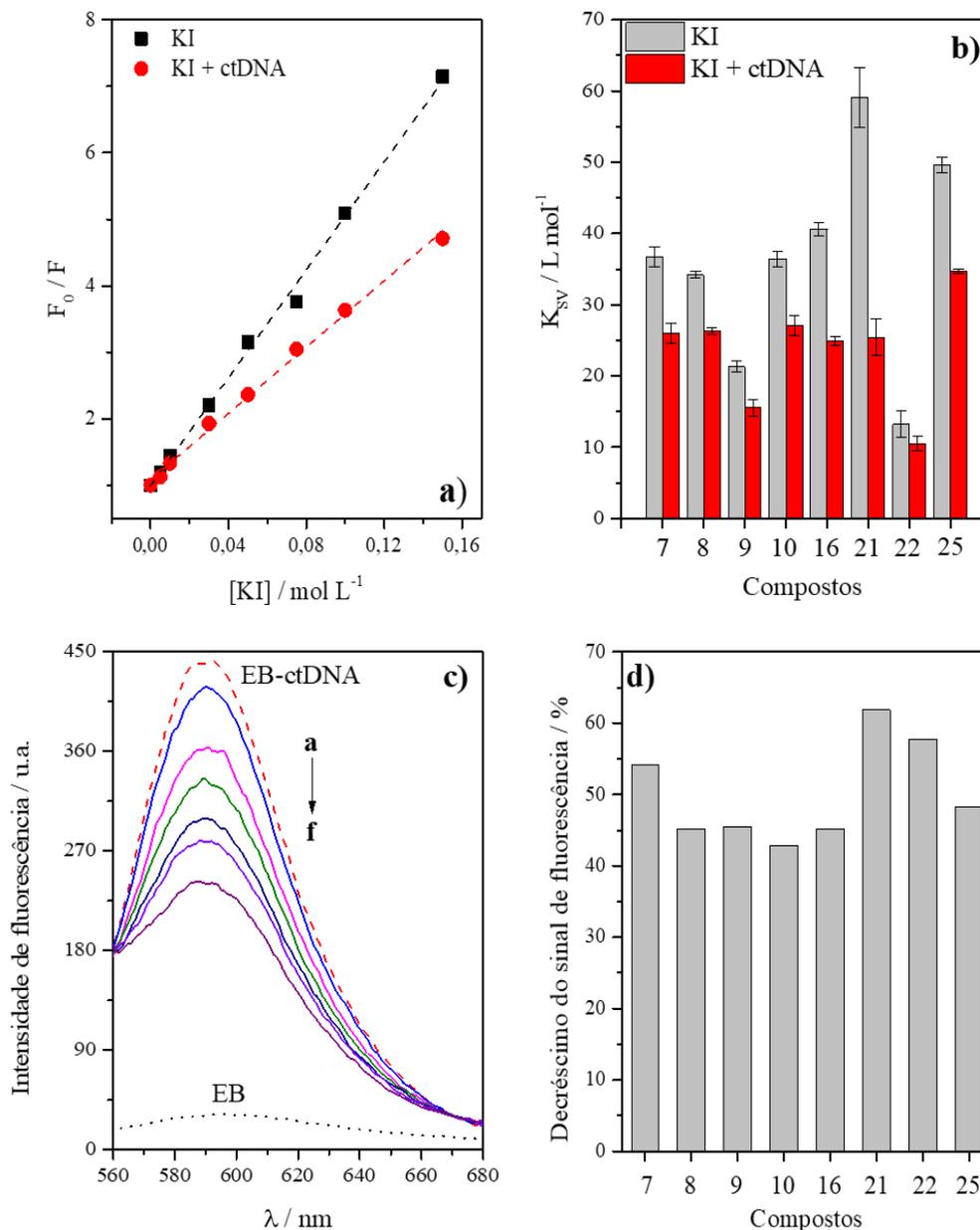
#### 4.3.2.3 Avaliação do modo de interação DNA-ligante

O modo de ligação dos derivados piperidínicos e o ctDNA foi avaliado a partir de dois ensaios: estudo do *quenching* pelo KI e competição com brometo de etídio, apresentados na Figura 5.

##### 4.3.2.3.1 Estudo de *quenching* pelo KI

Os estudos de *quenching* de fluorescência fornecem informações sobre a acessibilidade dos ligantes a molécula supressora de fluorescência, no caso o íon iodeto (JALALI; DORRAJI, 2014). Dessa forma, avalia-se a magnitude da constante de Stern-Volmer na presença e ausência de ctDNA, conforme a Equação 1, onde a [Q] equivale a [KI]. A Figura 5a mostra o *quenching* de fluorescência do derivado **16** na ausência e presença da macromolécula, e os valores de  $K_{SV}$  para todos os compostos são apresentados na Figura 5b.

**Figura 5 - Avaliação do modo de ligação ctDNA-ligante; a) Gráfico de Stern-Volmer para o quenching de fluorescência do composto 16 pelo KI na ausência e presença de ctDNA (100  $\mu\text{M}$ ); b) Constantes de Stern-Volmer dos derivados de piperidinas (10  $\mu\text{M}$ ) na ausência e presença de ctDNA (100  $\mu\text{M}$ ); c) Perfil espectral do deslocamento do EB (2  $\mu\text{M}$ ) no complexo ctDNA-EB pelo composto 16 no intervalo de concentração de 10-60  $\mu\text{M}$ , curvas a-f, respectivamente; d) Percentual de decréscimo da intensidade de fluorescência do complexo ctDNA-EB na presença dos derivados de piperidinas. Condição: pH = 7,4 (Tris-HCl 10 mM, 100 mM NaCl).**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Os valores de  $K_{sv}$  na presença de ctDNA foram sistematicamente menores que na ausência da macromolécula, indicando que o ânion iodeto não conseguiu ter acesso aos ligantes (Fig. 5b), sugerindo que estes estão protegidos pelos pares de bases do DNA, impedindo o

acesso do supressor aniônico (KUNDU; CHATTOPADHYAY, 2017). Logo, pode-se inferir que o principal modo de ligação desses compostos ao ctDNA ocorre via intercalação.

#### 4.3.2.3.2 Ensaio de competição com brometo de etídio (EB)

Para confirmar os resultados sugeridos pelo ensaio do KI, realizou-se um estudo de competição com o brometo de etídio, uma sonda clássica que interage com o DNA via intercalação. Em solução aquosa, esse competidor quando livre apresenta baixa fluorescência, no entanto quando se liga ao DNA seu sinal aumenta significativamente devido a sua localização entre os pares de bases nitrogenadas (USMAN; AHMAD, 2017). Assim, qualquer pequena molécula que substitua o EB na macromolécula irá interagir com o mesmo modo de ligação que a sonda (REHMAN et al., 2015). Nesse sentido, a Figura 5c mostra que, ao adicionar quantidades crescentes do composto **16** ao sistema, ocorre uma diminuição gradual no sinal de fluorescência, evidenciando que o brometo de etídio está sendo deslocado do ctDNA.

O percentual de decréscimo do sinal variou de 42,9 a 61,9 % (Fig. 5d), utilizando um excesso de até 30 vezes dos ligantes em relação à quantidade inicial de brometo de etídio, sugerindo assim que os compostos avaliados interagem preferencialmente por intercalação (SAVARIZ et al., 2014), confirmando os resultados anteriores. Por fim, a confirmação do modo de ligação por intercalação corrobora com trabalhos da literatura que avaliaram a interação de compostos contendo o núcleo piperidínico com o DNA (LI; DONG, 2009; MOHAMMADGHOLI; RABBANI-CHADEGANI; FALLAH, 2013; TYAGI et al., 2012; LI, X. L. et al., 2012).

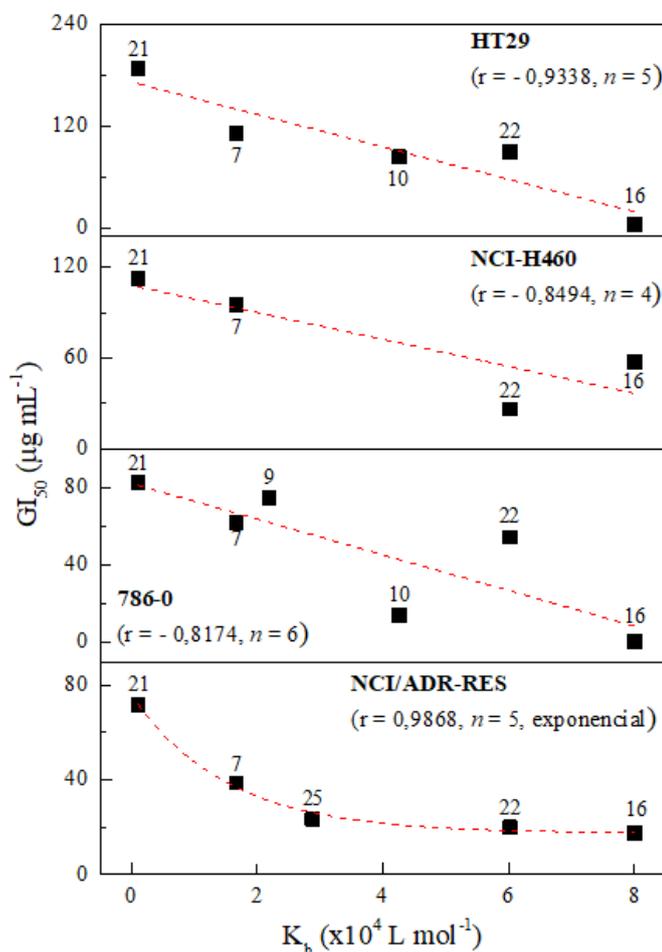
#### 4.3.2.4 Correlação dos valores de $K_b$ com $IC_{50}$

Para inferir sobre o mecanismo de ação dessa classe de compostos, se avaliou a correlação entre os valores de constantes de interação ( $K_b$ ) das piperidinas com ctDNA (Tabela 2) e a atividade citotóxica ( $GI_{50}$ ) referente as linhagens de células cancerígenas humanas (Tabela 1).

A avaliação da correlação foi efetuada apenas para os compostos com valores de  $GI_{50} < 250 \mu\text{g mL}^{-1}$ , o que limitou o número de pontos utilizados na modelagem matemática para cada sistema. Como o composto **8** apresentou para todas as linhagens  $GI_{50} > 250 \mu\text{g mL}^{-1}$  (controle negativo), este não foi utilizado para fazer a correlação. A Figura 6 apresenta os coeficientes de correlação obtidos para as linhagens de cólon (HT-29), pulmão (NCI-H460), rim (786-0) e

ovário resistente (NCI-ADR/RES), para as demais linhagens de células tumorais humanas e células saudias, a correlação não foi significativa, onde  $r < -0.30$ .

**Figura 6 - Correlação entre atividade biológica e afinidade de ligação do DNA e piperidinas.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

De acordo com a Figura 6, observa-se que o composto que apresentou maior interação com ctDNA (derivado **16**), de forma geral, foi o mais ativo frente as linhagens de células avaliadas. Os compostos menos ativos (derivados **8** e **21**) foram aqueles com as menores constantes de interação com ctDNA. Os valores dos coeficientes de correlação obtidos pelo gráfico  $GI_{50}$  vs.  $K_b$  apresentaram coeficiente de correlação na faixa de  $0,8174 \leq |r| \leq 0,9868$ , sendo que as linhagens HT29, NCI-H460 e 786-0 apresentaram tendência linear inversa, enquanto para NCI/ADR-RES se observou relação exponencial inversa. Para estas linhagens o valor de  $GI_{50}$  foi inversamente proporcional a  $K_b$ , indicando que a interação com DNA pode ser um dos possíveis mecanismos de ação destes compostos.

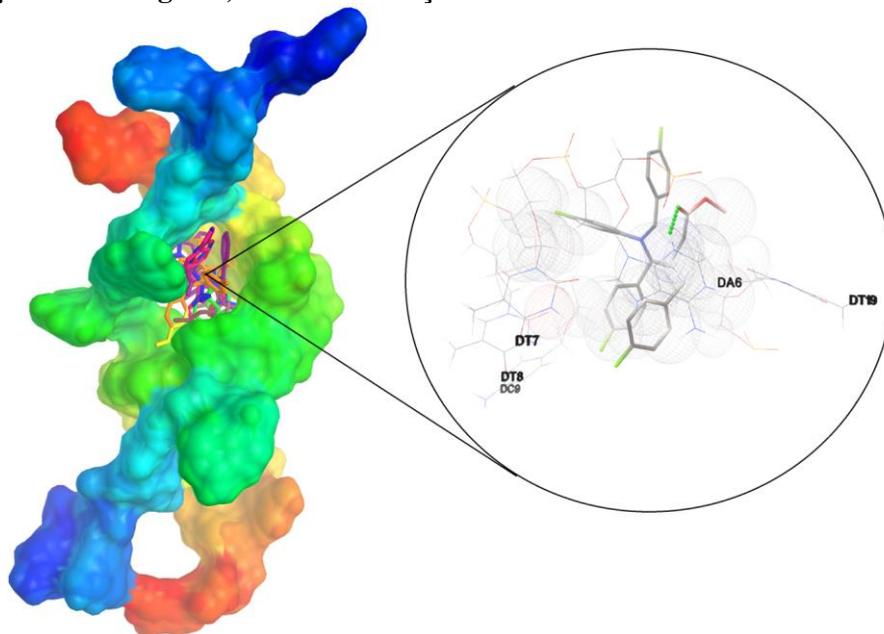
Esses dados são concordantes com trabalhos da literatura que avaliaram a correlação entre a interação com o DNA ( $K_b$ ) e valores de atividade biológica. Silva e colaboradores (2016) obtiveram relação linear a partir do  $\log K_b$  entre ctDNA e derivados  $\beta$ -carbólicos com valores

de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) para seis linhagens de células tumorais humanas, obtendo coeficientes de determinação ( $r^2$ ) de 0,5360 a 0,9600. Em avaliação similar, Silva, C.M. e colaboradores (2017) observaram relação linear a partir do  $\log K_b$  entre ctDNA e bases de Schiff com valores de  $GI_{50}$  ( $\mu g mL^{-1}$ ) para sete linhagens de células tumorais humanas, obtendo coeficientes de correlação ( $r$ ) de -0,9778 a +0,8693. Mckeever, Kaiser e Rozas (2013) avaliaram a correlação da interação com DNA e atividade antiprotozoária para derivados guanidina diaromáticas exibindo valor de  $r^2 = 0,87$ . Por fim, Silva e colaboradores (2014) observaram correlação exponencial entre valores de  $K_b$  e  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) para compostos ternários de cobre(II) com ligantes heterocíclicos N-doadores e atividade citotóxica frente a leucemia mieloide crônica.

#### 4.3.2.5 Dinâmica molecular

A dinâmica molecular associada a estudos de *docking* molecular tem sido utilizada com sucesso no reconhecimento de interações ligante-macromolécula (AJLOO et al., 2015). A dinâmica foi realizada com a estrutura nativa do DNA em um meio fisiológico, após 6 ns. Verificou-se que o cristal de raio-X do DNA possui uma conformação rígida, o que não permite que os ligantes adotem o modo de ligação de intercalação na macromolécula. Com base nisso, a dinâmica molecular deve ser realizada para permitir uma reorganização das bases do DNA, melhorando o espaçamento entre elas (AJLOO et al., 2013). O *docking* molecular foi realizado para validar o modo de ligação dos derivados de piperidina. A Figura 7 mostra que os compostos ancorados ligam ao DNA via intercalação, e que os complexos são estabilizados principalmente por interações  $\pi$ - $\pi$  e hidrofóbicas.

**Figura 7 – Docking molecular (agrupamento) dos compostos de piperidina no DNA gerado por simulações MD. Representação esquemática do composto 16, que se liga via intercalação. Pontos verdes: ligações de hidrogênio; esferas: interações hidrofóbicas.**



Fonte: elaborado em colaboração com o Laboratório de Química Medicinal (UFAL), 2018.

Adicionalmente, apenas os derivados **9**, **10** e **16** mostraram ligações de hidrogênio, envolvendo o grupo carbonila (Tabela 4). As energias do *docking* variaram de -7,1 a -7,8 kcal mol<sup>-1</sup>, o que corrobora a alta afinidade com o DNA e são comparáveis com os resultados da espectroscopia de fluorescência.

**Tabela 4 – Comparação das energias do docking, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio para cada composto avaliado.**

Compostos	Interações		Energias do <i>docking</i> (kcal mol <sup>-1</sup> )
	Hidrofóbicas	Ligações de H (Å)	
<b>7</b>	DA6, DC9, DG16, DA17, DT19	-	-7,5
<b>8</b>	DG4, DA6, DC9, DA17, DT19	-	-7,6
<b>9</b>	DA6, DT7, DC9, DG10, DC11, DG16 ( $\pi$ - $\pi$ ), DA18	DT8 com carbonila (1,98)	-7,8
<b>10</b>	DA6, DT7, DC9, DG10, DC11, DG16 ( $\pi$ - $\pi$ ), DT19	DT8 com carbonila (2,04)	-7,5
<b>16</b>	DT7, DT8, DC9, DT19	DA6 com carbonila (1,78)	-7,5
<b>21</b>	DA6, DC9 ( $\pi$ - $\pi$ ), DG16 ( $\pi$ - $\pi$ ), DA17 ( $\pi$ - $\pi$ ), DT19 ( $\pi$ - $\pi$ )	-	-7,4
<b>22</b>	DC9, DG16, DA17, DT19	-	-7,1
<b>25</b>	DA6, DT8, DG16, DA17, DT19	-	-7,8

Fonte: elaborado em colaboração com o Laboratório de Química Medicinal (UFAL), 2018.

#### 4.4 Conclusão

Todos os compostos foram consideravelmente mais tóxicos para as linhagens celulares de câncer estudadas do que para as células normais HaCaT e os valores de IS dos derivados da piperidina são, em geral, superiores aos apresentados pela doxorubicina (DOX), um composto de referência anticâncer utilizado neste trabalho. Pelos estudos de interação com o ctDNA, verificou-se que as moléculas avaliadas interagem com o modelo de DNA empregado, havendo formação de complexo supramolecular entre os ligantes e a macromolécula, onde os valores de  $K_b$  variaram de 0,10 a  $8,00 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ . Além disso, por meio da correlação das constantes de ligação com os valores de  $GI_{50}$ , pôde-se observar que os coeficientes de correlação variaram na faixa de  $0,8174 \leq |r| \leq 0,9868$ , para as linhagens HT29, NCI-H460, 786-0 e NCI/ADR-RES, sugerindo que o mecanismo de ação preponderante desses compostos pode estar associado ao DNA como alvo biológico. Os ensaios de KI, competição com brometo de etídio e estudos teóricos sugeriram que tais compostos interagem com o DNA preferencialmente via intercalação. Por fim, os estudos de *docking* e dinâmica molecular confirmaram os resultados espectroscópicos obtidos.

## 4.5 Artigo publicado

Journal of Advanced Research 9 (2018) 51–61



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Advanced Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jare](http://www.elsevier.com/locate/jare)

## Highly functionalized piperidines: Free radical scavenging, anticancer activity, DNA interaction and correlation with biological activity



Suvankar Das <sup>a</sup>, Cristiane J. da Silva <sup>b</sup>, Marina de M. Silva <sup>c</sup>, Maria Dayanne de A. Dantas <sup>c</sup>, Ângelo de Fátima <sup>d,\*</sup>, Ana Lúcia T. Góis Ruiz <sup>e</sup>, Cleiton M. da Silva <sup>d</sup>, João Ernesto de Carvalho <sup>e</sup>, Josué C.C. Santos <sup>c</sup>, Isis M. Figueiredo <sup>c</sup>, Edeildo F. da Silva-Júnior <sup>c,f</sup>, Thiago M. de Aquino <sup>c,f</sup>, João X. de Araújo-Júnior <sup>c,f</sup>, Goutam Brahmachari <sup>a,\*</sup>, Luzia Valentina Modolo <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Visva-Bharati (a Central University), Santiniketan 731 235, West Bengal, India

<sup>b</sup> Department of Botany, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

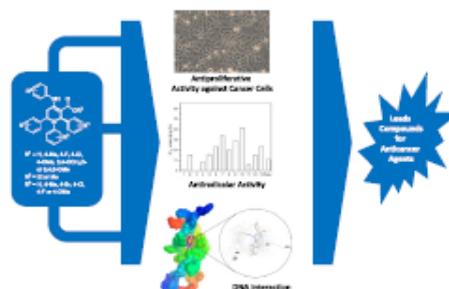
<sup>c</sup> Institute of Chemistry and Biotechnology, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

<sup>d</sup> Department of Chemistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>e</sup> Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center, Universidade Estadual de Campinas, Paulínia, SP, Brazil

<sup>f</sup> Laboratory of Medicinal Chemistry, Nursing and Pharmacy School, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 12 August 2017

Revised 29 October 2017

Accepted 30 October 2017

Available online 31 October 2017

## Keywords:

Piperidine derivatives

Free radical scavenging

## ABSTRACT

Twenty-five piperidines were studied as potential radical scavengers and antitumor agents. Quantitative interaction of compounds with ctDNA using spectroscopic techniques was also evaluated. Our results demonstrate that the evaluated piperidines possess different abilities to scavenge the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the anion radical superoxide ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). The piperidine **19** was the most potent radical DPPH scavenger, while the most effective to  $\cdot\text{O}_2^-$  scavenger was piperidine **10**. In general, U251, MCF7, NCI/ADR-RES, NCI-H460 and HT29 cells were least sensitive to the tested compounds and all compounds were considerably more toxic to the studied cancer cell lines than to the normal cell line HaCat. The binding mode of the compounds and ctDNA was preferably via intercalation.

Peer review under responsibility of Cairo University.

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [adefatima@qu.ufmg.br](mailto:adefatima@qu.ufmg.br) (Â. de Fátima), [goutam.brahmachari@visva-bharati.ac.in](mailto:goutam.brahmachari@visva-bharati.ac.in), [brahm2001@yahoo.co.in](mailto:brahm2001@yahoo.co.in) (G. Brahmachari).<https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.010>

2090-1232/© 2017 Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of Cairo University.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## REFERÊNCIAS

- AELURI, R. et al. Synthesis and antiproliferative activity of polysubstituted tetrahydropyridine and piperidin-4-one-3-carboxylate derivatives. **Asian Journal of Organic Chemistry**, India, v. 1, p. 71-79, Jul., 2012.
- 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, Nov., 2017.
- AJLOO, D. et al. Effect of two imidazolium derivatives of ionic liquids on the structure and activity of adenosine deaminase. **International Journal of Biological Macromolecules**, Irã, v. 55, p. 47-61, Abr., 2013.
- AJLOO, D. et al. Synthesis characterization, spectroscopy, cytotoxic activity and molecular dynamic study on the interaction of three palladium complexes of phenanthroline and glycine derivatives with calf thymus DNA. **Inorganica Chimica Acta**, Irã, v. 430, p. 144-160, Mai., 2015.
- BEHENNA, D. C. et al. Enantioselective construction of quaternary N-heterocycles by palladium-catalyzed decarboxylative allylic alkylation of lactams. **Nature Chemistry**, Estados Unidos, v. 4, p. 130-133, Dez., 2012.
- BRAHMACHARI, G.; DAS, S. Bismuth nitrate-catalyzed multicomponent reaction for efficient and one-pot synthesis of densely functionalized piperidine scaffolds at room temperature. **Tetrahedron Letters**, India, v. 53, p. 1479-1484, Mar., 2012.
- DANTAS, M. D. A. et al. Interactions of tetracyclines with ovalbumin, the main allergen protein from egg white: spectroscopic and electrophoretic studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, Brasil, v. 102, p. 505-514, Set., 2017.
- DARABI, F. et al. The piroxicam complex of cobalt(II): synthesis in two different ionic liquids, structure, DNA and BSA interaction and molecular modeling. **Inorganica Chimica Acta**, Irã, v. 409, p. 379-389, Jan., 2014.
- DEHKHODAEI, M. et al. Synthesis, characterization, crystal structure and DNA, HSA-binding studies of four Schiff base complexes derived from salicylaldehyde and isopropylamine. **Inorganica Chimica Acta**, Irã, v. 466, p. 48-60, Set., 2017.
- GANGAPURAM M.; REDDA, K. K. Synthesis of 1-(substituted phenylcarbonyl/sulfonylamino)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-5-carboxylic acid diethylamides as potential anti-inflammatory agents. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, Estados Unidos, v. 43, p. 709-718, Mai., 2006.
- HO, B.; CRIDER, A. M.; STABLES, J. P. Synthesis and structure–activity relationships of potential anticonvulsants based on 2-piperidinecarboxylic acid and related pharmacophores. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Estados Unidos, v. 36, p. 265-286, Mar., 2001.
- JALALI, F.; DORRAJI, P. S. Interaction of anthelmintic drug (thiabendazole) with DNA: Spectroscopic and molecular modeling studies. **Arabian Journal of Chemistry**, Irã, v. 10, p. S3947-S3954, Mai., 2014.

KOSJEK, T. et al. Determination of vinblastine in tumour tissue with liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. **Talanta**, Eslovênia, v. 116, p. 887-893, Nov., 2013.

KUMAR, B. et al. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. **Cancer Research**, Estados Unidos, v. 68, p. 1777-1785, Mar., 2008.

KUNDU, P.; CHATTOPADHYAY, N. Interaction of a bioactive pyrazole derivative with calf thymus DNA: deciphering the mode of binding by multi-spectroscopic and molecular docking investigations. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, India, v. 173, p. 485-492, Ago., 2017.

LI, J. F.; DONG, C. Study on the interaction of morphine chloride with deoxyribonucleic acid by fluorescence method. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 71, p. 1938-1943, Jan., 2009.

LI, J. et al. Luminescence and binding properties of two isoquinoline alkaloids chelerythrine and sanguinarine with ctDNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 95, p. 80-85, Set., 2012.

LI, X. L. et al. Molecular spectroscopy evidence of berberine binding to DNA: comparative binding and thermodynamic profile of intercalation. **Biomacromolecules**, China, v. 13, p. 873-880, Fev., 2012.

LILLEBY, W.; FOOSA, S. D. Chemotherapy in metastatic renal cell cancer. **World Journal of Urology**, Noruega, v. 23, p. 175-179, Fev., 2005.

MCKEEVER, C.; KAISER, M.; ROZAS, I. Aminoalkyl derivatives of guanidine diaromatic minor groove binders with antiprotozoal activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Irlanda, v. 56, p. 700-711, Jan., 2013.

MISRA, M. et al. Organocatalyzed highly atom economic one pot synthesis of tetrahydropyridines as antimalarials. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, India, v. 17, p. 625-633, Jan., 2009.

MOHAMMADGHOLI, A.; RABBANI-CHADEGANI, A.; FALLAH, S. Mechanism of the interaction of plant alkaloid vincristine with DNA and chromatin: spectroscopic study. **DNA Cell Biology**, Irã, v. 32, p. 228-235, Mai., 2013.

MOVAHEDI, E.; REZVANI, A. R. New silver(I) complex with diazafluorene based ligand: synthesis, characterization, investigation of in vitro DNA binding and antimicrobial studies. **Journal of Molecular Structure**, Irã, v. 1139, p. 407-417, Jul., 2017.

MUKHERJEE, A.; MONDAL, S.; SINGH, B. Spectroscopic, electrochemical and molecular docking study of the binding interaction of a small molecule 5H-naphtho[2,1-f][1,2]oxathieaphine 2,2-dioxide with calf thymus DNA. **International Journal of Biological Macromolecules**, India, v. 101, p. 527-535, Ago., 2017.

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, Out., 2017.

NELSON, E. C.; EVANS, C. P.; LARA JR, P. N. Renal cell carcinoma: current status and emerging therapies. **Cancer Treatment Reviews**, Estados Unidos, v. 33, p. 299-313, Mai., 2007.

OGBOLE, O. et al. Anthraquinones and triterpenoids from *Senna siamea* (Fabaceae) Lam inhibit poliovirus activity. **African Journal of Microbiology Research**, Paquistão, v. 8, p. 2955-2963, Jul., 2014.

PATIL, P. O.; BARI, S. B. Nitrogen heterocycles as potential monoamine oxidase inhibitors: synthetic aspects. **Arabian Journal of Chemistry**, India, v. 7, p. 857-884, Dez., 2014.

PETIT, S. et al. Synthesis and psychotropic activity of 3,4-diarylpiperidines. Structure-activity relationship and antihypertensive activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, França, v. 26, p. 19-32, Mai., 1991.

RAO, K. N. et al. Synthesis of some N-[pyridyl(phenyl)carbonylamino]hydroxyalkyl-(benzyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridines as potential anti-inflammatory agents. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, Estados Unidos, v. 32, p. 307-315, Out., 1995.

RAVINDERNATH, A.; REDDY, M. S. Synthesis and evaluation of anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of densely functionalized novel benzo [d] imidazolyl tetrahydropyridine carboxylates. **Arabian Journal of Chemistry**, India, v. 10, p. S1172-S1179, Fev., 2017.

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

RINI, B. I. et al. Phase II trial of weekly intravenous gemcitabine with continuous infusion fluorouracil in patients with metastatic renal cell cancer. **Journal of Clinical Oncology**, Estados Unidos, v. 18, p. 2419-2426, Jun., 2000.

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**, India, v. 73, p. 9-16, Fev., 2015.

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

SCHOTTE, A. et al. Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: *in vitro* and *in vivo* receptor binding. **Psychopharmacology**, Bélgica, v. 124, p. 57-73, Abr., 1996.

SHUJHA, S. et al. Diorganotin(IV) derivatives of ONO tridentate Schiff base: synthesis, crystal structure, in vitro antimicrobial, anti-leishmanial and DNA binding studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paquistão, v. 45, p. 2902-2911, Jan., 2010.

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

- SILVA, M. M. et al. Interaction between bioactive compound 11a-N-tosyl-5-deoxypterocarpan (LQB-223) and Calf thymus DNA: spectroscopic approach, electrophoresis and theoretical studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, Brasil, v. 96, p. 223-233, Mar., 2017.
- SILVA, M. M. et al. Interaction of  $\beta$ -Carbolines with DNA: spectroscopic studies, correlation with biological activity and molecular docking. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 27, p. 1558-1568, Set., 2016.
- SILVA, P. P. et al. Correlation between DNA interactions and cytotoxic activity of four new ternary compounds of copper(II) with N-donor heterocyclic ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Brasil, v. 132, p. 67-76, Mar., 2014.
- SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Paquistão, v. 124, p. 1-19, Jul., 2013.
- STADLER, W. M. et al. A phase II study of gemcitabine and capecitabine in metastatic renal cancer. **Cancer**, Estados Unidos, v. 107, p.1273-1279, Ago., 2006.
- STONE, S. C. et al. Evaluation of potential use of *Cymbopogon* sp. essential oils, (R)-citronellal and N-citronellylamine in cancer chemotherapy. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, Brasil, v. 6, p. 11-15, 2013.
- SUFIAN A. S. et al. Isolation and identification of antibacterial and cytotoxic compounds from the leaves of *Muntingia calabura* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Malásia, v. 146, p. 198-204, Mar., 2013.
- TYAGI, G.; CHARAK, S.; MEHROTRA, R. Binding of an indole alkaloid, vinblastine to double stranded DNA: a spectroscopic insight in to nature and strength of interaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, India, v. 108, p. 48-52, Mar., 2012.
- USMAN, A.; AHMAD, M. Binding of Bisphenol-F, a bisphenol analogue, to calf thymus DNA by multi-spectroscopic and molecular docking studies. **Chemosphere**, India, v. 18, p. 536-543, Ago., 2017.
- WILKINSON, D. G. The pharmacology of donepezil: a new treatment for Alzheimer's disease. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, Reino Unido, v. 1, p. 121-135, Fev., 1999.
- WU, M. et al. Synthesis of a novel fluorescent probe based on acridine skeleton used for sensitive determination of DNA. **Talanta**, China, v. 75, p. 995-1001, Mai., 2008.
- ZHANG, S. et al. Molecular spectroscopic studies on the interaction of ferulic acid with calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 112, p. 78-83, Ago., 2013.
- ZHOU, Y. et al. Synthesis and SAR of 3,5-diamino-piperidine derivatives: novel antibacterial translation inhibitors as aminoglycoside mimetics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Estados Unidos, v. 17, p. 1206-1210, Mar., 2007.

---

# Seção 5

## Timerosal e hemoglobina

---

## 5 ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DO TIMEROSAL COM HEMOGLOBINA HUMANA

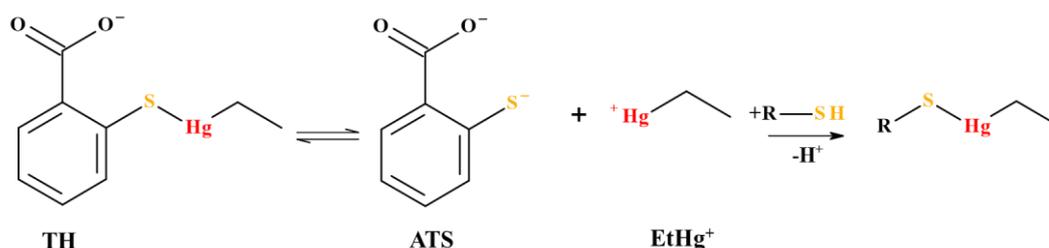
### 5.1 Introdução

O timerosal (TH), é um composto orgânico introduzido no mercado desde 1931, apresentando cerca de 49,6% de Hg em massa. Atualmente o TH é empregado como conservantes em cosméticos, produtos de higiene (demaquilantes), *sprays* antissépticos e, em virtude de sua ampla gama de atividades biológicas, tais como bactericida e fungicida, tem sido amplamente utilizado como conservante em vacinas (Dórea, 2018).

Apesar da OMS (Organização Mundial da Saúde) indicar que o etilmercúrio (TH) usado como preservativo em vacinas não apresenta risco a saúde, vários trabalhos têm questionado sua toxicidade. Neste sentido, estudos em cobaias (ratos) evidenciaram que a administração de TH levou a efeitos neurotóxicos devido a modificações dos receptores GABA<sub>A</sub> e NMDA (WYREMBEK et al., 2010), enquanto que Ida-Eto e colaboradores (2013) demonstraram que a exposição embrionária de ratos ao timerosal levou ao comprometimento do sistema monoaminérgico do cérebro, com efeitos comportamentais subsequentes. Além disso, Migdal e colaboradores (2010) provaram que o TH promove estresse oxidativo, e assim, apresentou citotoxicidade em linhagem celular promielomonocítica humana a partir da despolarização da membrana mitocondrial associado ao efeito da ligação do mercúrio aos grupos tióis. Similarmente, Chen e colaboradores (2019) demonstraram que o TH produziu uma redução significativa na imunogenicidade em algumas vacinas devido ao bloqueio de grupos tióis. A Tabela 1 apresenta uma compilação de trabalhos que avaliaram o efeito tóxico do TH frente a variados alvos, além da influência de parâmetros como tempo de exposição e dose.

O potencial tóxico do TH pode estar relacionado aos seus produtos de degradação (Fig. 1) em meio biológico, em ácido tiosalicílico (ATS) e etilmercúrio (EtHg<sup>+</sup>), o qual possui toxicidade *in vitro* comparada ao metilmercúrio, uma neurotoxina capaz de atravessar a membrana celular (DOREA et al., 2011).

**Figura 1 – Estrutura química do timerosal (TH) e seus respectivos produtos de degradação, ácido tiosalicílico (ATS) e etilmercúrio (EtHg<sup>+</sup>).**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

**Tabela 1 – Efeitos tóxicos do TH frente a vários alvos / modelos e influência do tempo e dose de exposição.**

Alvo ou modelo biológico	Tempo de incubação	Dose ou faixa de concentração	Efeitos observados	Referências
Glândulas do timo de ratos	1 h	0,3 - 30 $\mu\text{M}$	Redução do conteúdo de glutathiona, para concentrações de TH de 1.0 a 10 $\mu\text{M}$ . A depleção completa ocorreu a 30 $\mu\text{M}$ . Indução a apoptose para níveis de concentração 1 – 3 $\mu\text{M}$ .	Ueha-Ishibashi et al., 2004.
Linhagem celular de neuroblastoma humano (células SH-SY5Y)	24 e 48 h	1,0 nM - 10 $\mu\text{M}$	Fragmentação do DNA e o processo de indução a morte foi dose-dependente, desde $\text{EC}_{50} = 39 \text{ nM}$ (24 h) e, $\text{EC}_{50} = 4.4 \text{ nM}$ (48 h).	Parran et al., 2005.
Células de neuroblastoma (CRL-2268)	1 e 3 h	5,0 $\mu\text{M}$	A 5 $\mu\text{M}$ de TH, o citocromo <i>c</i> foi liberado das mitocôndrias para o citosol em 30% das células em 1 h e, 85% em 3 h. O fator indutor de apoptose foi liberado em 40 e 90% das células em 0,5 e 1 h, respectivamente.	Brown e Yel, 2003.
Células de mioblastos C2C12 de camundongos.	24 - 72 h	125 - 500 nM	O timerosal induziu a interrupção da fase S e causou apoptose via inibição da sinalização PI3K seguida pela ativação da via apoptótica mitocondrial.	Li et al., 2012.
Neurônios corticais humanos (CRL-10442) e fibroblastos	6 h	1,0 - 250 $\mu\text{M}$	Danos na membrana, quebras de DNA e apoptose, conforme indicado pela morfologia e ativação da caspase-3 (250 $\mu\text{M}$ )	Baskin et al., 2003.
Células de neuroblastoma (SH-SY5Y CRL 2266) e glioblastoma (CRL 2020)	48 h	15 $\mu\text{M}$	Diminuição de 50% nos níveis de glutathiona intracelular nas células de glioblastoma, e de mais de oito vezes nas células de neuroblastoma.	James et al., 2005.
Neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos	-	100 - 1000 $\mu\text{M}$	O timerosal bloqueou (dose-dependente) os canais de sódio TTX-R (sensíveis à tetrodotoxina) e TTX-S (resistentes à tetrodotoxina).	Song et al., 2000.
Linhagem celular de neuroblastoma humano (SK-N-SH)	48 h	0,1 – 5,0 $\mu\text{M}$	Efeitos deletérios na citoarquitetura, levando à apoptose mediada pelas mitocôndrias e à onco/necrose (5 $\mu\text{M}$ ).	Humphrey et al., 2005.
Neurônios do gânglio de ratos	-	0,3 - 300 $\mu\text{M}$	Função celular alterada pela diminuição da atividade do receptor TRPV1 (receptor de capsaicina) via oxidação de resíduos tióis extracelulares.	Jin et al., 2004.
Neurônios humanos diferenciados (LUHMES)	24 h	0 – 2,0 $\mu\text{M}$	Redução da atividade desidrogenas e integridade lisossomal, liberação de LDH relacionado a integridade da membrana plasmática e ativação da caspase-3.	Lohren et al., 2015.
Partículas do papilomavírus humano (HPV)	2 - 6 semanas	0 – 0,05% (m/v)	Atividade de ligação reduzida foi observada entre antígenos do HPV e anticorpos monoclonais (mAbs) após o tratamento com TH, acompanhada por redução da estabilidade conformacional da proteína.	Chen et al., 2019.
Células de MRGPRX2-HEK293 e LAD2 (tecido conjuntivo)	0 – 120 s	1,25 - 5 $\text{mg mL}^{-1}$	O timerosal pode ativar os mastócitos humanos LAD2 via MRGPRX2, levando à degranulação dos mastócitos, o que pode indicar que o timerosal pode causar reações pseudo-alérgicas em humanos via MRGPRX2.	Peng et al., 2019.
Células de neuroblastoma humano e neurônios	24 h	0,01 $\mu\text{M}$	Induziu uma diminuição significativa na viabilidade celular no grupo SOD1-G93 A, mas não nas células SOD1 e EV.	Laudati et al., 2019.

corticais embrionários de rato

Sangue e cabelos de neonatos	Antes e após 5 dias da dose da vacina de nascimento	-	O sangue do cordão aumentou de 2,86 a 3,06 $\mu\text{g kg}^{-1}$ .	Dórea, 2018.
Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	24 h	0,5 - 5 $\mu\text{M}$ de MeHg e EtHg	MeHg e EtHg (TH) causaram inibição do crescimento de leveduras dependente do tempo e da concentração. Exceto a menor concentração (0,5 $\mu\text{M}$ ), ambas as espécies inibiram significativamente o crescimento das células.	Ramos et al., 2019.
108 ratos Wistar machos	7, 9, 11, 15 dias pós-natais	TH em diferentes doses 30, 300 ou 3000 $\mu\text{g Hg kg}^{-1}$ em quatro injeções. Dose única de TH (3 mg $\text{Hg kg}^{-1}$ ) com ácido lipóico em doses diferentes	Atividade locomotora significativamente impactada. O ácido lipóico (5, 10 e 20 mg $\text{kg}^{-1}$ ) não alterou os comportamentos na ausência de TH, mas, com doses de 20 mg $\text{kg}^{-1}$ , reduziu os déficits de interação social induzidos pelo maior tratamento com TH (3 mg $\text{Hg kg}^{-1}$ )	Namvarpour et al., 2018.
Camundongos ICR de 8 a 14 semanas de idade	70 min	1- 30 $\mu\text{M}$ de MeHg e EtHg (TH)	Tanto o MeHg quanto o EtHg começaram a inibir a motilidade ciliar entre 1 e 3 $\mu\text{M}$ , o limite relatado de MeHg em humanos. Um aumento abrupto foi observado nas curvas inibitórias de 3 a 6 $\mu\text{M}$ para MeHg e EtHg. O $\text{IC}_{50}$ para MeHg e EtHg foi de 5,53 $\mu\text{M}$ e 5,80 $\mu\text{M}$ , respectivamente.	Yoshida et al., 2016.
Vacinas	7 dias	25 mg $\text{L}^{-1}$ Hg	Pode-se observar a formação de adutos de $\text{EtHg}^+$ (TH) e um composto de elevada massa molecular. A fração contendo mercúrio era mais abundante que 133 kDa, indicando ligação à hemaglutinina, que é o componente ativo da vacina contra influenza.	Strohmidel et al., 2018.
TrxR de rato recombinante (tioredoxina redutase) e Trx humano (tioredoxina)	3-24 h	25, 50, 100, 200 and 400 nM	TH e EtHg inibiram as enzimas do sistema tioredoxina em suspensões purificadas, sendo EtHg comparável ao MeHg. As atividades de Trx e TrxR nas células de neuroblastoma após a incubação com EtHg foram reduzidas em 60 e 80%, respectivamente, enquanto nas células de hepatoma a redução foi de quase 100%.	Rodrigues et al., 2015.
Células C6 de glioma de ratos (CCL-107)	24 h	0,1 – 0,32 $\mu\text{M}$	MeHg e EtHg (TH) causaram reduções significativas na viabilidade celular (valores de $\text{EC}_{50}$ de 4,83 e 5,05 $\mu\text{M}$ , respectivamente). Também foi observada citotoxicidade significativa quando as células foram tratadas nas mesmas condições com MeHg-S-Cis e EtHg-S-Cis, mas os respectivos valores de $\text{EC}_{50}$ foram aumentados significativamente (11,2 e 9,37 $\mu\text{M}$ ).	Zimmermann et al., 2013.
Proteoma de células cerebrais de rato	60 dias (MeHg) e 4 h (EtHg)	140 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (MeHg) e 800 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (EtHg) foi administrado por via intramuscular (dose única)	A exposição a MeHg e EtHg (timerosal) induziu a superexpressão de calbindina.	Souza et al., 2016.

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

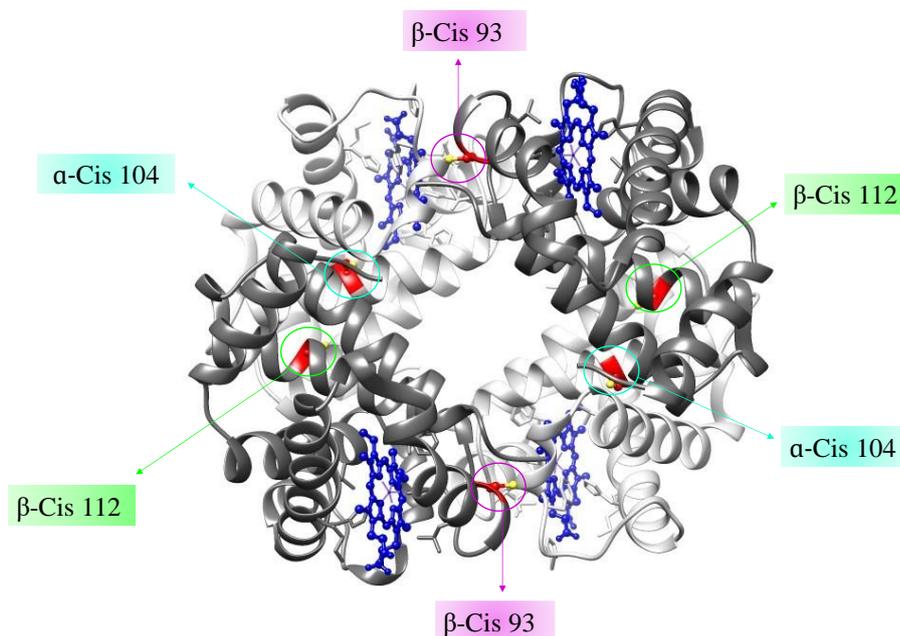
Os efeitos deletérios *in vivo* destas espécies de mercúrio são resultantes de sua elevada afinidade a grupos tióis presentes em diversas biomoléculas, como peptídeos e proteínas (RALSTON; RAYMOND, 2018), provocando alterações estruturais ou bloqueando algum tipo de atividade biológica (TRUMPLER et al., 2014).

Dessa forma, pode-se inferir que a interação de espécies de mercúrio com grupos tióis presentes em biomoléculas, representa um papel importante no transporte de mercúrio bem como nos mecanismos de toxicidade. Trümpler e colaboradores (2009) avaliaram a interação do TH com grupos tióis livres das proteínas  $\beta$ -lactoalbumina A do leite bovino e albumina do soro bovino (BSA) empregando LC/ICP-MS, comprovando a degradação do TH em  $\text{EtHg}^+$  e ATS, com consequente formação de adutos de  $\text{EtHg}$ -proteína. Shen e colaboradores (2013) reportaram a avaliação da interação do  $\text{Hg(II)}$  com a BSA utilizando técnicas espectroscópicas moleculares, sendo verificado alterações na estrutura secundária da proteína. De maneira análoga, Chunmei e colaboradores (2014) mostraram que a presença de  $\text{Hg(II)}$  resultou em alterações conformacionais na BSA, as quais podem ser responsáveis pela toxicidade do mercúrio inorgânico *in vivo*.

Contudo, ainda há limitação de informações quanto a mudanças conformacionais em proteínas induzidas por espécies de mercúrio, levando a perda e/ou diminuição de suas funcionalidades. Dessa forma, se faz necessário a realização de estudos que avaliem de forma qualitativa e quantitativa o processo de interação de espécies de mercúrio potencialmente tóxicas em condições fisiológicas, buscando avaliar como tais compostos interferem na função das macromoléculas. Nesse sentido, Santos e colaboradores (2018) avaliaram a interação do TH com a BSA empregando técnicas espectroscópicas, onde foi verificado que este composto apresenta constante de ligação na ordem de  $10^3 \text{ L mol}^{-1}$  com a proteína, e o mecanismo de interação proposto indica que houve formação do aduto  $\text{BSA-EtHg}^+$  aumentando a velocidade de fibrilação da proteína.

Apesar da importância de estudos empregando proteínas transportadoras, tais como HSA e BSA, Trumpler e colaboradores (2014) mostraram que a maior fração do etilmercúrio no sangue estava presente nos eritrócitos. Uma vez que a hemoglobina (Hb) é a proteína mais abundante dos eritrócitos e possui grupos tióis livres, esta macromolécula é alvo de estudos envolvendo espécies mercuriais. A hemoglobina humana possui como principal função o transporte de oxigênio para os tecidos (NELSON; COX, 2014), devido a presença de quatro grupos prostéticos heme, além disto, possui seis resíduos de cisteína livre (Fig. 2), os quais são passíveis de reagir com espécies de mercúrio (MAKARSKA-BIALOKOZ, 2017).

**Figura 2 - Estrutura da hemoglobina humana (Hb), em que a cadeia  $\alpha$  corresponde a cor cinza claro e a cadeia  $\beta$  refere-se ao cinza mais escuro.**



Fonte: elaborado por Camila Nunes com base no PDB (1A3N), 2020.

A interação de espécies de mercúrio com a Hb foi estudada por Rabenstein e colaboradores (1982 e 1986) por RMN  $^1\text{H}$ , sugerindo a formação da ligação Cis-Hg na Hb. Esta hipótese é confirmada pelos estudos de Janzen e colaboradores (2011), mostrando a formação do aduto entre timerosal ( $\text{EtHg}^+$ ) com a Hb humana e animal (ratos) empregando LC/ESI-TOF-MS. Além disto, Zayas e colaboradores (2014) identificaram o resíduo de cisteína (Cis93) na cadeia  $\beta$  da Hb de golfinho como o principal sitio de ligação do  $\text{MeHg}^+$ . Por fim, Gibson e colaboradores (2017) reportaram que espécies como  $\text{Hg(II)}$  e  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  são majoritariamente absorvidos pelos glóbulos vermelhos e ligam-se à glutatona citosólica (GSH) e/ou Hb humana.

Assim, considerando que o  $\text{EtHg}^+$  do TH pode ligar-se aos resíduos de Cis da hemoglobina humana (adulto) e alterar suas funções conduzindo a efeitos nocivos à saúde humana, este trabalho avaliou a interação desta proteína com o timerosal empregando estudos biofísicos e biológicos *in vitro*, para determinar os principais parâmetros acerca do processo de interação Hb-TH. Por fim, foi proposto o mecanismo de interação e sugerido que uma das possíveis causas da toxicidade do TH pode estar associada à sua capacidade de reduzir a capacidade de ligação da Hb ao oxigênio, induzir os processos de fibrilação e glicação de proteínas, os quais estão relacionados a diversas patologias.

## 5.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

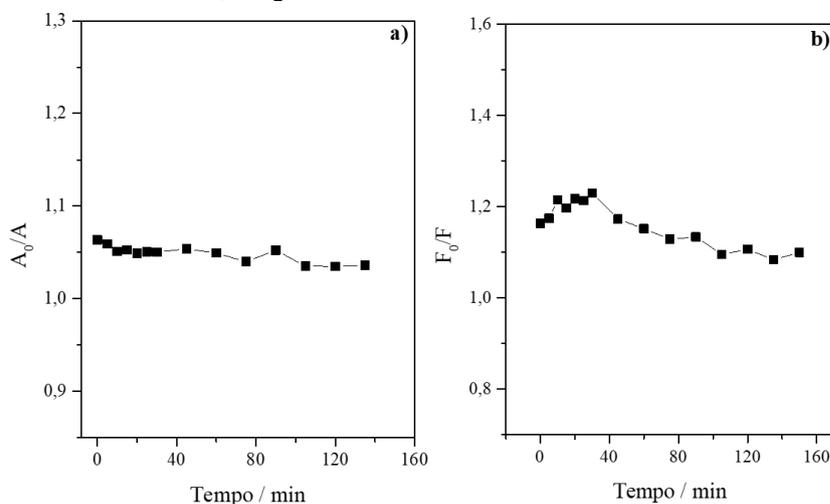
- i) Empregar a técnica de fluorescência molecular para avaliar mudanças conformacionais na estrutura da proteína e calcular parâmetros de ligação e termodinâmicos;
- ii) Caracterizar o processo de interação empregando UV-vis, eletroforese e DLS;
- iii) Avaliar a influência de espécies competidoras na interação Hb-TH;
- iv) Sugerir o mecanismo de ligação preferencial entre a hemoglobina e o timerosal;
- v) Avaliar os processos de fibrilação e glicação da proteína;
- vi) Avaliar a capacidade de ligação a oxigênio da hemoglobina na presença e ausência do timerosal.

## 5.3 Resultados e Discussão

### 5.3.1 Estudo cinético

Inicialmente, buscou-se avaliar a condição mais favorável para a realização das medidas espectrofotométricas e espectrofluorimétricas, uma vez que este estudo é de fundamental importância para que se tenha um conhecimento prévio da evolução da formação do complexo ao longo do tempo (DANTAS et al., 2017). Assim, investigou-se o efeito do tempo de incubação entre a hemoglobina e o timerosal empregando a intensidade dos sinais (absorvância e fluorescência) como parâmetro analítico. Nesse sentido, foi definido o tempo mínimo no qual o sistema atinge estabilidade, considerando como parâmetro a estabilização da relação  $A/A_0$  e  $F/F_0$  (sinais de absorvância e fluorescência na presença e ausência do ligante, respectivamente). A Figura 3 mostra os resultados desta avaliação.

**Figura 3 - Avaliação da cinética de interação entre a hemoglobina (2  $\mu$ M) e o timerosal (100 e 50  $\mu$ M, para UV-vis e fluorescência, respectivamente) durante 150 min.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Os resultados mostram que a formação do complexo entre a hemoglobina e o timerosal ocorrem praticamente de forma imediata, e são mantidos constantes durante o intervalo de tempo avaliado. Logo, a cinética da interação é rápida e mostrou estabilidade até 150 min, não necessitando de incubação prévia para efetuar as medidas analíticas.

### 5.3.2 Avaliação da interação empregando espectroscopia de fluorescência molecular

#### 5.3.2.1 Parâmetros de ligação

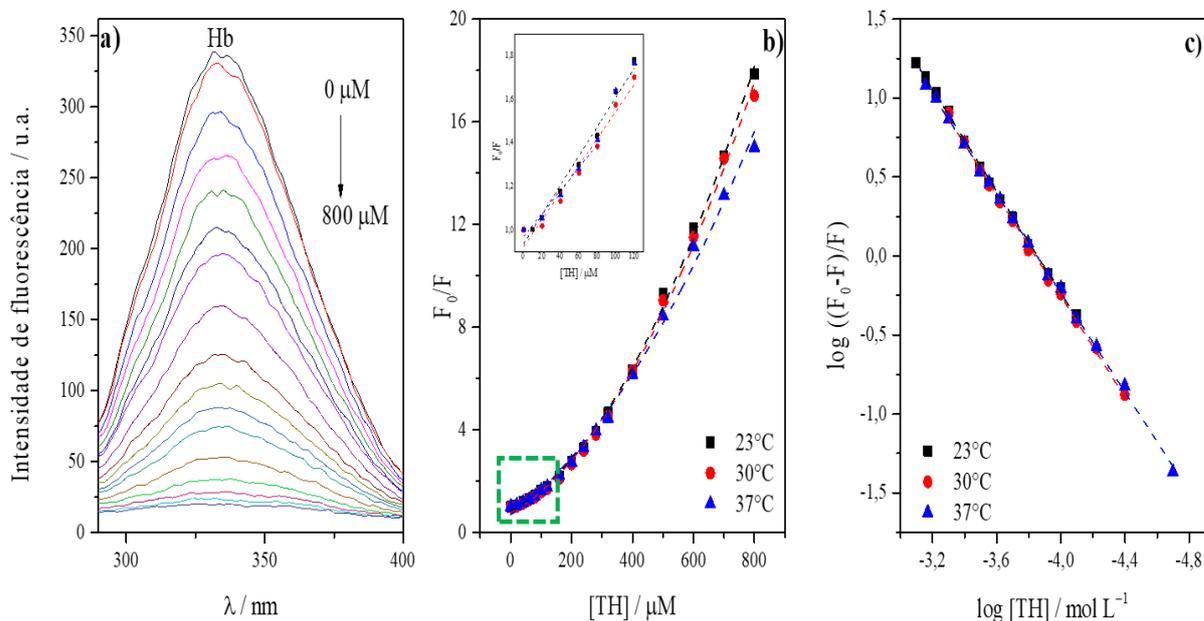
A espectroscopia de fluorescência molecular é uma das técnicas mais comumente empregadas nos estudos de interação entre ligantes e macromoléculas (DNA e proteínas), devido a sua elevada sensibilidade, grande faixa de concentração linear e seletividade (SIRAJUDDIN et al., 2013; KAZEMI et al., 2017). Os aminoácidos que são responsáveis pela fluorescência intrínseca das proteínas são o triptofano, a fenilalanina e a tirosina, sendo a contribuição do triptofano a mais pronunciada (Trp  $\beta$ 37 para hemoglobina) (AJMAL et al., 2017). Assim, em decorrência dessa característica espectroscópica (capacidade de fluorescer), a hemoglobina foi titulada com o timerosal (em diferentes temperaturas 23, 30 e 37°C). Ao adicionar quantidades crescentes do ligante ao sistema ocorreu diminuição gradual do sinal analítico (Fig. 4a), indicando formação de um complexo supramolecular não fluorescente, sendo que o timerosal atua como molécula *quencher*, isto é, a espécie capaz de suprimir o sinal analítico do fluoróforo.

A diminuição da intensidade de fluorescência intrínseca da hemoglobina na presença de diferentes concentrações de TH pode resultar numa relação linear. Esse processo pode então, ser analisado pela equação de Stern-Volmer (Equação 1) a qual indica a acessibilidade do fluoróforo em relação ao supressor de fluorescência (LAKOWICZ, 2006).

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

onde,  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do TH, respectivamente;  $K_q$  é a constante de velocidade de *quenching* bimolecular difusional ( $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $\tau_0$  é o tempo de vida médio ( $10^{-8} \text{ s}$ ),  $[Q]$  é a concentração do ligante que atua como *quencher* (TH) e  $K_{sv}$  é a constante de *quenching*, a qual é obtida por meio do coeficiente angular da linearização  $F_0/F$  vs.  $[Q]$  (Fig. 4b). Os valores obtidos de  $K_{sv}$  e  $K_q$  estão apresentados na Tabela 1.

**Figura 4 - Resultados obtidos por fluorescência molecular. a) Perfil espectral da Hb (4,0  $\mu\text{M}$ ) com adição de incrementos crescentes de TH (0-800  $\mu\text{M}$ ); b) Curva linear para cálculo da constante de Stern–Volmer; c) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação e número de sítios. Condição: pH = 7,4 (Fosfato 10 mM e 100 mM NaCl) a 30 °C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Além das constantes de Stern-Volmer e de *quenching* bimolecular, para avaliar a magnitude da interação macromolécula-ligante e estequiometria do complexo formado, calculou-se a constante de ligação ( $K_b$ ) e o número de sítios de ligação ( $n$ ), respectivamente, por meio da Equação 2 (Fig. 4c):

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

Os valores de  $K_b$  e  $n$  são obtidos pela regressão linear a partir do gráfico  $\log[(F_0 - F)/F]$  vs.  $\log[TH]$ . Os valores calculados para esses parâmetros estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2 – Parâmetros de ligação para o processo de interação entre Hb e TH em diferentes temperaturas.**

Temp (°C)	Constante de Stern-Volmer			Parâmetros de ligação		
	$K_{SV}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	$r$	$K_q$ ( $10^{11} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$K_b$ ( $10^6 \text{ L mol}^{-1}$ )	$n$	$r$
22	$6,71 \pm 0,36$	0,9914	6,71	$1,58 \pm 0,06$	$1,61 \pm 0,02$	0,9993
30	$6,19 \pm 0,48$	0,9855	6,19	$1,41 \pm 0,08$	$1,60 \pm 0,02$	0,9992
37	$5,27 \pm 0,45$	0,9833	5,27	$1,09 \pm 0,04$	$1,57 \pm 0,01$	0,9996

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

De acordo com a Tabela 2, observou-se que os valores de  $K_{SV}$  foram na ordem de  $10^3 \text{ L mol}^{-1}$ , indicando o quanto houve de decréscimo do sinal analítico na presença do agente supressor. Por meio da variação dos valores de  $K_{SV}$  em função da temperatura, foi possível caracterizar o mecanismo de *quenching* preferencial envolvido no processo de interação Hb-TH. Segundo Cao e colaboradores (2018), existem diversos mecanismos de *quenching*, sendo os principais classificados como estático e/ou dinâmico. No *quenching* dinâmico, com o aumento da temperatura ocorre maior difusão das moléculas e, por consequência um maior número de colisões, levando ao aumento dos valores de  $K_{SV}$ . Em contrapartida, o *quenching* estático é caracterizado pela formação de complexo supramolecular não fluorescente no estado fundamental, e dessa forma com o aumento da temperatura ocorre redução dos valores de  $K_{SV}$  uma vez que, em temperaturas mais elevadas há uma diminuição da estabilidade do complexo formado (BAGHERI; FATEMI, 2018). Como observado na Tabela 2, os valores das constantes de Stern-Volmer diminuíram com o aumento da temperatura, dessa forma, o mecanismo de *quenching* preferencial entre o timerosal e a hemoglobina ocorre via *quenching* estático. Esse mecanismo pode ser confirmado a partir dos valores das constantes de *quenching* bimolecular ( $K_q$ ), os quais foram maiores (na ordem de  $10^{11} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) que a constante difusional limitante ( $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), corroborando com os resultados de He e colaboradores (2014), no estudo da Hb frente a diferentes alcaloides.

Verificou-se também na Tabela 2 que os valores de  $K_b$  foram na ordem de  $10^6 \text{ L mol}^{-1}$ , indicando elevada afinidade do ligante com a macromolécula. Os valores obtidos são superiores a dados reportados na literatura, como o trabalho de Santos e colaboradores (2018); e Chunmei e colaboradores (2014) que avaliaram a interação do timerosal e do mercúrio inorgânico, respectivamente, com a albumina do soro bovino e encontraram valores de  $K_b$  na ordem de  $10^3 \text{ L mol}^{-1}$ . Esses dados sugerem que o timerosal possui maior afinidade com a hemoglobina quando comparado a BSA, fato que pode explicar sua maior absorção pelos glóbulos vermelhos (GIBSON et al., 2017).

Além disso, observou-se que os valores de  $n$  foram aproximadamente 2, indicando relação estequiométrica 2:1 (timerosal: hemoglobina), estes dados são concordantes com o trabalho de Maurya e colaboradores (2018), o qual avaliou a interação da Prometazina com a hemoglobina humana.

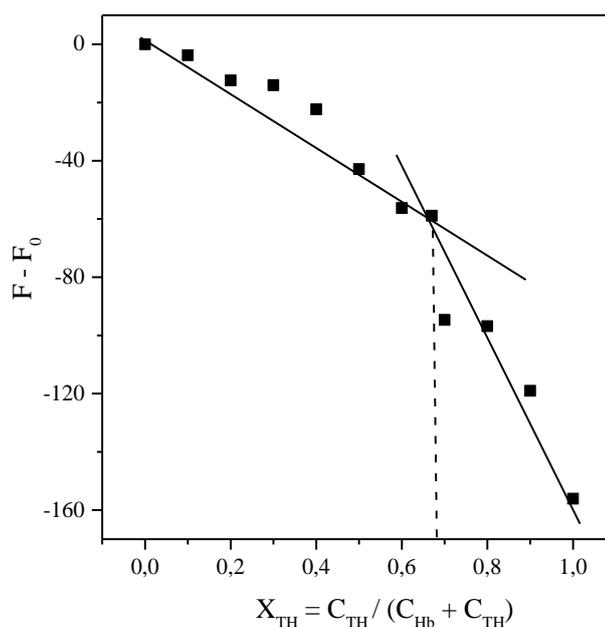
A Hb humana possui seis resíduos de cisteína livre (não oxidado), sendo que em cada subunidade (dímero  $\alpha\beta$ ) apresenta um resíduo de Cis93, o qual é cerca de cinco vezes mais acessível que o Cis112, enquanto Cis104 é considerado bloqueado (GHOSH et al., 2016). Uma vez que existe elevada afinidade das espécies mercuriais (ácidos moles) por resíduos de cisteína

livres (bases moles), ocorrendo a formação da ligação Hg-S, tem-se como hipótese que cada molécula de hemoglobina se ligue a dois TH, por meio dos resíduos de Cys93. Desta forma, a estequiometria de 2:1 (TH:Hb) seria justificável.

#### 5.3.2.1.1 Método de Job

O método das variações contínuas, conhecido como método de Job, é uma medida numérica amplamente utilizada para a determinação da estequiometria de complexos supramoleculares (ULATOWSKI et al., 2016; SHIRI et al., 2018). Dessa forma, para confirmar a estequiometria do complexo Hb-TH o método de Job foi empregado, onde variou-se a fração molar das duas espécies de 0 a 1. Os dados obtidos para esta avaliação são apresentados na Figura 5, onde se avaliou a variação de fluorescência ( $F - F_0$ ) em função da fração molar do TH ( $X_{TH}$ ).

**Figura 5 – Perfil obtido pelo método das variações contínuas para o sistema Hb-TH. Condição: pH = 7,4 (Fosfato 10 mM e 100 mM NaCl) a 30 °C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Com base no perfil obtido a fração molar equivalente ao TH foi igual a 0,68 enquanto que para a Hb foi de 0,32; assim, a relação molar obtida é aproximadamente de 2:1 TH-Hb, confirmando os resultados obtidos pela titulação espectrofluorimétrica.

#### 5.3.2.1.2 Avaliação da cooperatividade do sistema Hb-TH

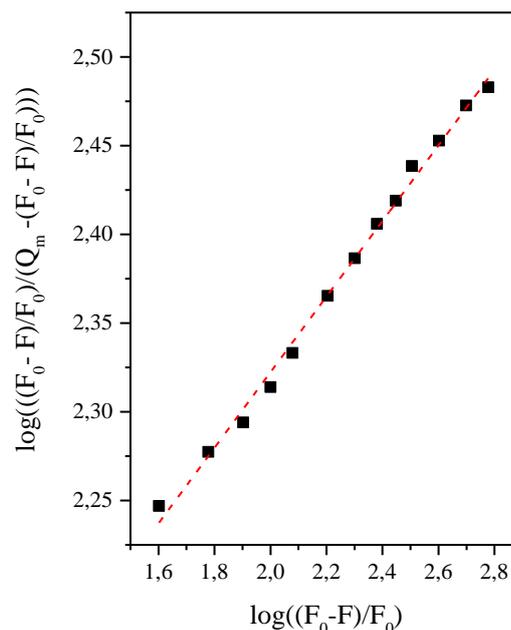
Segundo Nelson e Cox (2014), a hemoglobina possui duas conformações principais denominados estados R e T, definidos como *relaxado* e *tenso*, respectivamente. A ligação do oxigênio na hemoglobina ocorre em ambos os estados, no entanto, apresenta maior afinidade

com o estado R devido a uma maior estabilidade após a ligação. Quando o oxigênio não está presente, o estado T é o mais estável, sendo a conformação predominante da hemoglobina desoxigenada (desoxiemoglobina). Porém, quando este se liga ao estado T provoca uma transição para o estado R, conduzindo a mudanças conformacionais nas subunidades  $\alpha\beta$  da proteína. Essa ligação do oxigênio à hemoglobina é alostérica e cooperativa, ou seja, quando o  $O_2$  se liga a um determinado sítio, a interação afeta as propriedades de ligação dos outros sítios da proteína (LIU et al., 2011), por meio de interações subunidade-subunidade. Este processo cooperativo é descrito matematicamente pela equação de Hill (BOJKO et al., 2010):

$$\log \left( \frac{\frac{F_0 - F}{F_0}}{Q_m - \frac{F_0 - F}{F_0}} \right) = \log K + n_H \log[L] \quad \text{Equação (3)}$$

onde  $Q_m$  é obtido a partir do coeficiente linear do gráfico  $(F_0 - F/F_0)$  vs.  $1/[L]$  e  $K$  é a constante de ligação. Para avaliar se há ou não cooperatividade, emprega-se como critério a análise do valor de  $n_H$  (Fig. 6). Quando este é igual a 1, a interação com o ligante não é cooperativa, podendo ocorrer em uma proteína multimérica caso não haja comunicação entre as suas subunidades; quando  $n_H > 1$  indica cooperatividade positiva, ou seja, a interação de um ligante facilita a interação de outras pequenas moléculas; por fim, quando  $n_H < 1$  indica cooperatividade negativa, isto é, a interação com uma molécula de ligante dificulta a interação de outras (FARD et al., 2012).

**Figura 6 – Curva para cálculo do coeficiente de Hill ( $n_H$ ) do sistema Hb-TH.**

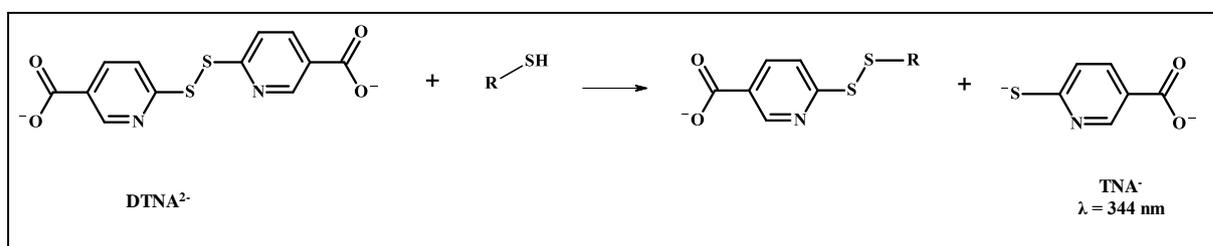


Dessa forma, avaliou-se a cooperatividade do sistema Hb-TH, com base no coeficiente de Hill obtido  $n_H = 0,213 \pm 0,005$ , indicando que a interação macromolécula-ligante possui cooperatividade negativa. De acordo com James e Ferrell Jr (2009) esse comportamento é importante e bastante comum na maioria dos receptores acoplados à proteína G, além disto, já foi reportado comportamento similar nos estudos de interação da albumina do soro humano com complexo com Co(III), sendo  $n_H = 0,632$  (FARD et al., 2012).

### 5.3.2.1.3 Avaliação do mecanismo de ligação Hb-TH: ensaio de Ellman (determinação de grupos tióis livres)

Buscando elucidar o mecanismo de interação entre a Hb humana e o TH algumas estratégias foram empregadas. Inicialmente, aplicou-se o ensaio espectrofotométrico de Ellman, o qual baseia-se na reação entre o ácido 5,5-bisditionitrobenzoico ( $\text{DTNB}^{2-}$ ) e o grupo tiol livre ( $\text{R-SH}$ ) levando a formação do ácido tionitrobenzoico ( $\text{TNB}^-$ ,  $\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$ ). No entanto, para este ensaio verificou-se interferências espectrais devido a absorção da banda de Soret da hemoglobina ( $\lambda_{\text{max}} = 406 \text{ nm}$ ). Assim, de forma alternativa se empregou o ácido 6,6-ditionicotínico ( $\text{DTNA}^{2-}$ ,  $\lambda_{\text{max}} = 344 \text{ nm}$ ), conforme Figura 7 (Wille et al., 2011).

**Figura 7 – Reação de Ellman modificada.**



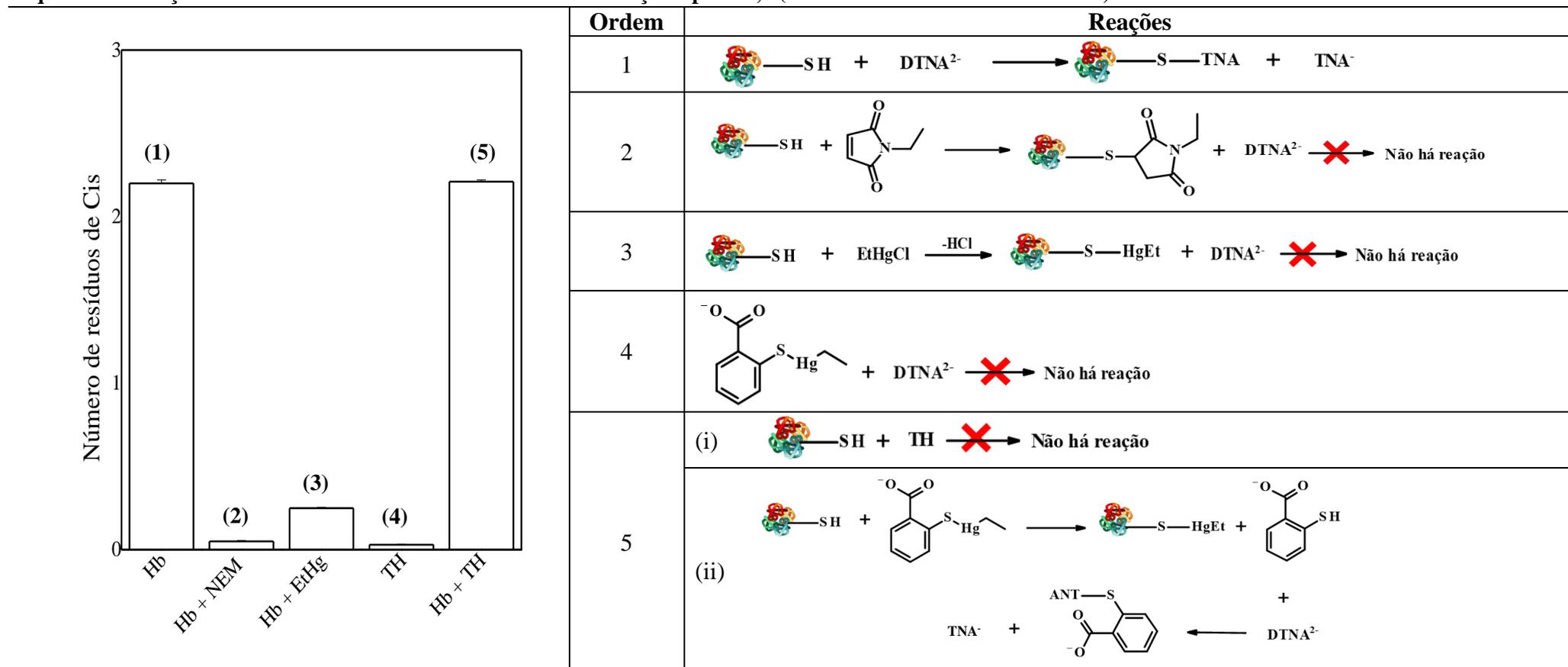
Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Aplicando este procedimento quantificou-se dois resíduos de cisteína livres, os quais, estão relacionados a Cis93 de cada cadeia  $\beta$ -globulin, estes são cerca de cinco vezes mais acessíveis que os resíduos Cis112, enquanto os resíduos Cis104 (cadeia  $\alpha$ -globulina) são bloqueados, dessa forma, foi possível quantificar dois resíduos de cisteína, de seis possíveis na Hb humana. A fim de investigar se o TH, era passível de bloquear os resíduos de cisteína, inicialmente se empregou o NEM (bloqueador tradicional de grupos tióis) e o  $\text{EtHgCl}$ , como sistemas modelos. Verificou-se que quando se incubou as misturas Hb +  $\text{EtHg}^+$  e Hb + NEM (Esquema 1) ocorreu redução de aproximadamente 97 e 88%, respectivamente, dos sinais quando comparado ao sistema contendo apenas a Hb humana livre. Este resultado, comprova que tanto o NEM como o  $\text{EtHg}^+$  ligaram-se seletivamente aos resíduos de cis livre da proteína,

bloqueando-os e dessa forma, desfavorecendo a ocorrência da reação com o  $\text{DTNA}^{2-}$ . O TH livre não apresentou sinal apreciável, o que indica que o grupo tiol não está livre (bloqueado).

No entanto, verificou-se que o sistema Hb + TH apresentou sinal semelhante ao da Hb livre, sendo então formuladas duas hipóteses (Esquema 1): (1) o  $\text{DTNA}^{2-}$  reage somente com os resíduos de cisteína livre da Hb formando o  $\text{TNA}^-$ , sem migração do  $\text{EtHg}^+$  do TH para a Hb; (2) ocorre reação entre a Hb e TH, com clivagem da ligação S-Hg do TH e formação de um aduto Hb-HgEt liberando ATS, o qual reage com  $\text{DTNA}^{2-}$  e forma o  $\text{TNA}^-$ , sendo monitorado em 344 nm. Diante disso, para avaliar qual das hipóteses seria mais aceitável, fez-se a análise de outros sistemas (Esquema 2).

**Esquema 1 - Reações realizadas usando o ensaio de Ellman. Condições: pH = 7,4 (Fosfato 10 mM com 100 mM NaCl) a 30°C.**



### Comentários

**1.** Os resíduos de cisteína livres da Hb reagem com o DTNA<sup>2-</sup>, sendo quantificados pelo ensaio de Ellman cerca de 2 resíduos de cisteína por mol de Hb, os quais podem estar relacionados aos resíduos de Cis93, visto que são mais acessíveis que o Cis112 e os Cis 104 são bloqueados.

**2.** EtHgCl reage com os resíduos de cisteína livres, bloqueando-os, e dessa forma impedindo que haja reação entre a Hb e o DTNA<sup>2-</sup>.

**3.** Similar ao EtHgCl, o ensaio com o NEM bloqueou os grupos tiois e devido a isso não ocorreu reação.

**4.** O TH não reagiu com o DTNA<sup>2-</sup> nas condições avaliadas, logo, não ocorreu clivagem da ligação S-Hg e liberação de etilmercúrio.

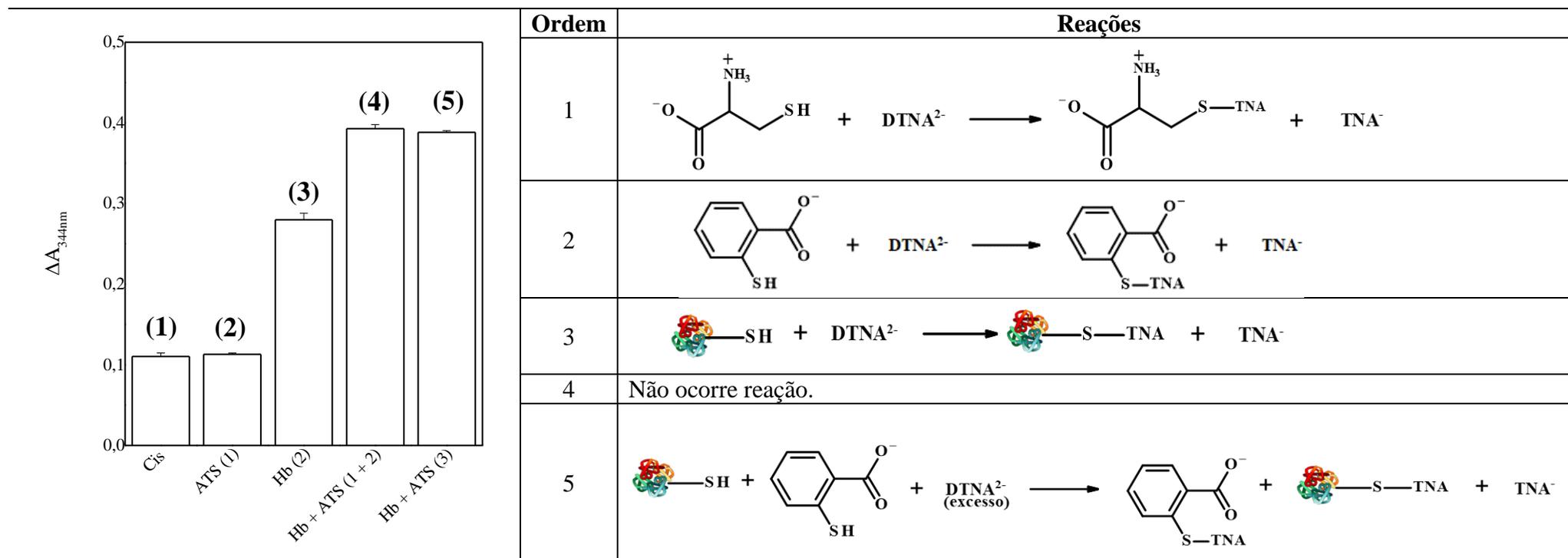
**5.** Devido a similaridade dos resultados relacionados aos sistemas Hb-TH e Hb livre, foram formuladas duas hipóteses a serem avaliadas:

(1) Não ocorre nenhuma reação entre TH e Hb, logo, o sinal observado é referente a proteína livre (ordem 1);

(2) Ocorre reação entre TH e Hb com formação de ácido tiosalicílico (ATS), o qual reage com DTNA<sup>2-</sup> e formando o TNA<sup>-</sup>.

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Esquema 2 – Avaliação da possível hipótese da reação entre Hb e TH. Condições: pH = 7,4 (Fosfato 10 mM com 100 mM NaCl) a 30°C.

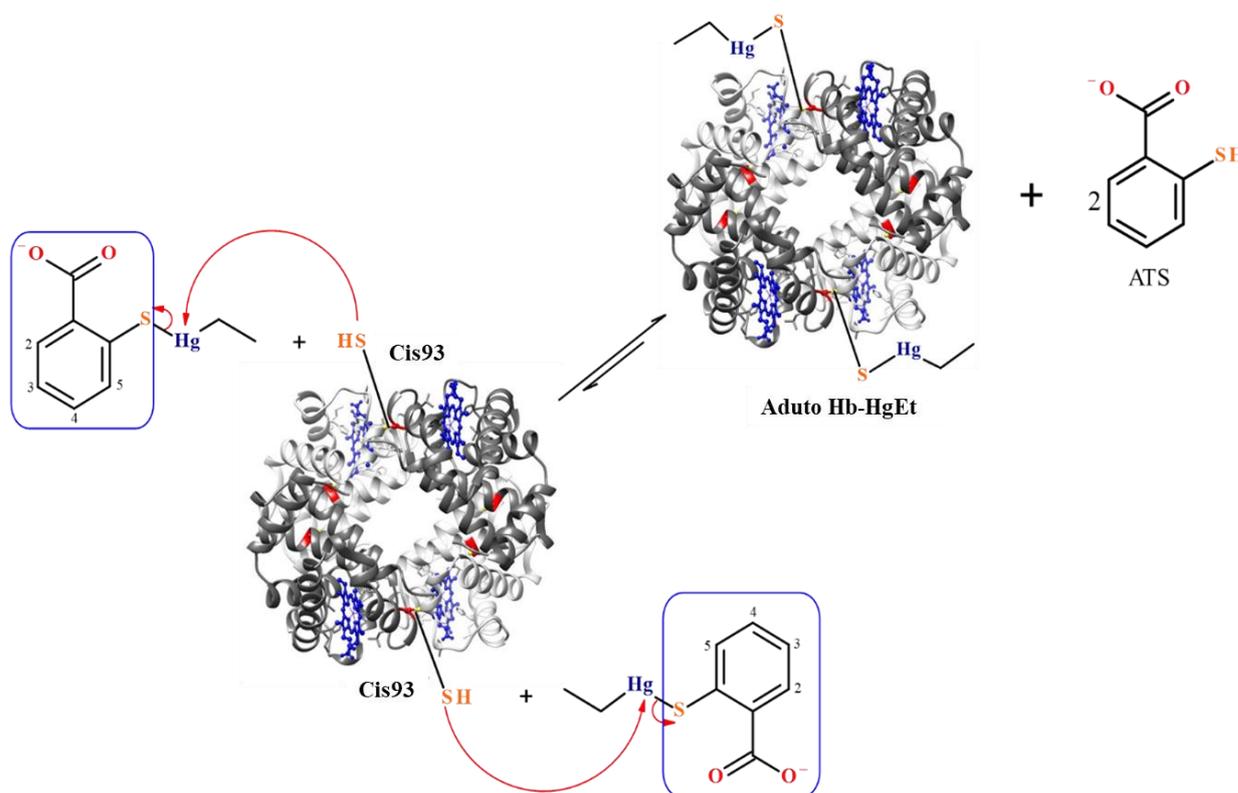


### Comentários

1. Baseada no ensaio de Ellman ocorre reação entre a cisteína e o  $DTNA^{2-}$ , formando o  $TNA^-$  o qual é monitorado a 344nm.
2. O ácido tiosalicílico (ATS) reage com  $DTNA^{2-}$  de maneira análoga a cisteína, no entanto como os sinais de absorvância desses tióis não apresentaram diferença significativa, pode-se inferir que ambos apresentam reatividade semelhante frente ao  $DTNA^{2-}$ .
3. A Hb reage com  $DTNA^{2-}$ , no entanto apresenta sinal de absorvância que corresponde a cerca de 2 resíduos de cisteína como verificado anteriormente (esquema 1).
4. Não ocorre reação, uma vez que nesse caso há apenas a soma matemática dos sinais de absorvância das soluções individuais de ATS (a) e Hb (b).
5. Comparando-se a soma das absorvâncias de cada solução separadamente (ATS e Hb) com a solução mista (ATS+Hb), verificou-se que não houve diferença significativa, confirmando a hipótese 2.

Verificou-se que o sinal analítico das soluções a mesma concentração de Cis e ATS (na presença de  $\text{DTNA}^{2-}$ ) foram similares, indicando que o reagente colorimétrico reage com o tiol alifático (Cis) e aromático (ATS) na mesma proporção. O valor do sinal de absorvância da solução de Cis ou ATS, correspondeu a cerca de 60% do sinal da solução de Hb, enquanto que, o somatório dos sinais da Hb livre e ATS, foi próximo ao sinal da mistura Hb + ATS, evidenciando que o  $\text{DTNA}^{2-}$  reage tanto com a Hb quanto com o ATS. Baseado nisso, pode-se sugerir que há transferência de  $\text{EtHg}^+$  do TH para os resíduos de Cis93 da Hb humana e liberação do ATS, o qual, pode interagir com resíduos de aminoácidos positivos do aduto Hb-HgEt. Portanto, a hipótese (2) mostrou-se mais adequada quanto ao mecanismo entre Hb e TH (Figura 8).

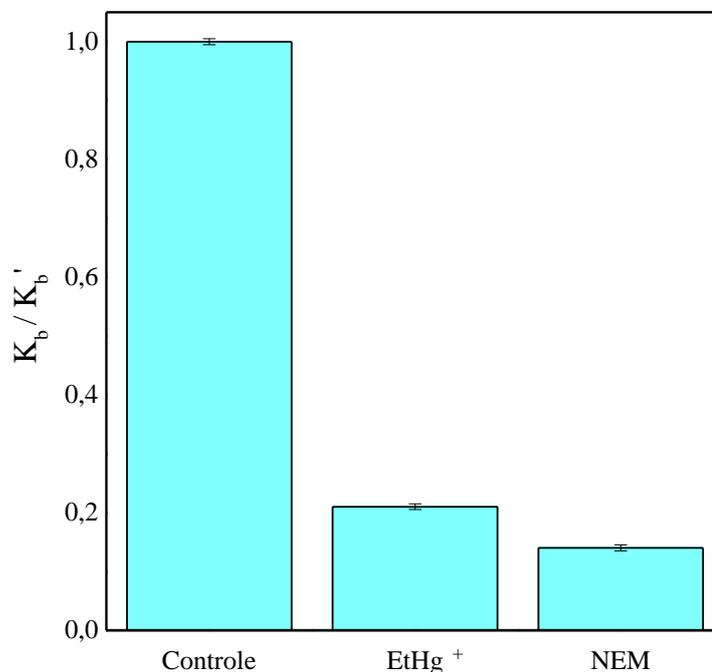
**Figura 8 – Mecanismo genérico de reação/interação proposto para o sistema timerosal e hemoglobina em condições fisiológicas baseado em evidências experimentais.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Por fim, para reforçar, essa hipótese, realizou-se titulações espectrofluorimétricas da Hb humana com TH, na presença de NEM e  $\text{EtHg}^+$  (Figura 9) e observou-se redução substancial nos valores das constantes de ligação ( $K_b$ ), indicando a validade da hipótese (2).

**Figura 9** – Efeito do EtHgCl e NEM no valor da constante de ligação do sistema Hb-TH.  $K_b$  e  $K_b'$  representa a constante de afinidade na ausência e presença de grupos tiois bloqueados, respectivamente. Condição:  $[Hb] = 4 \mu M$  e  $[TH] = 4-100 \mu M$ ;  $pH = 7,4$  (Fosfato 10 mM, 100 mM NaCl) a  $30^\circ C$ .



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

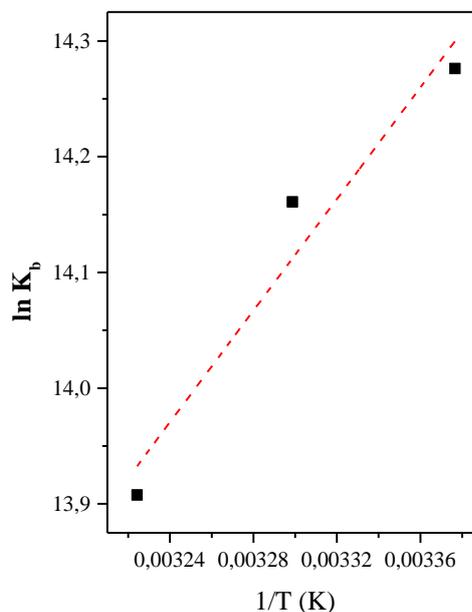
### 5.3.2.2 Parâmetros termodinâmicos

Segundo Mu et al., 2018, as principais interações não covalentes envolvidas na ligação entre pequenas moléculas e proteínas são as forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio. Uma vez determinados os valores de  $K_b$  a diferentes temperaturas, foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos como variação da entalpia ( $\Delta H$ ) e entropia ( $\Delta S$ ) por meio da aplicação da equação de Van't Hoff (Equação 4), buscando inferir sobre as principais forças intermoleculares que regem o processo de interação.

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

onde  $K_b$  representa a constante de ligação,  $T$  a temperatura em Kelvin (K) e  $R$  a constante do gás ideal ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ). Os valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  podem ser obtidos por meio dos coeficientes angular e linear, respectivamente do gráfico  $\ln K_b$  vs.  $1/T$  (Fig. 10).

**Figura 10 – Curva de Van't Hoff para cálculo dos parâmetros termodinâmicos.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Enquanto que o valor da energia livre de Gibbs foi calculado em função dos valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  (Equação 5):

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

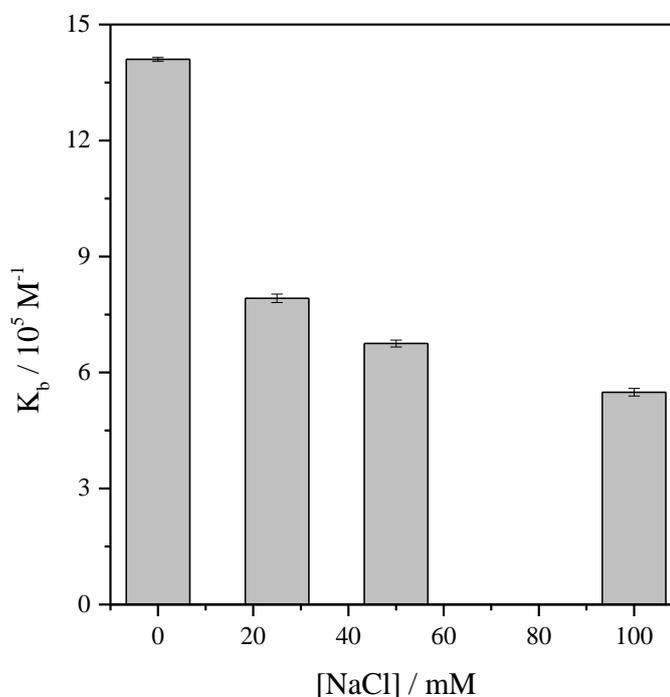
Segundo Bagheri e Fatemi (2018), a interação por forças eletrostáticas é dominante quando  $\Delta H < 0$  (ou  $\Delta H \approx 0$ ) e  $\Delta S > 0$ , enquanto que interações hidrofóbicas são consideradas a principal força quando  $\Delta H > 0$  e  $\Delta S > 0$ . Por fim, as ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals são associados com  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$ . Os valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  obtidos foram  $-20,04 \text{ kJ mol}^{-1}$  e  $+51,24 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , respectivamente, ou seja,  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S > 0$ , logo as principais forças envolvidas nesse processo são as interações eletrostáticas. Esse resultado corrobora com a estrutura do timerosal, uma vez que em condições fisiológicas ( $\text{pH} = 7,4$ ), a carga parcial do oxigênio é negativa, pois o  $\text{pK}_a$  do grupo carboxila é aproximadamente 3,05 (SANTOS et al., 2018). Assim, em virtude dessa carga podem ocorrer interações eletrostáticas com resíduos de aminoácidos positivos presentes na proteína (ou no aduto Hb-HgEt), como lisina, arginina e histidina. Adicionalmente, obteve-se os valores de  $\Delta G$  negativo  $-35,20$ ;  $-35,56$  e  $35,92 \text{ kJ mol}^{-1}$  (23, 30 e  $37^\circ\text{C}$ , respectivamente) sugerindo que o processo de interação entre a hemoglobina e o timerosal ocorre espontaneamente (LI et al., 2015).

#### 5.3.2.2.1 Avaliação da força iônica

Para avaliar se as interações eletrostáticas são realmente as preferenciais no processo de interação Hb-TH, empregou-se o ensaio de avaliação da força iônica, onde a magnitude da

constante de interação ( $K_b$ ) foi analisada frente a diferentes concentrações de cloreto de sódio no meio (0-100 mM). A Figura 11 apresenta os resultados obtidos para essa avaliação.

**Figura 11 – Efeito da força iônica no complexo hemoglobina-timerosal. Condição: pH = 7,4 (Fosfato 10 mM a 30°C).**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Conforme apresentado na Figura 11, ocorre uma diminuição de cerca de 61% nos valores de  $K_b$  em função do aumento da concentração do sal, quando comparado a condição na ausência de NaCl. Este resultado indica que as interações eletrostáticas são as forças preferenciais que regem o processo de interação entre a hemoglobina e o timerosal, onde ocorre atração entre a carga negativa presente no TH com os resíduos de aminoácidos carregados positivamente da proteína. Esses resultados confirmam os dados obtidos com base nos parâmetros termodinâmicos citados anteriormente.

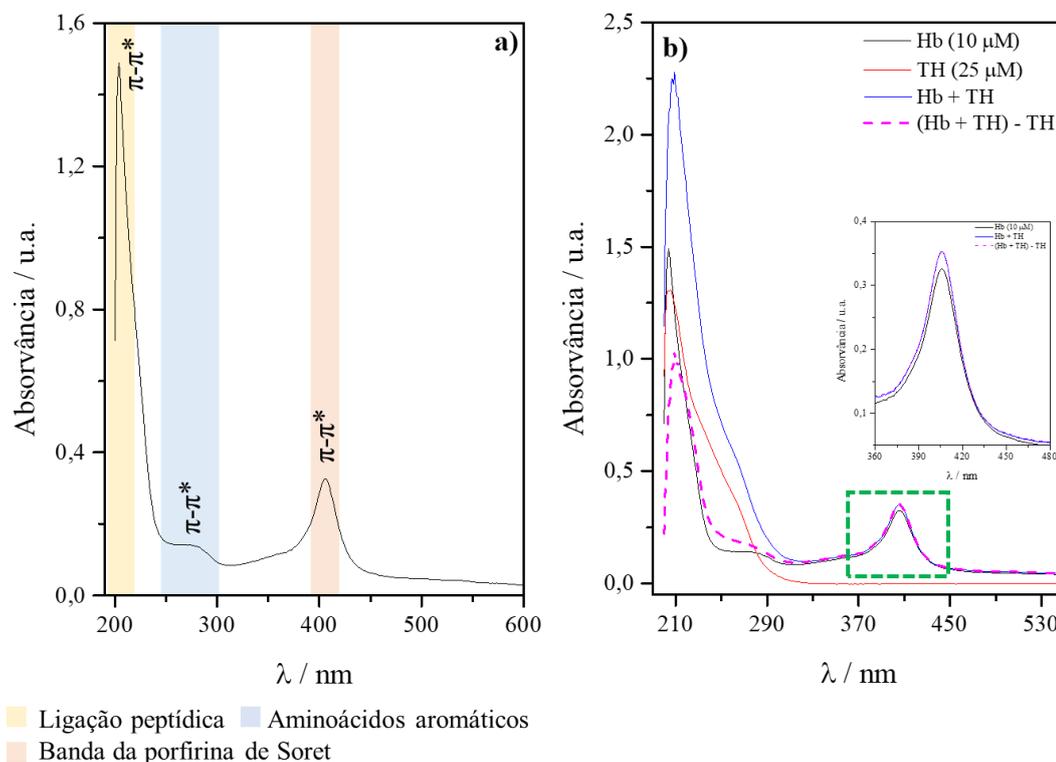
### 5.3.3 Avaliação de mudanças conformacionais na estrutura da proteína

#### 5.3.3.1 Avaliação da interação por espectroscopia de absorção molecular no UV-vis

A espectroscopia de absorção UV-visível é uma técnica importante que pode ser usada para explorar mudanças estruturais da proteína e avaliar a formação de complexos proteínas-ligantes (AJMAD et al., 2016). O espectro de absorção da hemoglobina apresenta três bandas de absorção características (todas transições  $\pi$ - $\pi^*$ ) nos seguintes comprimentos de onda 205, 276 e 405 nm (Fig. 12a), os quais referem-se as ligações peptídicas da estrutura proteica (mais precisamente o grupo carbonila); os resíduos de aminoácidos aromáticos os quais são os

cromóforos naturais das proteínas; e a banda da porfirina de Soret a qual origina-se do grupo heme, respectivamente (KHAN; KUMAR, 2016).

**Figura 12 - Resultados obtidos por espectroscopia no UV-vis. a) Perfil espectral da hemoglobina e suas respectivas transições; b) Espectros de absorção da Hb (10  $\mu$ M), TH (25  $\mu$ M), complexo Hb + TH e subtração dos espectros (Hb + TH) – TH. Condição: pH = 7,4 (Fosfato 10 mM e 100 mM NaCl) a 30 °C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Assim, para avaliar se ocorre a formação de complexo entre o timerosal e a hemoglobina, registrou-se os espectros da Hb livre e ligada ao timerosal, do ligante livre e o espectro de subtração do complexo (TH-Hb) e timerosal livre (TH), como mostra a Figura 12b. Verifica-se que ocorre um aumento na intensidade da banda de Soret (cerca de 8,6 %) após adição do timerosal, caracterizando efeito hipercrômico, e que o espectro de absorção referente a subtração do complexo supramolecular pelo timerosal, não foi sobreponível ao espectro da hemoglobina livre, indicando que está ocorrendo interação entre a macromolécula e o ligante avaliado (HE et al., 2014).

Adicionalmente, foi possível (re)avaliar o mecanismo de *quenching* preferencial, uma vez que, quando o mecanismo de interação ocorre por *quenching* estático, o espectro de absorção da proteína é alterado na presença do ligante, visto que há formação de complexo supramolecular no estado fundamental. Em contrapartida, quando o mecanismo de interação acontece por *quenching* dinâmico, o espectro de absorção da proteína não é alterado com adição do ligante, pois este ocorre no estado excitado (DANTAS et al., 2017). Assim, para esta análise,

avaliou-se o sinal de absorvância do complexo formado (Hb-TH) e a soma dos sinais da proteína e timerosal livres, utilizando como critério, se a soma dos sinais das espécies livres é igual ao do complexo Hb-TH. Assim, pode-se verificar a ocorrência do efeito aditivo da lei de Beer, caso contrário, tem-se a evidência da formação de complexo supramolecular. A Tabela 3 mostra a avaliação quantitativa dos sinais de absorvância das bandas apresentadas na Figura 10b, onde os valores de  $\Delta A$ , foram calculados por  $\Delta A = A_{(\text{complexo})} - A_{(\text{Hb} + \text{TH})}$ .

**Tabela 3 - Valores de absorvância para a hemoglobina (10  $\mu\text{M}$ ) e timerosal (25  $\mu\text{M}$ ) livres, complexo Hb-TH e mistura Hb+TH.**

$\lambda$ / nm	$A_{\text{Hb}}$ / a.u.	$A_{\text{TH}}$ / a.u.	$A_{\text{Hb-TH}}$ / a.u.	$A_{\text{Hb+TH}}$ / a.u.	$\Delta A$
205	1,4494	1,3077	2,1180	2,7571	- 0,6391
276	0,1402	0,1933	0,3621	0,3335	+ 0,0286
405	0,3253	0,0001	0,3521	0,3254	+ 0,0267

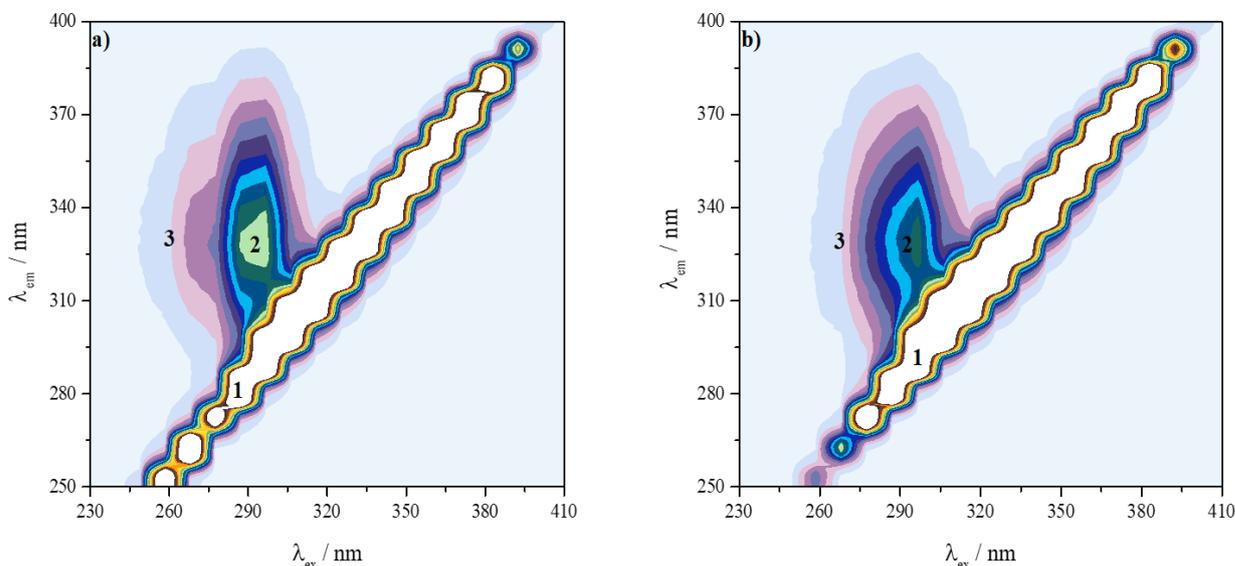
Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Como mostrado na Tabela 3, os valores de  $\Delta A$  foram diferentes de zero ( $\Delta A \neq 0$ ), indicando que estão ocorrendo modificações espectrais, caracterizando o mecanismo de *quenching* como estático, e confirmando os resultados obtidos por fluorescência molecular. Vale ressaltar que a maior variação foi observada no comprimento de onda correspondente as ligações peptídicas (205 nm), indicando que a estrutura da proteína é modificada após ligação do timerosal, o qual será melhor discutido nas seções posteriores.

### 5.3.3.2 Fluorescência tridimensional (3D)

A fluorescência tridimensional (3D) é uma técnica útil para avaliar possíveis mudanças conformacionais na estrutura das proteínas e no microambiente de seus fluoróforos, durante a complexação com pequenas moléculas, alterando simultaneamente os comprimentos de onda de excitação e emissão (SHANMUGARAJ et al., 2015). Dessa forma, para esta análise, realizou-se os espectros 3D para a hemoglobina na ausência e presença do timerosal, onde os mapas de contorno estão apresentados na Figura 13.

**Figura 13 – Espectros de fluorescência tridimensional para a hemoglobina (4,0  $\mu\text{M}$ ) na ausência (a) e presença (b) de timerosal (200  $\mu\text{M}$ ). Condição: pH = 7,4 (Fosfato 10 mM, 100 mM NaCl) a 30  $^{\circ}\text{C}$ .**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

De acordo com a Figura 13a, observa-se a presença de três picos, nomeadamente pico 1, 2 e 3, onde o primeiro pico ( $\lambda_{\text{em}} = \lambda_{\text{ex}}$ ) refere-se ao efeito do espalhamento Rayleigh; o pico 2 ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ : 297/334 nm) representa a fluorescência intrínseca da proteína, ou seja, aos resíduos de Tir e Trp; e o terceiro pico ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ : 268/331 nm) é característico dos resíduos aromáticos locais (Tir e Trp) de maneira semelhante ao pico 2 por excitação a 280 nm, mas não por causa da emissão do esqueleto polipeptídico de proteínas (DAS et al., 2018). Os principais parâmetros associados aos espectros 3D estão sumarizados na Tabela 4.

**Tabela 4 – Parâmetros relacionados aos espectros de fluorescência 3D.**

Pico	Hemoglobina			Hemoglobina – TH		
	Posição	Stokes <sup>1</sup>	F	Posição	Stokes <sup>1</sup>	F
	( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ )	$\Delta\lambda$ (nm)		( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ )	$\Delta\lambda$ (nm)	
1	( $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ )	0	-	( $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ )	0	-
2	297/334	37	351 (100%)	297/329	32	325 (7,4%)
3	268/331	63	116 (100%)	258/324	66	37 (68,1%)

Fonte: elaborado pela autora, 2020. / <sup>1</sup>Deslocamento Stokes

Comparando os mapas de contorno referente ao espectro da hemoglobina livre (Fig.13a) e ligada (Fig. 13b), verifica-se que, após a adição do timerosal, ocorre uma redução de aproximadamente 7,40 e 68,1 % nos picos 2 e 3 (Tabela 4), respectivamente, indicando que

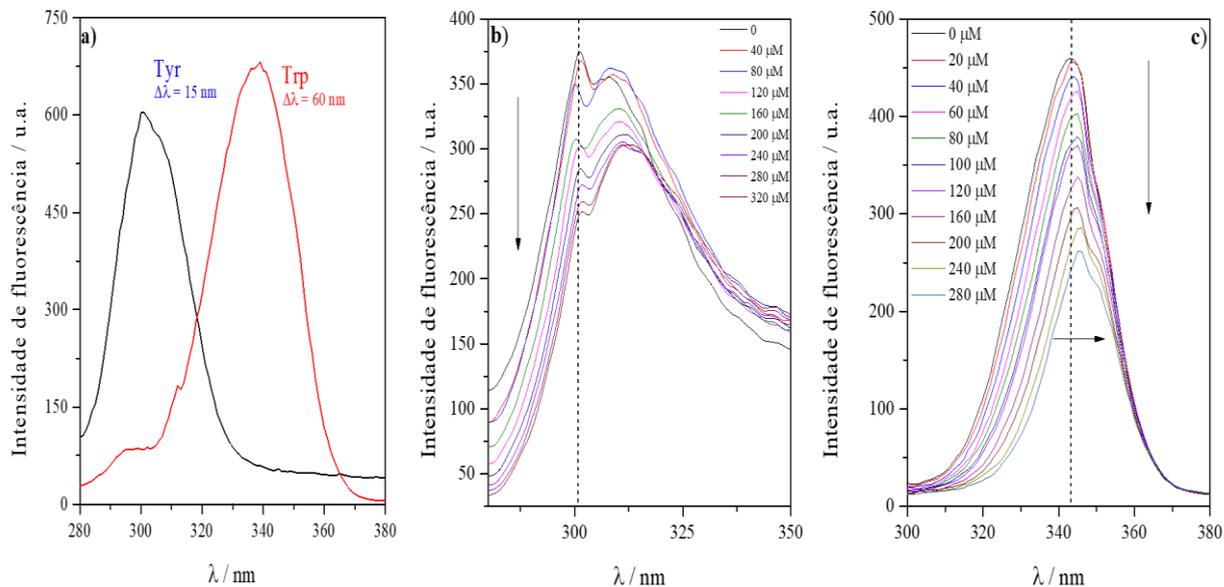
ocorrem alterações estruturais na estrutura secundária e terciária da hemoglobina (DAS et al., 2018), as quais podem acarretar em mudanças no desempenho de suas funções, uma vez que há perda de sua estrutura nativa. Além disso, observa-se que o deslocamento Stokes foi modificado após a ligação do TH à hemoglobina, sugerindo que pode ter ocorrido alterações tanto no microambiente dos Trp quanto na conformação da mesma. Esses dados corroboram com o trabalho reportado por He e colaboradores (2014), os quais avaliaram a interação de alcaloides com a hemoglobina humana e verificaram que, devido a complexação dos ligantes à macromolécula, ocorrem mudanças na conformação da proteína.

### 5.3.3.3 Fluorescência sincronizada

A técnica de fluorescência sincronizada concebida por J. Lloyd em 1971, é uma ferramenta utilizada para explorar as alterações no microambiente dos resíduos de tirosina e triptofano isoladamente, por meio da análise dos espectros de emissão, onde se mantém fixo um  $\Delta\lambda$  em função do comprimento de onda de excitação (NAVEENRAJ et al., 2012). Assim, quando se aplica  $\Delta\lambda = 15$  nm monitora-se seletivamente os resíduos de Tir, e quando o  $\Delta\lambda = 60$  nm o resíduo de Trp é avaliado (CHUNMEI et al., 2014), como mostra a Figura 14a. Os espectros referentes à titulação da hemoglobina com o timerosal obtidos quando  $\Delta\lambda = 15$  e 60 nm, estão apresentados nas Figuras 14b e 14c, respectivamente.

Verifica-se nas Figuras 14b e 14c, que ao adicionar quantidades crescentes de timerosal ao sistema, ocorreu diminuição gradual no sinal de fluorescência, bem como deslocamento do máximo de emissão ( $\Delta\lambda_{\text{max}} = +3$  nm) para maiores comprimentos de onda relacionado ao resíduo de triptofano. Esses dados indicam que estão ocorrendo mudanças no microambiente próximo ao Trp, tornando-o mais hidrofílico, isto é, mais exposto ao solvente (MAKARSKA-BIALOKOZ, 2017), em decorrência de alterações na conformação da hemoglobina. Além disso, foi possível calcular a constante de Stern-Volmer (equação 1), para avaliar a magnitude do decréscimo do sinal analítico, onde  $K_{\text{SV}}$  é maior para o Trp ( $3,33 \pm 0,14 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ) quando comparado a Tir ( $1,67 \pm 0,05 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ ), sugerindo que estes resíduos influenciam de forma mais significativa no processo de interação (DANTAS et al., 2017).

**Figura 14 – Resultados obtidos empregando estudos de fluorescência sincronizada. a) Espectros de emissão dos resíduos de tirosina ( $\Delta\lambda = 15$  nm) e triptofano ( $\Delta\lambda = 60$  nm); Espectro de emissão para o resíduo de tirosina (b) e triptofano (c) após incrementos crescentes de timerosal (0-320  $\mu$ M e 0-280  $\mu$ M, respectivamente). Condição: [Hb] = 1,0  $\mu$ M; pH = 7,4 (Fosfato 10 mM, 100 mM NaCl) a 30 °C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Nesse sentido, pode-se inferir que os resíduos de Trp da hemoglobina, mais precisamente o  $\beta$ -37Trp (KAZEMI et al., 2017) localizado na interface  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 (principal fonte de emissão na Hb), deve estar mais próximo ao sítio de ligação. Resultados similares foram obtidos por Basu e Kumar (2016), os quais avaliaram a interação da hemoglobina humana com a tartrazina e concluíram que os resíduos de Trp contribuem mais significativamente no processo de interação.

#### 5.3.3.4 Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular (CD) são empregados para investigar mudanças na estrutura secundária das proteínas (CAO et al., 2018). Assim, os sistemas Hb livre e Hb-TH foram avaliados e comparados, sendo os resultados de CD expressos em função da elipticidade molar média do resíduo (EMR,  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ), de acordo com a equação 6.

$$\text{EMR} = \frac{\text{DC}(\text{med})\text{observado}}{C_p \times n \times L \times 10} (\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}) \quad \text{Equação (6)}$$

em que  $C_p$ , é a concentração molar da hemoglobina,  $n$  é o número de resíduos de aminoácidos (574 para hemoglobina humana, SEM et al., 2018) e  $L$  é o comprimento do percurso (0,1 cm).

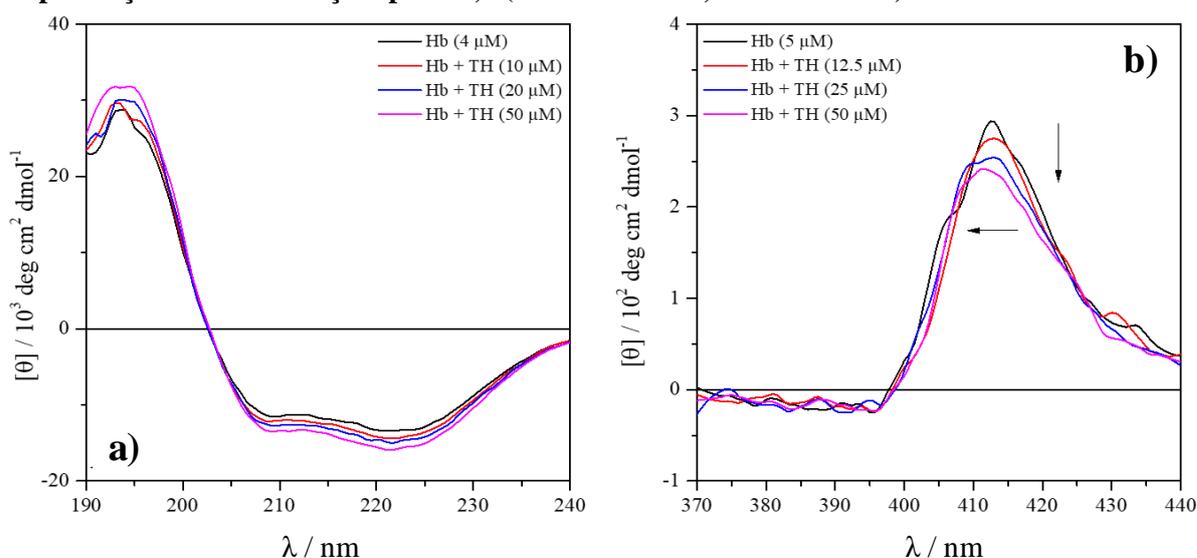
O conteúdo de elipticidade foi calculado a partir dos valores de EMR em 222 nm, empregando a equação 7, respectivamente.

$$\alpha\text{-hélice}(\%) = \frac{-\text{EMR}_{222} - 2340}{33000} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

onde  $\text{EMR}_{222}$  representa os valores de EMR e 33000 corresponde ao valor de EMR da  $\alpha$ -hélice pura a 222 nm.

O espectro da Hb humana apresenta um perfil típico com duas bandas negativas em 208 e 222 nm, caracterizando o conteúdo de  $\alpha$ -hélice (Figura 15a), em virtude das transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  da  $\alpha$ -hélice e  $\pi \rightarrow \pi^*$  da cadeia polipeptídica, respectivamente. A adição de TH, levou a diminuição da intensidade do sinal, em ambas as bandas, entretanto não foi verificado deslocamento dos mínimos de absorção. O conteúdo de  $\alpha$ -hélice na ausência do timerosal foi de 36,6%, contudo, ao adicionar timerosal nas proporções 1:2.5, 1:5 e 1:12.5, o percentual de  $\alpha$ -hélice aumentou para 39,8, 41,6 e 44,5%, respectivamente. Esse resultado indica que o ligante interage com a hemoglobina, alterando sua conformação e conseqüentemente formando uma estrutura mais estável (SANTOS et al., 2018). Esses dados são concordantes com o trabalho reportado por Hazra et al. (2013), que avaliou a ligação de diferentes alcaloides com a hemoglobina humana e obtiveram percentuais de  $\alpha$ -hélice para a Hb pura de aproximadamente 38 %.

**Figura 15 – Espectros de dicroísmo circular da (a) hemoglobina e (b) banda da porfirina de Soret na presença de TH. Condição: pH = 7,4 (Fosfato 10 mM, 100 mM NaCl) a 30 °C.**



Fonte: elaborado em colaboração com o Grupo de Estudos em Química Orgânica e Biológica (UFMG), 2020.

Para avaliar a deformação do anel porfirínico na presença do TH, a banda de Soret foi monitorada empregando diferentes proporções de Hb:TH (Figura 15b). Verificou-se um máximo positivo em 413 nm e um pequeno vale negativo de 370-395 nm. Na presença de diferentes excessos de TH (1:2.5; 1:5 e 1:10), a intensidade da banda de Soret diminuiu, evidenciando que a ligação do TH alterou a planaridade e a transição eletrônica  $\pi \rightarrow \pi^*$  do anel da porfirina, possivelmente, interferindo na capacidade da proteína em se ligar e transportar oxigênio. Por fim, esses dados são concordantes com os trabalhos reportado por Chatterjee e Kumar (2014 e 2016), os quais avaliaram a ligação de diferentes corantes com a Hb humana.

### 5.3.3.5 Transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)

Segundo Naveenraj e colaboradores (2012), o ensaio de transferência de energia tem sido amplamente utilizado para o estudo de interações entre pequenas moléculas e proteínas, pois permite avaliar a distância intermolecular doador-receptor. O processo de FRET é um fenômeno físico na qual ocorre a transferência de energia no estado excitado de uma molécula doadora (fluoróforo) para uma aceptora (ligante), podendo o ligante absorver essa energia e emití-la na forma de fluorescência ou atuar como espécie *quencher* (LAKOWICZ, 2006).

A eficiência deste processo está baseado nos seguintes parâmetros (GHOSH et al., 2016): (i) o doador deve possuir um elevado rendimento quântico; (ii) haver sobreposição espectral entre a emissão do doador (Hb) e a absorção do receptor (TH); (iii) a distância ( $r_0$ ) entre o doador e receptor deve estar contida no intervalo de 2-8 nm; e (iv) deve haver uma orientação adequada dos dipolos da molécula doadora e receptora. Dessa forma, de acordo com a teoria de Förster, a energia transferida durante o processo de interação pode ser calculada a partir da Equação 6 (LI et al., 2015):

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6} \quad \text{Equação (6)}$$

em que,  $R_0$  é a distância crítica de Förster, quando 50% (0,5) da energia de emissão do doador é transferida para o receptor, a qual é descrita pela Equação 7:

$$R_0^6 = \frac{8,8 \times 10^{-25} k^2 \Phi J}{N^4} \quad \text{Equação (7)}$$

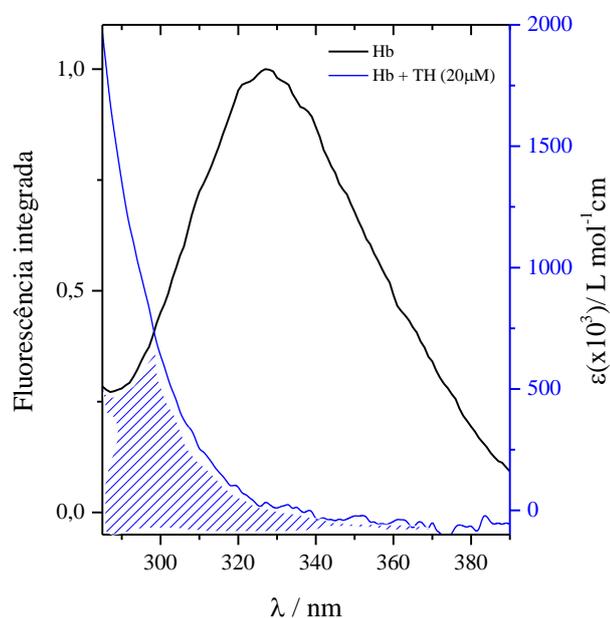
em que,  $K^2$  é o fator que descreve a orientação dos dipolos de transição do doador e do receptor ( $K^2 = 2/3$  para orientação aleatória em solução fluida),  $N$  é o índice de refração médio do meio (1,36),  $\Phi$  (0,06 para hemoglobina humana) é o rendimento quântico da hemoglobina (DAS et al., 2018). O parâmetro  $J$ , corresponde a área de sobreposição do espectro de emissão

de fluorescência normalizado da Hb em relação ao espectro de absorção do TH. A área de sobreposição (J) pode ser calculada conforme Equação 8 (AJMAL et al., 2016):

$$J = \frac{\sum F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4\Delta\lambda}{\sum F(\lambda)\Delta\lambda} \quad \text{Equação (8)}$$

onde,  $F(\lambda)$  é a fluorescência da proteína normalizada na faixa de comprimento de onda  $\lambda$  ( $\lambda + \Delta\lambda$ ), e  $\varepsilon(\lambda)$  é o coeficiente de absorvidade molar do timerosal. A Figura 16 mostra a sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência da hemoglobina e o espectro de absorbância UV-vis do timerosal, utilizado para determinar a distância doador-receptor ( $r_0$ ).

**Figura 16 – Sobreposição dos espectros normalizados de fluorescência da Hb (10  $\mu\text{M}$ ) e absorção molecular do TH (20  $\mu\text{M}$ ). Condição: pH = 7,4 (Fosfato 10 mM, 100 mM NaCl) a 30°C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A partir da aplicação das equações 6, 7 e 8 obteve-se os parâmetros  $r_0$ ,  $R_0$ , E e J, em três diferentes concentrações do ligante, os quais estão sumarizados na Tabela 5.

**Tabela 5 – Parâmetros calculados em relação ao processo de FRET.**

Proporção (Hb:TH)	J ( $10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	E	$R_0$ (nm)	$r_0$ (nm)
1:1	1,587	0,050	1,61	2,63
1:2	1,557	0,080	1,61	2,41
1:4	1,516	0,181	1,60	2,06

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Verifica-se na Tabela 5 que os valores de  $r_0$  estão contidos no intervalo de 2-8 nm, e que com o aumento da proporção P:L (Hb:TH) ocorre uma diminuição desta distância, em decorrência de uma maior probabilidade de ligação entre o timerosal e hemoglobina. Além disso, observou-se que os valores da transferência de energia (E) foram menores que 50%,

assim,  $0,5R_0 < r_0 < 2,0R_0$ , sugerindo que transferência de energia da hemoglobina para o timerosal ocorre com elevada probabilidade (HE et al., 2014). Tais resultados são concordantes com o trabalho de Makarska-Bialokoz (2017), o qual avaliou a interação do ácido úrico com a hemoglobina humana.

Baseado nesses resultados, pode-se fazer uma análise comparativa dos dados obtidos pela titulação espectrofluorimétrica e absorção no UV-vis, onde verificou-se que o mecanismo de *quenching* preferencial é o estático, o que é concordante com os dados de FRET, visto que para a formação de complexo supramolecular no estado fundamental é necessário que a transferência de energia seja eficiente (MAURYA et al., 2018).

### 5.3.4 Avaliação de competidores no processo de interação Hb-TH

Segundo Farrell (2011), o sangue é formado por três componentes principais: os glóbulos vermelhos (eritrócitos), as células brancas (leucócitos), as plaquetas e o espaço extracelular em torno dessas células denominado plasma, o qual é cerca de duas vezes maior que o volume intracelular ocupado pelas células (60-80%). No plasma, existem algumas espécies que desempenham papéis vitais e sua ligação a proteínas podem favorecer ou desfavorecer o processo de interação macromolécula-ligante (SANTOS et al., 2018). Assim, avaliou-se a influência de 10 espécies competidoras: Ca(II), Mg(II), Fe(III), ânion fosfato, glicose, e hidrogenocarbonato, glicose, , ácido oleico, linoleico, palmítico e esteárico, no processo de interação entre hemoglobina e timerosal. As concentrações destas espécies no plasma, bem como a proporção competidor:proteína estão apresentados na Tabela 6.

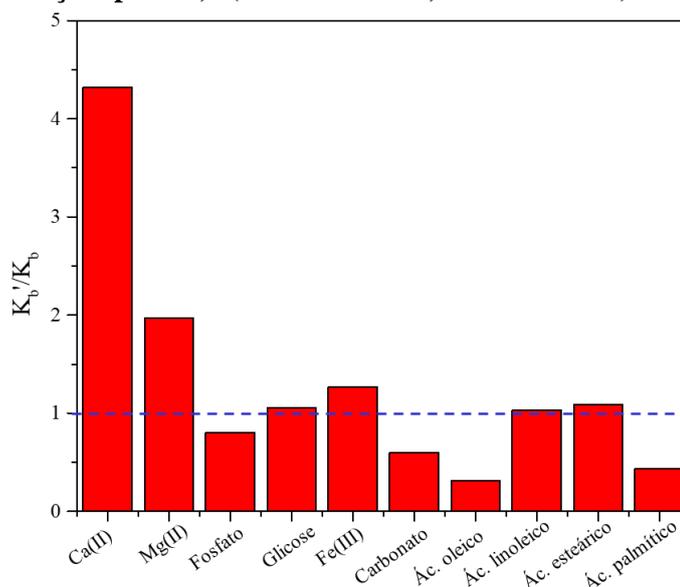
**Tabela 6 – Concentração de espécies presentes no plasma/soro humano.**

Espécies	Concentração no plasma/soro (mM)	Concentração adotada (mM)	Proporção [competidor]:[Hb]	Referência
Hb	1,86 - 2,71	2,30	-	Manascero-Gómez, et al., 2015.
Ca(II)	2,15 - 2,50	2,45	1:1	Bishop; fodey; schoeff, 2005.
Mg(II)	0,63 - 1,00	0,70	1:1	
Fe(III)	0,65 - 1,70	1,05	1:1	
Fosfato	0,87 - 1,45	0,70	1:1	Motta, 2009.
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	21,0 – 30,0	24	1:10	
Glicose	3,9 - 6,0	4,90	1:2	Bishop; Fodey; Schoeff, 2005.
Ác. oleico	1,28 - 3,21	2,80	1:1	Glaser et al., 2010;
Ác. linoleico	2,56 - 4,92	3,50	1:2	Almeida et al., 2002;
Ác. palmítico	1,63 - 4,06	2,80	1:1	Spahis et al., 2015;
Ác. esteárico	0,49 - 1,05	1,05	1:1	Abdelmagid et al., 2015.

Fonte: adaptado de Santos et al., 2020.

Para avaliar se determinado competidor favorece ou desfavorece o processo de interação Hb-TH, utilizou-se como parâmetro a comparação das constantes de ligação na ausência ( $K_b$ ) e presença destas espécies ( $K_b'$ ). Assim, quando a razão  $K_b'/K_b > 1$ , é um indicativo de que o competidor favorece a interação, caso contrário ( $K_b'/K_b < 1$ ), que o processo de interação é desfavorecido (Figura 17).

**Figura 17 – Efeito de espécies competidoras nos valores das constantes de ligação ( $K_b$ ) relativo a interação Hb-TH. Condição: pH = 7,4 (Fosfato 10 mM, 100 mM NaCl) a 30 °C.**



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A Figura 17 mostra os resultados obtidos para essa avaliação, onde observa-se que fosfato, glicose, Fe(III) e os ácidos linoleico e esteárico não influenciaram o processo de interação, visto que  $K_b'/K_b$  foi próximo a unidade. Entretanto, o ânion hidrogenocarbonato e os ácidos oleico e palmítico, desfavorecem o processo de interação, indicando que houve competição entre a espécie e o ligante pelo mesmo sítio de ligação da macromolécula ou que a espécie interage com o ligante (ou proteína) tornando a interação proteína-ligante menos favorável (YAN et al., 2013). Em contrapartida, os íons Ca(II) e Mg(II) favoreceram o processo de interação Hb-TH, possivelmente por conduzir a alterações na conformação da proteína ou a formação de um complexo TH-Ca(II) ou TH-Mg(II), com maior afinidade pela Hb, tornando-a mais favorável para a interação com o timerosal. Gericke e colaboradores (1993), avaliaram o efeito do grupo tiol do timerosal sobre a concentração de cálcio intracelular em células endoteliais do cordão umbilical humano, e observaram que a adição do timerosal induziu um aumento do cálcio intracelular e por consequência, houve uma diminuição do cálcio livre. Esses resultados mostram que há uma elevada afinidade entre TH e Ca(II), o que pode explicar o aumento da constante de ligação com a proteína. Elferink e Koster (1998), investigaram o efeito do timerosal na migração de neutrófilos, e verificaram que ocorre um aumento nesta migração

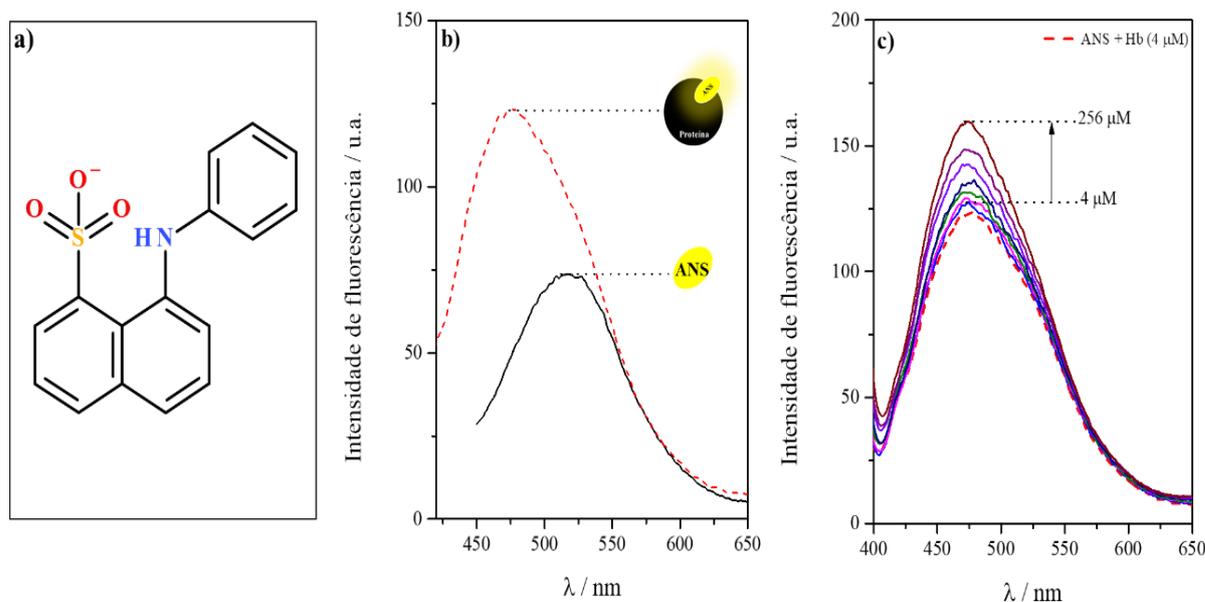
na presença de íons divalentes como cálcio e magnésio, sendo o efeito desses íons bastante semelhante. Esses dados indicam que devido à similaridade de suas propriedades, cálcio e magnésio atuam de forma equivalente o que pode explicar o aumento nos valores das constantes de ligação com a hemoglobina.

### 5.3.5 Avaliação de efeitos químicos no processo de interação Hb-TH

#### 5.3.5.1 Avaliação de sítios hidrofóbicos da hemoglobina

A sonda ANS (ácido 1-anilinaftaleno-8-sulfônico, Fig. 18a) tem sido bastante empregada para avaliar a hidrofobicidade de proteínas (GUAN et al., 2014; CATTONI et al., 2009). Esta sonda possui um baixo rendimento quântico de fluorescência em meio aquoso, mas após a sua ligação em regiões hidrofóbicas da macromolécula, a fluorescência aumenta significativamente (Fig. 18b). Dessa forma, o aumento do sinal analítico é utilizado como parâmetro para medida de hidrofobicidade da superfície da proteína (SNEHARANI, 2016). A sonda ANS foi utilizada para avaliar se o sítio de ligação preferencial do timerosal ocorre em regiões hidrofóbicas da hemoglobina. Para tanto, avaliou-se o efeito de incrementos crescentes do ligante avaliado ao sistema Hb-ANS, como mostrado na Figura 18c.

**Figura 18** – a) Estrutura química do ANS, b) Intensidade de fluorescência do ANS (4  $\mu\text{M}$ ) na ausência e na presença da Hb (4  $\mu\text{M}$ ), c) Intensidade de fluorescência do sistema ANS-Hb na presença de diferentes concentrações de timerosal (0-256  $\mu\text{M}$ ). Condição: pH = 7,4 (Fosfato 10 mM, 100 mM NaCl) a 30 °C.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

A presença de um ligante que possui o mesmo sítio de ligação com a proteína no sistema, pode levar a um deslocamento do ANS da macromolécula, e por consequência conduzir a uma diminuição na intensidade de fluorescência, pois parte do ANS estaria em sua forma livre.

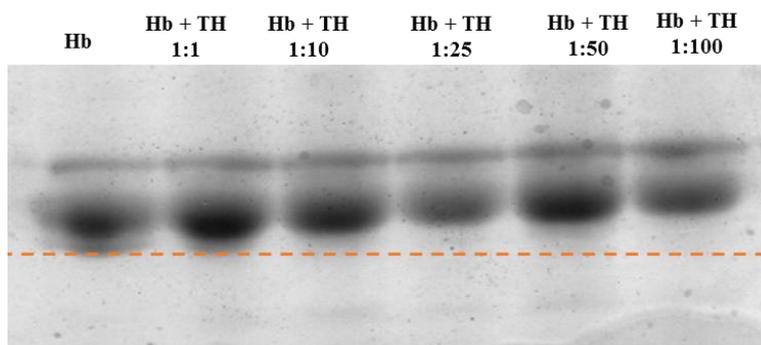
Baseado nisso, verifica-se na Figura 18c que, com a adição de timerosal ao sistema contendo Hb-ANS, ocorreu aumento gradual no sinal analítico, indicando que o ligante avaliado não interage preferencialmente com sítios hidrofóbicos da proteína, mas conduz a alterações conformacionais de tal modo que eleva o grau de hidrofobicidade da superfície da macromolécula.

Esses dados sugerem que a ligação do timerosal, não ocorre com os aminoácidos presentes no núcleo da biomolécula, uma vez que proteínas globulares possuem como característica um denso núcleo hidrofóbico (NELSON; COX, 2014). Logo, supõe-se que o processo de reação/interação ocorra majoritariamente com os resíduos de aminoácidos mais externos, como por exemplo Cis93, como visto anteriormente.

#### 5.3.5.2 Avaliação do perfil de migração eletroforética

A eletroforese é uma das técnicas de separação mais empregadas em análises de proteínas, em virtude de sua alta eficiência e baixo consumo de amostras e reagentes (HAJBA; GUTTMAN, 2017). Assim, para avaliar se ocorrem mudanças no perfil de migração eletroforética da hemoglobina na presença do timerosal, realizou-se estudos de eletroforese em gel de poliacrilamida (Native-PAGE), como mostrado na Figura 19.

**Figura 19 – Efeito da adição de incrementos crescentes de timerosal à hemoglobina na mobilidade eletroforética por Native-PAGE.**



Fonte: realizado em colaboração com o Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LBFI-UFAL), 2020.

Baseado na Figura 19, observa-se que, com a adição de incrementos crescentes de timerosal ocorreu redução na mobilidade eletroforética quando comparado a Hb livre (controle), em decorrência da formação de complexo macromolécula-ligante (TRNKOVÁ et al., 2011). Esse comportamento sugere que a proteína se torna mais aniônica e com maior massa ao se ligar ao timerosal, acarretando em atraso nas bandas. Esses dados confirmam os resultados obtidos por DLS em que há formação de aglomerados entre a hemoglobina e o timerosal, e corroboram com dados já publicados na literatura (GHOSH et al., 2016).

### 5.3.5.3 Análise da dispersão dinâmica de luz (DLS)

Segundo Lorber e colaboradores (2012), a técnica de dispersão dinâmica da luz compreende uma importante ferramenta utilizada para avaliar agregados em soluções macromoleculares, determinar o raio hidrodinâmico de proteínas e ácidos nucleicos; bem como para monitorar a formação de complexos macromolécula-ligante. Dessa forma, empregou-se esta técnica para investigar se a complexação do timerosal com a proteína causa mudança no raio hidrodinâmico da Hb em sua forma livre, obtendo-se raio hidrodinâmico da hemoglobina pura igual a  $9,14 \pm 0,88$  nm, e com a adição de timerosal ao sistema nas proporções molares 1:1 e 1:50, ocorreu um aumento do raio para  $11,61 \pm 1,26$  e  $12,15 \pm 0,94$  nm, respectivamente, indicando uma provável formação de agregados de hemoglobina após a interação com o ligante avaliado. Resultados semelhantes foram reportados por Basu e colaboradores (2016), os quais avaliaram a interação da tartrazina com a hemoglobina humana, sendo o raio hidrodinâmico médio da Hb pura igual  $8.80 \pm 0.15$  e após complexação com o ligante, se observou aumento para  $13.6 \pm 0.30$  nm, sugerindo formação de agregados macromoleculares.

### 5.3.6 Avaliação dos efeitos biológicos no processo de interação Hb-TH

#### 5.3.6.1 Influência do timerosal no processo de glicação *in vitro*

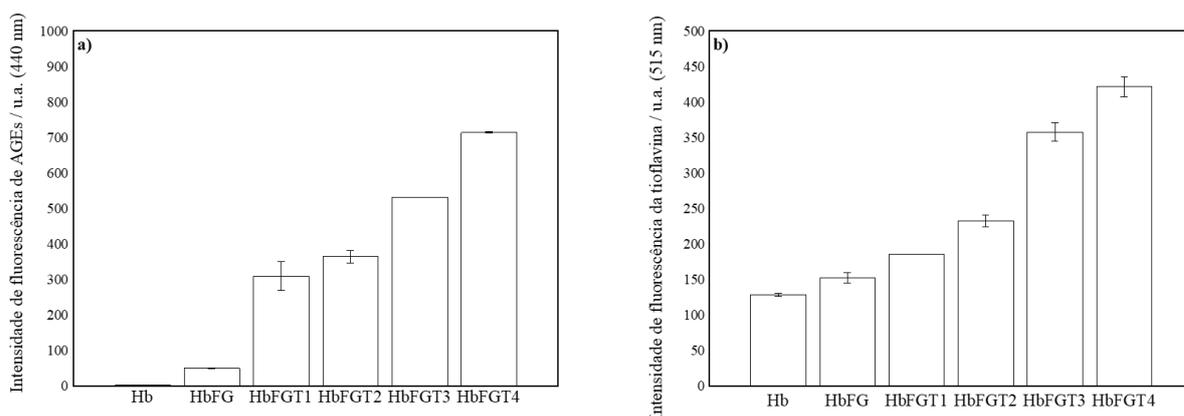
A glicação desempenha um papel importante na modificação e agregação de proteínas e ocorre pela capacidade de formação de ligações cruzadas de proteínas encontrada nos AGEs (Taghavi et al., 2017). Alterações em proteínas da matriz extracelular devido a formação de AGEs prejudicam a integridade estrutural e a função, levando ao desenvolvimento e / ou progressão de diferentes patologias, como aterosclerose, doença de Alzheimer, neuropatia, retinopatia diabética, nefropatia diabética e câncer, entre outras (Torres et al., 2018; Salar et al., 2019). Como mostrado na Figura 20a, após um período de incubação (1 semana), com tampão, a hemoglobina (Hb) não apresentou fluorescência nos comprimentos de onda selecionados. Na presença de frutose e glicose, a intensidade fluorescente indicava formação de AGE fluorescente. O timerosal influencia a formação de AGE, uma vez que o sinal de fluorescência aumentou sete vezes em comparação com o sistema HbFG (controle). Além disso, o efeito do timerosal na formação de AGE era dependente da concentração.

#### 5.3.6.2 Avaliação de mudanças estruturais empregando Tioflavina T (ThT)

A formação de fibrilas amilóides em sistemas de hemoglobina submetidos à glicação, tanto na presença quanto na ausência de timerosal em diferentes concentrações, foi realizada

com a sonda ThT (Figura 20b). A THT é um corante benzotiazol comumente usado para diagnosticar fibrilas amilóides a partir do aumento da intensidade fluorescente na presença de agregados amilóides (Biancalana e Koide, 2010). Após o período de incubação de 1 semana, observou-se (Figura 20b) que o sistema HbFG (na qual a Hb foi submetida à glicação por frutose e glicose) apresentou maior fluorescência quando comparado ao sistema Hb (na qual a Hb foi incubada apenas com tampão fosfato a 50 mM e pH = 7,4). A fibrilação da hemoglobina glicada foi relatada anteriormente na presença de glicose (Ghazanfari-Sarabi et al., 2019; Sahebi e Divsalar, 2016) e glioxal (Iram et al., 2013).

**Figura 20 – Intensidade de fluorescência (a) AGEs e (b) ThT em diferentes sistemas de Hb, com incubação de 1 semana ( $n = 3$ ). Hb = controle negativo, hemoglobina incubada em tampão fosfato pH = 7,4; HbFG = controle positivo, sistema com hemoglobina glicada com frutose (F) e glicose (G), e HbFG-TH1, HbFG-TH2, HbFG-TH3, e HbFG-TH4 onde a Hb foi glicada na presença de timerosal nas seguintes faixas de 6,25, 12,5, 25 e 50  $\mu$ M, respectivamente). Nos dois ensaios, os sistemas contendo apenas Hb-TH não mostraram variação do sinal analítico.**



Fonte: elaborado em colaboração com o Laboratório de Eletroquímica/UFAL, 2020.

Nos sistemas em que a Hb foi glicada na presença de timerosal em diferentes concentrações (6,25 a 50  $\mu$ M), foi observado um aumento pronunciado na fluorescência da sonda ThT em um perfil dependente da concentração. Assim, com o aumento da concentração de timerosal, há aumento da taxa de glicação, bem como a formação de amilóide.

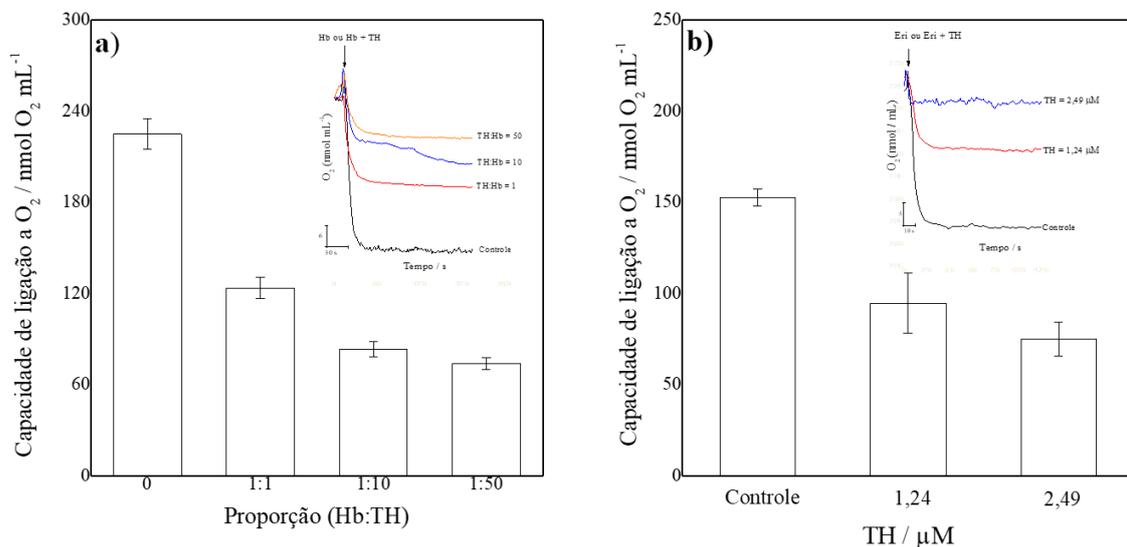
### 5.3.6.3 Avaliação da capacidade de ligação a O<sub>2</sub>

Sabe-se que o oxigênio possui baixa solubilidade em meio aquoso e não é transportado para os tecidos em quantidade suficiente se estiver apenas dissolvido no plasma. Dessa forma, sua difusão ocorre pela ligação com metais de transição como o ferro. No entanto, o ferro em sua forma livre é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio, as quais são letais às (bio)macromoléculas. Assim, o ferro presente nas células é incorporado em um grupo prostético (composto associado a proteína que contribui para sua função) denominado heme, o qual é ligado às proteínas, como a hemoglobina (NELSON; COX, 2014). Nesse sentido, a interação

de um ligante pode afetar a estrutura terciária das proteínas, levando a mudanças conformacionais e conseqüentemente redução de suas funções, como a capacidade de ligação a oxigênio no caso da hemoglobina. Uma vez estabelecido que ocorrem alterações estruturais na hemoglobina nativa na presença do TH, buscou-se avaliar se essas mudanças podem provocar algum efeito na captação de oxigênio pela hemoglobina.

Para isso, realizou-se um estudo empregando tanto a hemoglobina comercial (sistema 1) quanto eritrócitos humanos (sistema 2), na presença e ausência de incrementos crescentes de timerosal, os resultados obtidos estão mostrados na Figura 21.

**Figura 21 – a) Capacidade de ligação a oxigênio empregando hemoglobina humana (Hb) e, b) eritrócitos humanos (Eri) na ausência e presença de diferentes proporções ou concentrações de timerosal ( $n = 3$ ). Gráfico interno: Representa os traçados do oxígrafo referente a concentração de oxigênio dos sistemas avaliados.**



Fonte: realizado em colaboração com o Laboratório de Bioenergética “Anibal Vercesi” (LABID-UFAL), 2020.

Esses ensaios demonstraram claramente que existe uma influência dose-dependente da presença do TH. De acordo com a Figura 21a, verifica-se que a inibição chega até 72%, quando comparamos com o traçado controle. Essa redução da funcionalidade intrínseca da Hb está relacionada as alterações conformacionais devido a interação/reação do TH com a proteína, tal como a redução da planaridade do anel porfirínico evidenciada pelo ensaio de dicroísmo circular ou a reações com grupos tiol livres (Ghosh et al., 2016; Santos et al., 2018).

Além disso, alterações na funcionalidade da Hb para o transporte de O<sub>2</sub> na presença de TH foram investigadas em eritrócitos humanos. Vale ressaltar que, mesmo na ausência de um agente permeabilizante, o TH foi capaz de atravessar a membrana eritrocitária e ligar-se a Hb. Essa hipótese foi confirmada, uma vez que um perfil semelhante foi obtido com relação ao efeito causado pelo TH na inibição da ligação da Hb ao O<sub>2</sub> (Fig. 21b), inibindo em 50% a capacidade dos eritrócitos humanos de se ligarem ao oxigênio. Por fim, esses resultados

corroboram com os estudos de Rampersad et al. (2005) e Gibson et al. (2017), que indicam que o TH promove a morte celular por inativação de grupos tióis livres, enquanto se liga respectivamente às subunidades Hb dos eritrócitos e à anidrase carbônica.

#### **5.4 Conclusão**

A partir do conjunto de resultados obtidos neste trabalho, é possível inferir o potencial tóxico do timerosal frente aos sistemas que envolvem a hemoglobina como alvo biológico. Esta informação é baseada no fato de que o timerosal forma um complexo supramolecular com hemoglobina em uma razão estequiométrica de 2:1 (TH: Hb) devido à transferência de  $\text{EtHg}^+$  do TH para resíduos de Cys93 da hemoglobina. Assim, mudanças na estrutura da Hb foram observadas com aumento no conteúdo da  $\alpha$ -hélice e redução da planaridade do anel de porfirina, implicando numa redução na capacidade de ligação a  $\text{O}_2$  tanto para a hemoglobina quanto para os eritrócitos. Por fim, observou-se um aumento no processo de glicação da Hb e formação de amilóide, o que pode contribuir para o desenvolvimento de distúrbios conformacionais das proteínas e efeitos nocivos à saúde humana.

## REFERÊNCIAS

- ABDELMAGID, S. A. et al. Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. **PLOS ONE**, Canadá, v. 10, p. 1-16, Fev., 2015.
- AJMAL, M. R. et al. Interaction of anticancer drug clofarabine with human serum albumin and human  $\alpha$ -1 acid glycoprotein. Spectroscopic and molecular docking approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, India, v. 135, p. 106-115, Fev., 2017.
- AJMAL, M. R. et al. Interaction of new kinase inhibitors cabozantinib and tofacitinib with human serum alpha-1 acid glycoprotein. A comprehensive spectroscopic and molecular Docking approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, India, v. 159, p. 199-208, Abr., 2016.
- ALMEIDA, I. T. et al. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. **Clinical Nutrition**, Portugal, v. 21, p. 219-233, Jun., 2002.
- BAGHERI, M.; FATEMI, M. H. Fluorescence spectroscopy, molecular docking and molecular dynamic simulation studies of HSA-Aflatoxin B1 and G1 interactions. **Journal of Luminescence**, Irã, v. 202, p. 345-353, Out., 2018.
- BASKIN, D.S. et al. Thimerosal induces DNA breaks, caspase-3 activation, membrane damage, and cell death in cultured human neurons and fibroblasts. **Toxicology Science**, Estados Unidos, v. 74, p. 361–368, Jul., 2003.
- BASU, A.; KUMAR, G. S. Multispectroscopic and calorimetric studies on the binding of the food colorant tartrazine with human hemoglobin. **Journal of Hazardous Materials**, India, v. 318, p. 468-476, Nov., 2016.
- BISHOP, M. L.; FODEY, E. P.; SCHOEFF, L. E. **Clinical Chemistry: principles , procedures, correlations**. 5 ed. Filadélfia: Lippincott Williams e Wilkins, 2005.
- BOJKO, B. et al. The influence of dietary habits and pathological conditions on the binding of theophylline to serum albumin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Polônia, v. 52, p. 384-390, Jul., 2010.
- BORTOLOTTI, A. et al. On the purported “backbone fluorescence” in protein three-dimensional fluorescence spectra. **RSC Advances**, Itália, v. 6, p. 112870-112876, Nov., 2016.
- BROWN, L. e YEL, L. Thimerosal Induces Programmed Cell Death of Neuronal Cells via Changes in the Mitochondrial Environment. **The UCI Undergraduate Research Journal**. Jun., 2003.
- CAMPBELL, A. Thimerosal. **Encyclopedia of Toxicology**, Estados Unidos, v. 4, p. 546-548, 2014.
- CAO, X.-Y. et al. Spectroscopic and molecular modeling studies on the interactions of fluoranthene with bovine hemoglobin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 203, p. 301-307, Mai., 2018.
- CATTONI, D. I.; KAUFMAN, S. B.; FLECHA, F. L. G. Kinetics and thermodynamics of the interaction of 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate with proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Argentina, v. 1794, p. 1700-1708, Ago., 2009.
- CHEN, X. et al. Altered antigenicity and immunogenicity of human papillomavirus virus-like particles in the presence of thimerosal. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. China, v.141, p. 221–231, Mai., 2019.

- CHUNMEI, D. et al. Study of the interaction between mercury (II) and bovine serum albumin by spectroscopic methods. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, China, v. 37, p. 870-877, Fev., 2014.
- DANTAS, M. D. A. et al. Interactions of tetracyclines with ovalbumin, the main allergen protein from egg white: spectroscopic and electrophoretic studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, Brasil, v. 102, p. 505-514, Set., 2017.
- DAS, S. et al. Highly functionalized piperidines: Free radical scavenging, anticancer activity, DNA interaction and correlation with biological activity. **Journal of Advanced Research**, Brasil, v. 9, p. 51-61, Jan., 2018.
- DÓREA, J.G. Speciation of methyl- and ethyl-mercury in hair of breastfed infants acutely exposed to thimerosal-containing vaccines. **Clinica Chimica Acta**. Brasil, v. 412, Mai., p.1563–1566, 2011.
- DÓREA, J. G. Low-dose Thimerosal (ethyl-mercury) is still used in infants` vaccines: Should we be concerned with this form of exposure? **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Brasil, v. 49, p. 134-139, Abr., 2018.
- ELFERINK, J. G. R.; KOSTER, B. M. The Effect of Thimerosal on Neutrophil Migration: a comparison with the effect on calcium mobilization and CD11B expression. **Biochemical Pharmacology**, Leiden, v. 55, p. 305-312, Fev., 1998.
- FARD, F. J. et al. Synthesis, characterization and interaction of N,N'-dipyridoxyl(1,4-butanediamine) Co(III) salen complex with DNA and HAS. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Irã, v. 97, p. 74-82, Jun., 2012.
- FARRELL, A. P. Cellular Composition of the Blood. **Encyclopedia of Fish Physiology**, Canadá: Academic Press, p. 984-991, 2011.
- FERRELL JR, J. E. Q&A: Cooperativity. **Journal of Biology**, Estados Unidos, v. 8, p. 53.1-53.6, Jun., 2009.
- GEIER, D. A. Thimerosal: Clinical, epidemiologic and biochemical studies. **Clinica Chimica Acta**, Estados Unidos, v. 444, p. 212-220, Abr., 2015.
- GERICKE, M.; DROOGMANS, G.; NILIUS, B. Thimerosal induced changes of intracellular calcium in human endothelial cells. **Cell Calcium**, Bélgica, v. 14, p. 201-207, Mar., 1993.
- GHOSH, A. et al. Interaction of p-benzoquinone with hemoglobin in smoker`s blood causes alteration of structure and loss of oxygen binding capacity. **Toxicology Reports**, India, v. 3, p. 295-305, Fev., 2016.
- GIBSON, M. A. et al. Remarkable differences in the biochemical fate of Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> and thimerosal in red blood cell lysate. **Metallomics**, Canadá, v. 9, p. 1060-1072, Jul., 2017.
- GLASER, C.; DEMMELMAIR, H.; KOLETZKO, B. High-throughput analysis of total plasma fatty acid composition with direct in situ transesterification. **PLOS ONE**, Alemanha, v. 5, p. 1-6, Ago., 2010.
- GUAN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y. New insight into the binding interaction of hydroxylated carbon nanotubes with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 124, p. 556-563, Jan., 2014.

- HAJBA, L.; GUTTMAN, A. Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins. **Trends in Analytical Chemistry**, Hungria, v. 90, p. 38-44, Mar., 2017.
- HE, W. et al. Investigation of the interaction between five alkaloids and human hemoglobin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 123, p. 176-186, Abr., 2014.
- HUMPHREY, M. et al. Mitochondrial Mediated Thimerosal-Induced Apoptosis in a Human Neuroblastoma Cell Line (SK-N-SH). **NeuroToxicology**, v. 26, p. 407-416, Mai., 2005.
- IDA-ETO, A. Prenatal exposure to organomercury, thimerosal, persistently impairs the serotonergic and dopaminergic systems in the rat brain: Implications for association with developmental disorders. **Brain and Development**, Japão, v. 35, p. 261–264, Mai., 2013.
- JAMES, S.J. et al. Thimerosal Neurotoxicity is Associated with Glutathione Depletion: Protection with Glutathione Precursors. **NeuroToxicology**, Estados Unidos, v. 26, p. 1-8, Set., 2005.
- JANZEN, R. et al. Adduct formation of Thimerosal with human and rat hemoglobin: a study using liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry (LC/ESI-TOF-MS). **Metallomics**, Alemanha, v. 3, p. 847-852, Mai., 2011.
- JIN, Y. et al. Thimerosal decreases TRPV1 activity by oxidation of extracellular sulfhydryl residues. **Neuroscience Letters**, v. 369, p. 250–255, Fev., 2004.
- KAN, H.-I. et al. Subunit Disassembly Pathway of Human Hemoglobin Revealing the Site-Specific Role of Its Cysteine Residues. **The Journal of Physical Chemistry B**, China, v. 117, p. 9831-9839, Ago., 2013.
- KAZEMI, F.; DIVSALARB, A.; SABOURYA, A. A. Structural analysis of the interaction between free, glycated and fructated hemoglobin with propolis nanoparticles: A spectroscopic study. **International Journal of Biological Macromolecules**, Irã, v. 109, p. 1329-1337, Abr., 2018.
- KHAN, A. Y.; KUMAR, G. S. Probing the binding of anticancer drug topotecan with human hemoglobin: Structural and thermodynamic studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, India, v. 163, p. 185-193, Out., 2016.
- LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3.ed. Baltimore: Springer, 2006.
- LAUDATI, G. et al. Resveratrol treatment reduces the vulnerability of SH-SY5Y cells and cortical neurons overexpressing SOD1-G93A to Thimerosal toxicity through SIRT1/DREAM/PDYN pathway. **NeuroToxicology**, Itália, v. 71, p. 6–15, Nov., 2019.
- LEI, Z.; CHEN, X. D.; MERCADÉ-PRIETO, R. Effect of N-Ethylmaleimide as a Blocker of Disulfide Crosslinks Formation on the Alkali-Cold Gelation of Whey Proteins. **PLOS ONE**, China, v. 12, p. 1-18, Out., 2016.
- LI, H. et al. Studies of the interaction between FNC and human hemoglobin: A spectroscopic analysis and molecular docking. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 136, p. 416-422, Fev., 2015.
- LI, W.-X. Thimerosal-Induced Apoptosis in Mouse C2C12 Myoblast Cells Occurs through Suppression of the PI3K/Akt/Survivin Pathway. **PLoS ONE**, China, v. 7, p. e49064, Nov., 2012.

- LIU, B.-S. et al. Spectroscopic Studies on the Interaction of Synthetic Food Colorants with Bovine Serum Albumin. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, China, v. 225, p. 455-468, Jan., 2011.
- LLOYD, J. B. F. Synchronized excitation of fluorescence emission spectra. **Nature Physical Science**, Inglaterra, v. 231, p. 64-65, Mai., 1971.
- LOHREN, H. Toxicity of organic and inorganic mercury species in differentiated human neurons and human astrocytes. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 32, p. 200-208, Mai., 2015.
- LORBER, B. et al. Protein Analysis by Dynamic Light Scattering: Methods and Techniques for Students. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 40, p. 372-382, Jul., 2012.
- MAKARSKA-BIALOKOZ, M. Analysis of the binding interaction in uric acid – Human hemoglobin system by spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Polônia, v. 178, p. 47-54, Mai., 2017.
- MAKARSKA-BIALOKOZ, M. Comparative study of binding interactions between porphyrin systems and aromatic compounds of biological importance by multiple spectroscopic techniques: A review. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Polônia, v. 200, p. 263-274, Abr., 2018.
- MANASCERO-GÓMEZ, A. R. et al. Influence of blood donation time intervals on ferritin and hemoglobin concentration. **Transfusion and Apheresis Science**, Colômbia, v. 53, p. 213-219, Mar., 2015.
- MAURYA, N. et al. Interaction of promethazine and adifenine to human hemoglobin: A comparative spectroscopic and computational analysis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, India, v. 199, p. 32-42, Jun., 2018.
- MIGDAL, L. et al. Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling. **Toxicology**, França, v. 274, p. 1–9, Mai., 2010.
- MÖLLER, C. et al. Proteomic Analysis of Thiol Modifications and Assessment of Structural Changes in Hemoglobin Induced by the Aniline Metabolites N-Phenylhydroxylamine and Nitrosobenzene. **Scientific Reports**, Estados Unidos, v. 7, p. 14794-14810, Nov., 2017.
- MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. 5 ed. Porto Alegre: Medbook, 2009.
- MU, H. et al. Stereoselective interactions of lactic acid enantiomers with HSA: Spectroscopy and docking application. **Food Chemistry**, China, v. 270, p. 429-435, Jul., 2018.
- NAMVARPOUR, Z. et al. Protective role of alpha-lipoic acid in impairments of social and stereotyped behaviors induced by early postnatal administration of thimerosal in male rat. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 67, p. 1–9, Fev., 2018.
- NAVEENRAJ, S.; RAJ, M. R.; ANANDAN, S. Binding interaction between serum albumins and perylene-3,4,9,10-tetracarboxylate - A spectroscopic investigation. **Dyes and Pigments**, India, v. 94, p. 330-337, Fev., 2012.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5.ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

PARKS, J. M.; SMITH, J. C. Modeling Mercury in Proteins. **Methods in Enzymology**, Estados Unidos, v. 578, p. 103-122, 2016.

PARRAN, D.K. Effects of Thimerosal on NGF Signal Transduction and Cell Death in Neuroblastoma Cells. **Toxicological Sciences**. Minas Gerais, v. 86, p. 132–140, Abr., 2005.

PENG, B. et al. Thimerosal induces skin pseudo-allergic reaction via Mas-related G-protein coupled receptor B2. **Journal of Dermatological Science**, China, v. 95, p. 99-106, Mai., 2019.

RABENSTEIN, D.L. et al. <sup>1</sup>H-NMR study of the removal of methylmercury from intact erythrocytes by sulfhydryl compounds. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Canadá, v. 28, p. 279–287, 1986.

RABENSTEIN, D.L. et al. A proton nuclear magnetic resonance study of the binding of methylmercury in human erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, Canadá, v. 720, p. 53–64, 1982.

RALSTON, N. V. C.; RAYMOND, L. J. Mercury's neurotoxicity is characterized by its disruption of selenium biochemistry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Estados Unidos, v. 1862, p. 2405-2416, Nov., 2018.

RAMOS, A. et al. Methyl and Ethylmercury elicit oxidative stress and unbalance the antioxidant system in *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemico-Biological Interactions**, Brasil, p. 108867, Jan., 2019.

RODRIGUES, J. et al. Toxicological effects of thiomersal and ethylmercury: Inhibition of the thioredoxin system and NADP<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases of the pentose phosphate pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 286, p. 216–223, 2015.

SANTOS, J. C. N. Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA). **International Journal of Biological Macromolecules**, Brasil, v. 113, p. 1032-1040, Fev., 2018.

SHANMUGARAJ, K.; ANANDAKUMAR, S.; ILANCHELIAN, M. Unraveling the binding interaction of Toluidine blue O with bovine hemoglobin – a multispectroscopic and molecular modeling approach. **RSC Advances**, India, v. 5, p. 3930-39-40, Dez., 2014.

SHEN, Y. et al. Study of Interaction of Mercuric Chloride with Bovine Serum Albumin by Multi-Spectroscopic Method. **Asian Journal Chemistry**, China, v. 25, Abr., p. 5925–5929, 2013.

SHIRI, F. et al. Multispectroscopic and molecular modeling studies on the interaction of copper-ibuprofenate complex with bovine serum albumin (BSA). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Irã, v. 203, p. 510-521, Out., 2018.

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

SNEHARANI, A. H. Curcumin as a Tool to Assess the Surface Hydrophobicity of Proteins. **Spectroscopy Letters**, India, v. 49, p. 568-572, Ago., 2016.

SONG, J. et al. Inhibitory action of thimerosal, a sulfhydryl oxidant, on sodium channels in rat sensory neurons. **Brain Research**, v. 864, p. 105–113, Fev., 2000.

SOUZA, V.C.O. et al. A brain proteome profile in rats exposed to methylmercury or thimerosal (ethylmercury). **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 79, p. 502–512, 2016.

SPAHIS, S. et al. Plasma fatty acid composition in French-canadian children with non-alcoholic fatty liver disease: Effect of n-3 PUFA supplementation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, França, v. 99, p. 25-34, Abr., 2005.

STROHMIDEL, P. et al. Investigations on the binding of ethylmercury from thiomersal to proteins in influenza vaccines. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 100–104, 2018.

TIAN, L. F. et al. Spectroscopic study on the interaction between  $[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$  and hemoglobin. **Chinese Chemical Letters**, China, v. 23, p. 1283-1286, Out., 2012.

TRNKOVÁ, L. et al. Study on the interaction of catechins with human serum albumin using spectroscopic and electrophoretic techniques. **Journal of Molecular Structure**, República Checa, v. 985, p. 243-250, Jan., 2011.

TRÜMPLER, S. et al. In vitro study of thimerosal reactions in human whole blood and plasma surrogate samples. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Alemanha, v. 28, p. 125-130, Jan., 2014.

TRÜMPLER, S. et al. Interaction of thimerosal with proteins-ethylmercury adduct formation of human serum albumin and  $\beta$ -lactoglobulin A. **Metallomics**, Alemanha, v. 1, p. 87-91, Jan., 2009.

UEHA-ISHIBASHI, T. Property of thimerosal-induced decrease in cellular content of glutathione in rat thymocytes: a flow cytometric study with 5-chloromethylfluorescein diacetate. **Toxicology in Vitro**, Japão, v. 18, p. 563–569, Jan., 2004.

ULATOWSKI, F. et al. Recognizing the limited applicability of Job plots in studying host-guest interactions in supramolecular chemistry. **Journal of Organic Chemistry**, Polônia, v. 81, p. 1746-1756, Fev., 2016.

WHO | World Health Organization, (n.d.). <https://www.who.int/> (acesso em 13 de outubro de 2019).

WYREMBEK, K. et al. Intermingled modulatory and neurotoxic effects of thimerosal and mercuric ions on electrophysiological responses to GABA and NMDA in hippocampal neurons. **Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society**. v. 61, p. 753–758, Jun., 2010.

YAN, X. et al. Interaction of Cefpiramide sodium with bovine hemoglobin and effect of the coexistent metal ion on the protein-drug association. **Journal of Luminescence**, China, v. 142, p. 155-162, Abr., 2013.

YOSHIDA, S. et al. The organic mercury compounds, methylmercury and ethylmercury, inhibited ciliary movement of ventricular ependymal cells in the mouse brain around the concentrations reported for human poisoning. **NeuroToxicology**, v. 57, p. 69–74, Jun., 2016.

ZIMMERMANN, L.T. et al. Comparative study on methyl- and ethylmercury-induced toxicity in C6 glioma cells and the potential role of LAT-1 in mediating mercurial-thiol complexes uptake. **NeuroToxicology**, v. 38, p. 1–8, 2013.

---

# Seção 6

## Conclusão Geral e perspectivas

---

## 6.1 Conclusão Geral

O presente trabalho possibilitou avaliar a interação de forma quantitativa de duas classes de compostos sintéticos com o ctDNA, e do timerosal com a hemoglobina, visando propor o possível mecanismo de ação dessas moléculas. Dessa forma, em relação à avaliação da interação entre os compostos bioativos e as macromoléculas, as técnicas espectroscópicas utilizadas, bem como estudos por *docking* molecular, eletroforese, viscosidade, mostraram-se eficientes, uma vez que permitiram determinar as constantes, modo de ligação, estequiometria, parâmetros termodinâmicos e energia de ligação quanto aos complexos supramoleculares formados.

## 6.2 Perspectivas

- i) Avaliar a interação de outras classes de compostos com o ctDNA a partir de colaborações;
- ii) Avaliar a interação desses compostos frente a um DNA que sofreu mutação objetivando verificar como este processo afeta o a capacidade de interação, uma vez que uma célula neoplásica, por exemplo, possui seu DNA modificado por agentes endógenos e exógenos;
- iii) Determinar o mecanismo de glicação do processo Hb-TH;
- iv) Entender como o timerosal consegue atravessar a membrana e quais seus efeitos em sistemas mais complexos.