



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**LICENCIATURA PLENA EM QUÍMICA**

**HITALA NICOLE LIMA DOS SANTOS**

**Interações de drogas com DNA  
monitoradas por espectrometria UV-Vis**

**RECIFE**

**2019**

# **HITALA NICOLE LIMA DOS SANTOS**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco como pré-requisito para a obtenção do título de licenciada em Química.  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira.

**RECIFE**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S237i Santos, Hitala Nicole Lima dos.  
Interações de drogas com DNA monitoradas por espectrometria  
UV-Vis / Hitala Nicole Lima dos Santos. – Recife, 2019.  
53 f.: il.

Orientador(a): Severino Carlos Bezerra de Oliveira.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Recife,  
BR-PE, 2019.

Inclui referências.

1. Antineoplásicos 2. DNA 3. Brometo de etídio  
4. Interações Drogas-DNA 4. Espectrometria UV-Vis I. Oliveira,  
Severino Carlos bezerra de, orient. II. Título

CDD 540

# **HITALA NICOLE LIMA DOS SANTOS**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco como pré-requisito para a obtenção do título de Licenciado em Química.

Aprovada em \_\_\_\_\_

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira – DQ-UFRPE

Orientador

---

Prof. Dr. André Augusto Pimentel Liesen Nascimento

Primeiro examinador

---

Prof. Dr. Márcio Vilar França Lima

Segundo examinador

**Recife**

**2019**

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Lenise e Jocely.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por mais uma etapa concluída da minha vida, pela força, todas as bênçãos concedidas e conquistas alcançadas.

Aos meus pais Lenise e Jocely pelo incentivo, investimento e apoio incondicional. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu irmão Junior por todas as caronas, passeios, shows da Retrieve, momentos engraçados e maratonas de séries e filmes. Em meio a vida acadêmica, esses momentos foram muito importantes pra mim.

Ao meu irmão Harleyton (*in memorian*), por estar sempre ao meu lado e manter um sorriso em meu rosto. Te sinto perto todo o tempo, seu amor e carinho permanecem presentes. Você fez parte dessa conquista.

Aos meus familiares que contribuíram durante esta etapa da minha vida, em especial a minha avó Maria do Carmo.

Aos meus amigos Jaisa, Thierry, Rafaela e Jéssica por estarem comigo em todos os momentos, me apoiando e incentivando meus sonhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira pela paciência e ensinamentos que contribuíram de forma significativa para meu conhecimento durante toda pesquisa e elaboração deste trabalho.

Ao meu Co-orientador durante o meu período de iniciação científica, Prof. Dr. Valberes Bernardo do Nascimento, por todos os ensinamentos que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao grupo de Eletroanalítica e Bioeletroquímica da UFRPE, Maysa, Natália, José, Gabriel, Raphael, Carlos, Alex e Thayane por todos os momentos de aprendizado, trabalho em equipe e construção do conhecimento em conjunto nas dificuldades encontradas.

A todos do laboratório de Análise Química, Inorgânica e Sensores (LAQIS) em especial Mirella, Rômulo, Arthur, Reobe, Gabrielly, Nattany, Lidiane, Amanda, Helena, Carol, Danielle e Renê por todos os momentos compartilhados e auxílio nas dúvidas no laboratório.

Aos meus colegas de classe Mikelane, Karol, Suzi, Humberto, Andreza, Maria e em especial aos baiacus transplantados Maysa, Matheus, Mirella, Rômulo e Thaynan, por todos os abraços em grupo, rodízios no Macunaíma, idas para à casa de Thaynan e incontáveis momentos engraçados, especiais e inesquecíveis.

Ao CNPq e à FACEPE pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

O crescimento desordenado de células alteradas que invadem tecidos e até órgãos, causando o aparecimento de inúmeras doenças, é conhecido como câncer. Essas doenças são desenvolvidas como consequência da influência dos agentes endógenos e exógenos, que causam alterações na sequência dos genes do ácido desoxirribonucleico (DNA). Um dos principais meios de tratamento do câncer é a quimioterapia, que utiliza antineoplásicos para atuar na destruição das células neoplásicas. A interação desses fármacos e de espécies endógenas ou exógenas com o DNA causam danos irreversíveis para a molécula do DNA pela modificação de sua estrutura. É, portanto, muito importante o estudo do mecanismo dessas interações para elucidar o comportamento das drogas e seus efeitos tóxicos e quimioterápicos. Inúmeros métodos de análise de alta seletividade e sensibilidade são empregados com a finalidade de investigar as reações envolvidas nas interações de inúmeras espécies químicas com o DNA, com destaque para métodos baseados em espectrometria UV-Vis. Esta monografia contempla uma parte teórica e uma parte experimental voltada para este tema de interações de espécies químicas com a molécula do DNA. A parte teórica apresenta uma revisão bibliográfica sobre os modos de interação de diversas espécies com o DNA e identificação de ocorrência de danos na molécula do DNA utilizando a espectrometria UV-Vis, além de discutir a estrutura, propriedades e funções do DNA. A parte experimental apresenta uma investigação da interação do brometo de etídio (BE) com o DNA de hélice dupla (dsDNA) por espectrometria UV-Vis. Os resultados mostram claramente que a interação BE-dsDNA acarreta uma significativa mudança no espectro UV-Vis do BE, caracterizada pelo hipocromismo (diminuição de absorbância) e batocromismo (deslocamento da banda para maiores comprimentos de onda). Tal comportamento está de acordo com a formação de um complexo estável entre o BE e o dsDNA via intercalação da molécula do BE na dupla hélice do dsDNA.

**Palavras-chave:** Antineoplásicos, DNA, Brometo de Etídio, Interações Drogas-DNA  
Espectrometria UV-Vis

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Estrutura da desoxirribose e ribose.....</b>	20
<b>Figura 2: Estruturas das bases púricas e pirimídicas.....</b>	21
<b>Figura 3: Estruturas de nucleosídeos purínicos e pirimidínicos.....</b>	21
<b>Figura 4: Ligações fosfodiéster entre nucleotídeos.....</b>	22
<b>Figura 5: Estrutura secundária do DNA (OLIVEIRA, 2010). .....</b>	23
<b>Figura 6: Pareamento de bases. Ligações de hidrogênio entre os pares de bases adenina-timina e guanina-citosina. As ligações de hidrogênio são mostradas com linhas tracejadas.....</b>	24
<b>Figura 7: Estruturas de A-DNA, B-DNA e Z-DNA (LEHNINGER, 2014). ....</b>	25
<b>Figura 8: Replicação da molécula do DNA (LEHNINGER, 2014). ....</b>	26
<b>Figura 9: Cisplatina ligado no modo covalente ao DNA na posição N7 da guanina.....</b>	28
<b>Figura 10: Modelo genérico de intercalação de compostos heterocíclicos aromáticos com a molécula de dsDNA (SILVA, 2016). ....</b>	29
<b>Figura 11: Intercaladores orgânicos comercializados para o tratamento quimioterápico.....</b>	30
<b>Figura 12: Estrutura molecular do brometo de etídio. ....</b>	31
<b>Figura 13: Intercalação do brometo de etídio entre as bases do DNA (BARRA, 2015). ....</b>	31
<b>Figura 14: Moléculas que interagem preferencialmente nos sulcos dupla hélice do DNA.....</b>	33
<b>Figura 15: Molécula da procarbazina interagindo no sulco menor do DNA (ANWER, 2016). ....</b>	34
<b>Figura 16: Espectro da radiação eletromagnética.....</b>	35
<b>Figura 17:Componentes do espectrofotômetro (SKOOG, 2006). ....</b>	38
<b>Figura 18: Atenuação de um feixe de radiação após a interação com a espécie absorvente (SKOOG, 2006). ....</b>	38
<b>Figura 19: (A) Solução do BE 100 <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math> em tampão fosfato pH = 7.0 e (B) Espectros de absorção do BE em tampão fosfato, pH = 7,0, em 10, 25, 50 e 100 <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>. ....</b>	42
<b>Figura 20: Curva analítica do BE em concentrações de 10, 25, 50 e 100 <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math> por espectrometria. <math>\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}</math>. ....</b>	43
<b>Figura 21: Espectros de absorção do dsDNA em tampão fosfato, pH = 7,0, em 10, 50 e 100 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>. ....</b>	44
<b>Figura 22: Curva analítica (Absorbância vs. [dsDNA]) em concentrações de 10, 50 e 100 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>. ....</b>	45
<b>Figura 23: Espectros de absorção do BE em 25 <math>\mu\text{mol mL}^{-1}</math> (—) e misturas do BE 25 <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math> com dsDNA em diferentes concentrações (—) 12 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>, (—) 24 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>, (—) 36 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math> e (—) 48 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>. ....</b>	46
<b>Figura 24: Espectros de absorção do BE em 50 <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math> (—) e misturas do BE 50 <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math> com o dsDNA em diferentes concentrações (—) 12 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>, (—) 24 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>, (—) 36 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math> e (—) 48 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>. ....</b>	46

**Figura 25: Espectros de absorção do BE 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (—) e misturas do BE 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com dsDNA (—) 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , (—) 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , (—) 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e (—) 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , (—) 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e (—) 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ..... 47**

**Figura 26: Solução de BE 100  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  (A) e sua mistura com uma solução de dsDNA 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B) em tampão fosfato, pH = 7,0..... 48**

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1: Exemplos de interações do DNA com pequenas moléculas (antineoplásicos e/ou carcinógenos).....</b>	<b>25</b>
<b>Tabela 2: Cor absorvida e observada no espectro eletromagnético. ....</b>	<b>34</b>
<b>Tabela 3: Características de absorção de alguns cromóforos orgânicos comuns.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabela 4: Estudos de espécies e suas interações com o DNA utilizando espectrometria UV-Vis .....</b>	<b>38</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

A - Adenina

AT - Adenina – Timina

BE - Brometo de Etídio

C - Citosina

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dsDNA - DNA de hélice dupla

DPV - voltametria de pulso diferencial

G - Guanina

GC - Guanina - Citosina

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

AFM - Microscopia de Força Atômica

RMN - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

RNA - Ácido Ribonucleico

STM - Microscopia de varredura por tunelamento

T - Timina

U - Uracila

UV-Vis - Ultravioleta – Visível

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivo Específico.....	16
3 METODOLOGIA .....	17
3.1 Parte Teórica (revisão bibliográfica) .....	17
3.1.1 Seleção de Artigos e Livros .....	17
3.1.2 Aprofundamento científico .....	17
3.1.3 Análise Crítica.....	17
3.2 Parte experimental .....	17
3.2.1 Materiais e metodologia.....	17
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
4.1 REVISÃO DA LITERATURA .....	19
4.1.1 DNA: Estrutura, Propriedades e Funções.....	19
4.1.1.1 Estrutura Primária do DNA.....	19
4.1.1.2 Estrutura Secundária do DNA: A Dupla Hélice .....	22
4.1.1.3 Funções Biológicas do DNA.....	25
4.1.1.4 Desnaturação do DNA .....	26
4.1.2 Modos de interação de pequenas moléculas com o DNA .....	27
4.1.2.1 Modo de ligação covalente.....	28
4.1.2.2 Modo não-covalente de ligação .....	28
4.1.2.2.1 Intercalação .....	29
4.1.2.2.2 Brometo de Etídio .....	30
4.1.2.2.3 Ligação no sulco menor .....	32
4.1.2.3 Ligação Externa (eletrostática).....	34
4.1.3 Técnicas usadas no estudo da interação do DNA com agentes carcinogênicos e antineoplásicos .....	34
4.1.3.1 Espectrometria de absorção molecular no ultravioleta e visível .....	35
4.1.3.1.1 O Espectrofotômetro .....	37
4.1.3.2 Interações ligante-DNA por espectrometria UV-Vis.....	39
4.2 PARTE EXPERIMENTAL .....	41

4.2.1 Estudo da interação do brometo de etídio com o dsDNA utilizando espectrometria UV-Vis .....	42
5 CONCLUSÃO .....	48
6 REFERÊNCIAS .....	50

## 1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome geral atribuído a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum a neoplasia maligna, ou seja, o crescimento desordenado de células alteradas. Agentes carcinogênicos reagem com o ácido desoxirribonucleico (DNA) e provocam o início dessa desordem celular. A iniciação ocorre não apenas com a modificação da estrutura do DNA, mas também pela replicação e proliferação celular, dessa forma, a mutação inicial permanece (BERNSTEIN et. al, 2002). Estudos recentes têm demonstrado uma correlação entre tumores e danos oxidativos no DNA. Nos tecidos de alguns tipos de câncer, como no câncer de pulmão, cólon, estômago, cérebro, mama e ovário foram detectadas concentrações significativas de vários produtos resultantes de danos oxidativos no DNA (MALINS et. al, 1996).

O dano no DNA pode levar a modificações em sua estrutura e assim causar mudanças na replicação celular (WATSON et. al, 2009). A principal fonte de alterações mutagênicas do DNA é o dano oxidativo que acontece de forma espontânea por agentes exógenos (antineoplásicos ou carcinógenos) e processos endógenos como alterações enzimáticas (MALINS et. al, 1996; LEHNINGER, 2014). Espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, radicais superóxidos e radicais hidroxila, provenientes da irradiação e metabolismo aeróbio, podem causar danos ao DNA. Dentre essas espécies reativas a mais danosa para o DNA é o radical hidroxila. Apesar das células possuírem um mecanismo de defesa elaborado para destruir espécies reativas de oxigênio, uma fração desses oxidantes escapa e causa dano ao DNA por meio de um grupo complexo de reações, que variam de oxidação das bases a quebras na hélice (BARBOSA et. al, 2010).

Pequenas moléculas interagem com o DNA e modificam sua estrutura podendo inibir seu perfeito funcionamento, atuando como droga que auxiliam na cura ou controle de doenças. O DNA é o alvo farmacológico de muitas drogas que estão atualmente em uso clínico ou que estão em experimentações clínicas avançadas (HEPP & NONOHAY, 2016). O mecanismo de interação entre moléculas de drogas e DNA ainda é relativamente pouco conhecido, assim, é muito importante o estudo para compreensão do mecanismo de interação, bem como para elucidação do comportamento de novas drogas (HAJIAN et. al, 2009).

Vários métodos de análise com grande sensibilidade e seletividade têm sido elaborados para elucidar e caracterizar a natureza da interação entre antineoplásicos ou carcinógenos com o DNA. Os principais baseiam-se em Microscopia de Força Atômica (AFM), Espectrometria UV-Vis, Espectroscopia Raman, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia de massa, Espectroscopia de Dicroísmo Circular, Voltametria de Pulso Diferencial, Voltametria de Onda Quadrada, Voltametria Cíclica, Eletroforese, além de desnaturação térmica e medições de viscosidade (OLIVEIRA & BRETT, 2010). O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre os modos de interações de drogas com o DNA e seu monitoramento por espectrometria UV-Vis. A parte experimental consistiu na investigação da interação do agente intercalador brometo de etídio (BE) com o DNA por espectrometria de absorção molecular UV-Vis.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Apresentar uma revisão da literatura sobre modos de interação de agentes antineoplásicos com o DNA e seu monitoramento por espectrometria UV-Vis.

### **2.2 Objetivos Específicos**

*A partir de uma revisão bibliográfica discutir e elaborar um texto didático sobre:*

- A estrutura, conformação, propriedades e funções do DNA;
- A importância de elucidar os modos de interação de espécies químicas com o DNA.
- Os modos de interações de espécies químicas com o DNA e suas consequências.
- Fundamentos da espectrometria UV-Vis e sua aplicação em estudos sobre interações de drogas com o DNA;

*Realizar um estudo experimental sobre:*

- Monitoramento UV-Vis da interação do BE com o dsDNA.

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 Parte Teórica (revisão bibliográfica)**

#### **3.1.1 Seleção de artigos e livros**

A partir de um levantamento bibliográfico sobre o tema da pesquisa, foram selecionados artigos científicos e livros (nacionais e internacionais) para a fundamentação do trabalho, envolvendo temas como estrutura, conformação, propriedades e funções do DNA, mecanismos de interação do DNA com espécies carcinogênicas e antineoplásicos, espectrometria de absorção UV-Vis e suas aplicações.

#### **3.1.2 Aprofundamento científico**

Realizou-se um aprofundamento científico sobre o tema interações do DNA com espécies químicas utilizando espectrometria UV-Vis, tomando como base a literatura selecionada, analisando livros e artigos publicados em periódicos científicos (nacionais e internacionais).

#### **3.1.3 Análise crítica**

Esta etapa consistiu na análise crítica de todo o material selecionado, para a elaboração de uma revisão bibliográfica.

## **3.2 Parte experimental**

Para uma melhor compreensão e familiarização dos temas abordados na revisão bibliográfica proposta, o comportamento do DNA e do brometo de etídio, antes e após interação foi investigado utilizando espectrometria UV-Vis e todos os resultados foram comparados com a literatura.

### **3.2.1 Materiais e metodologia**

Todos os reagentes químicos utilizados foram da Sigma-Aldrich. Os reagentes foram dsDNA, proveniente do timo de vitela (*calfthymus*) tipo II (“altamente polimerizado” 62% de Na/13% de água e comprimento de 10,000-15,000 bp) e uma solução de BE 500 µg/mL (1,26 mmol L<sup>-1</sup>).

Uma solução mãe de dsDNA foi preparada utilizando água deionizada e sua concentração foi estabelecida por espectrometria UV considerando que 1u A<sub>260nm</sub> = 50 µg mL<sup>-1</sup> dsDNA.

Soluções de BE e de DNA de diferentes concentrações foram preparadas por diluições utilizando tampão fosfato (pH = 7.2).

Todas as análises foram feitas no espectrofotômetro Agilent 8453 UV-Visible Spectrophotometer, Califórnia, Estados Unidos. O controle dos parâmetros, a aquisição e tratamento dos dados, foram efetuados por intermédio do software UV-Visible ChemStation.

## **4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **4.1 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **4.1.1 DNA: Estrutura, Propriedades e Funções**

O DNA é uma macromolécula que constitui os genes e armazena a informação necessária para o desenvolvimento e funcionamento de todo o organismo. Primeiramente, em 1869, o DNA foi detectado em núcleos celulares por Friedrich e denominado de “nucleína” e não era considerado material genético. Já em 1940 o trabalho de Oswald T. Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty apresentou evidências que modificaram a concepção de que era somente um componente estrutural dos cromossomos. Neste trabalho, Avery e seus colegas extraíram o DNA de uma linhagem virulenta da bactéria *Streptococcus pneumoniae* e injetaram em outra bactéria do mesmo gênero de linhagem não virulenta. Este experimento acarretou na virulência da bactéria não virulenta e, a partir disso, concluiu-se que o DNA armazena informação genética. Em 1952, o estudo envolvendo bacteriófagos marcados com elementos radioativos, realizado por Alfred D. Hershey e Martha Chase, contribuiu para provar definitivamente que o ácido desoxirribonucleico contém informação genética (LEHNINGER, 2014; OLIVEIRA, 2010).

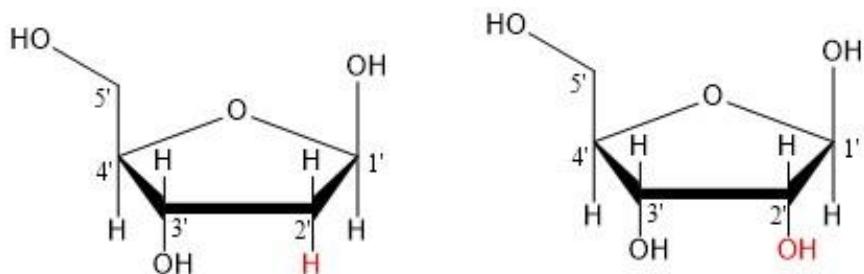
A estrutura secundária do DNA proposta, em 1953, por Watson e Crick, foi um marco histórico e importante para o desenvolvimento da biologia molecular. Assim, os estudos dos ácidos nucleicos avançaram consideravelmente com as evidências que conduziram a descoberta do material genético no DNA, possibilitando esclarecer inúmeros processos bioquímicos como replicação, transcrição e conservação celular (LEHNINGER, 2014).

##### **4.1.1.1 Estrutura Primária do DNA**

Os ácidos nucleicos são polímeros formados por monômeros de nucleotídeos. Um nucleotídeo consiste de três componentes unidos por ligações covalentes, uma base nitrogenada, um açúcar e o ácido fosfórico.

O açúcar presente no DNA é a desoxirribose, que apresenta dois hidrogênios em seu carbono 2'. Entretanto, no ácido ribonucleico (RNA) o açúcar é a ribose que

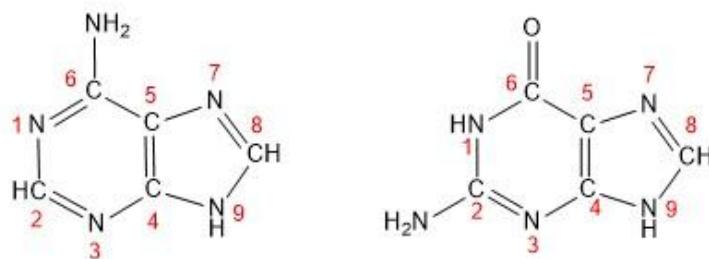
têm um grupo hidroxila e um hidrogênio na mesma posição, **Fig. 1** (OLIVEIRA, 2010).



**Figura 1: Estrutura da desoxirribose e ribose.**

As bases dos ácidos nucleicos são purínicas e pirimidínicas, **Fig. 2**. As bases purínicas comuns são a guanina (G) e adenina (A) que são compostos aromáticos de dois anéis, **Fig. 2**, enquanto as bases pirimidínicas comuns são citosina (C), timina (T) e uracila (U), **Fig. 2**, e são compostos aromáticos de um único anel. A guanina, adenina e citosina são encontradas tanto no DNA como no RNA, entretanto a timina é apenas encontrada na composição do DNA, enquanto que a uracila do RNA (LEHNINGER, 2014; CAMPBELL & FARRELL, 2007).

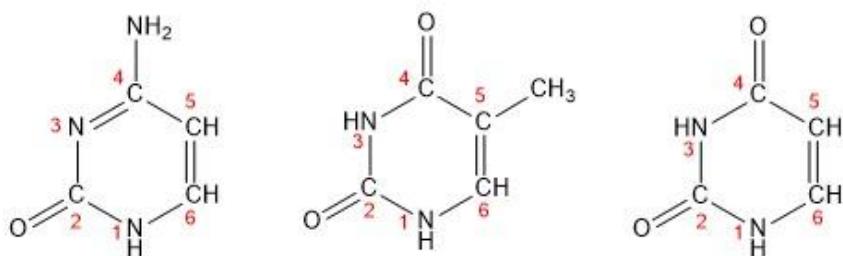
## Purinas



Adenina

Guanina

## Pirimidinas



Citosina

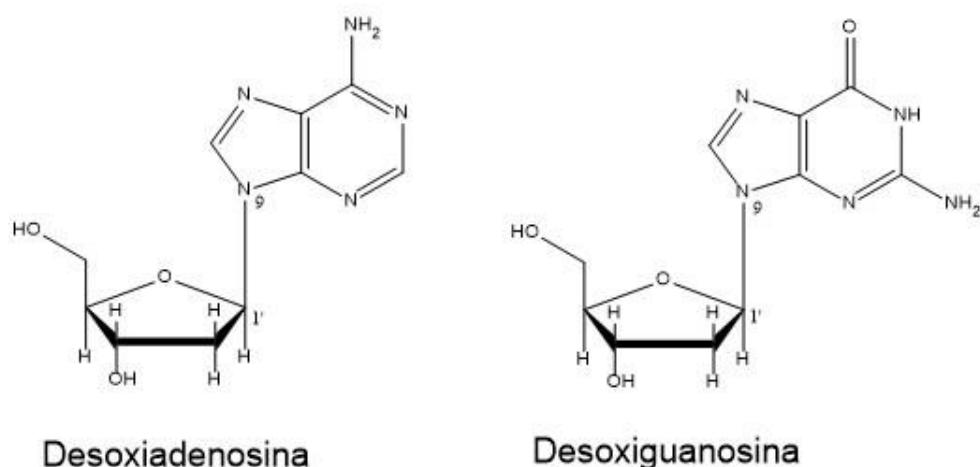
Timina

Uracila

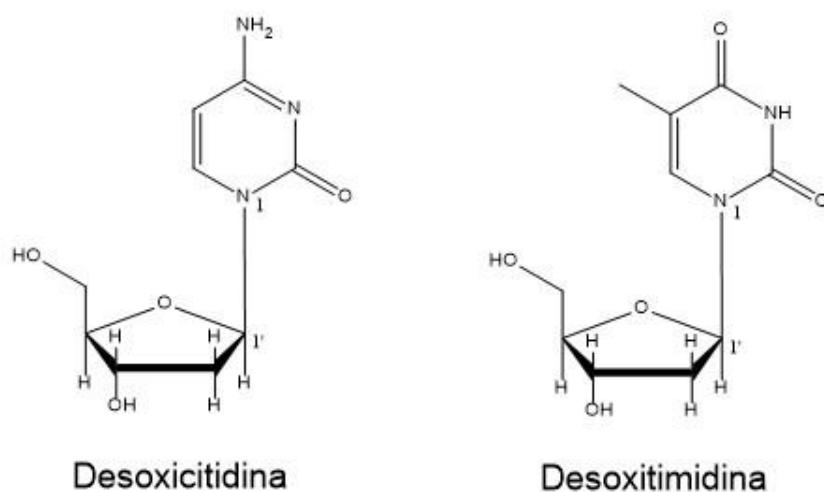
**Figura 2: Estruturas das bases púricas e pirimídicas.**

Um nucleosídeo é uma espécie que consiste de uma base púrica ou pirimídica ligada covalentemente ao açúcar correspondente de cada ácido nucleico. Nos nucleosídeos purínicos, o carbono 1' do açúcar liga-se ao nitrogênio 9 da base através de uma ligação covalente denominada de  $\beta$ -glicosídica. Já nos nucleosídeos pirimidínicos, a ligação ocorre entre o carbono 1' do açúcar e o nitrogênio 1 da base, **Fig. 3** (CAMPBELL & FARRELL, 2007).

### Nucleosídeos Purínicos

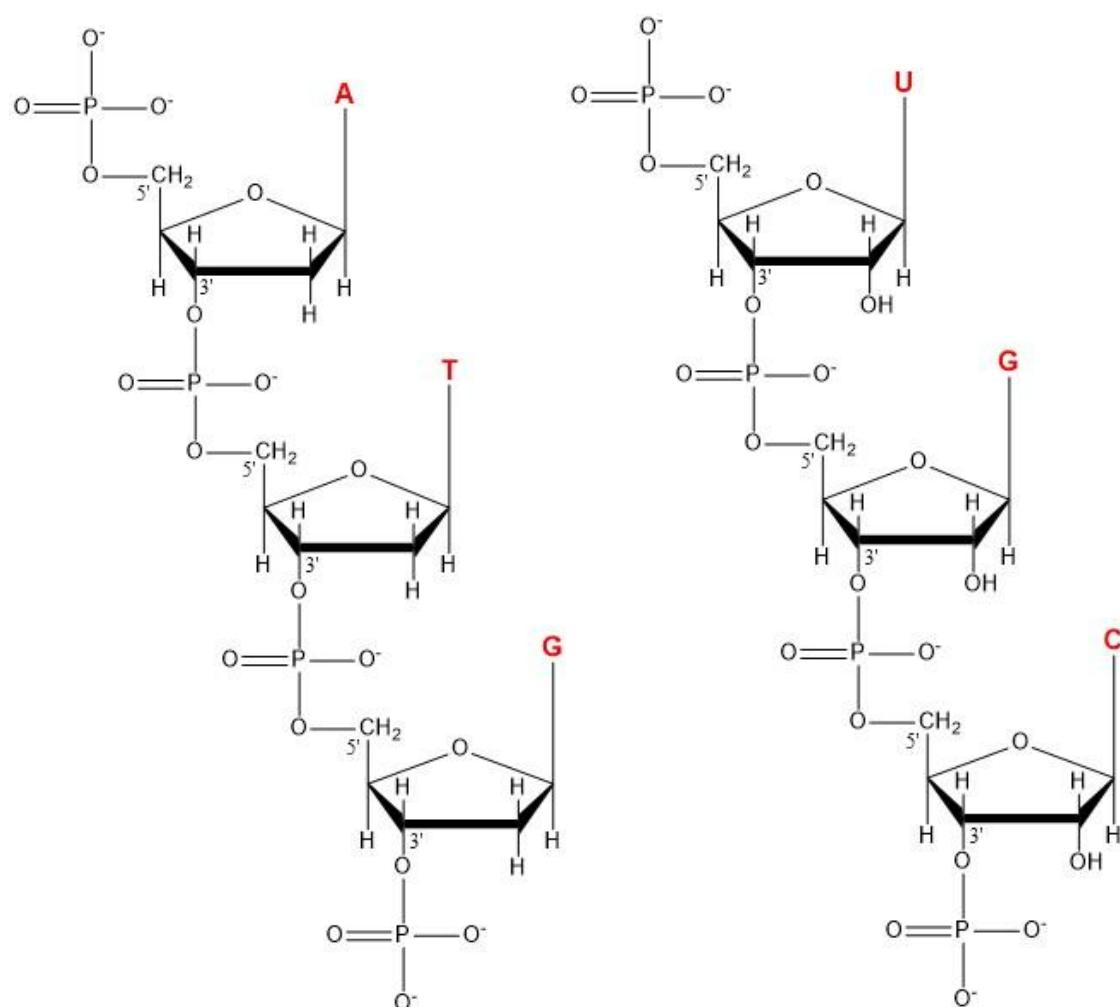


### Nucleosídeos Pirimidínicos



**Figura 3: Estruturas de nucleosídeos purínicos e pirimidínicos.**

Quando ocorre a esterificação do ácido fosfórico com um grupo hidroxila do açúcar de um nucleosídeo forma-se a estrutura química denominada de nucleotídeo (CAMPBELL & FARRELL, 2007), **Fig. 4**. Já a polimerização desses nucleotídeos, via ligações éster pelo ácido fosfórico com os carbonos 3' e 5' de monômeros adjacentes, origina os ácidos nucleicos, **Fig. 4**. Além disso, os grupos fosfatos se encontram na sua forma ionizada e consequentemente carregados negativamente (LEHNINGER, 2014).



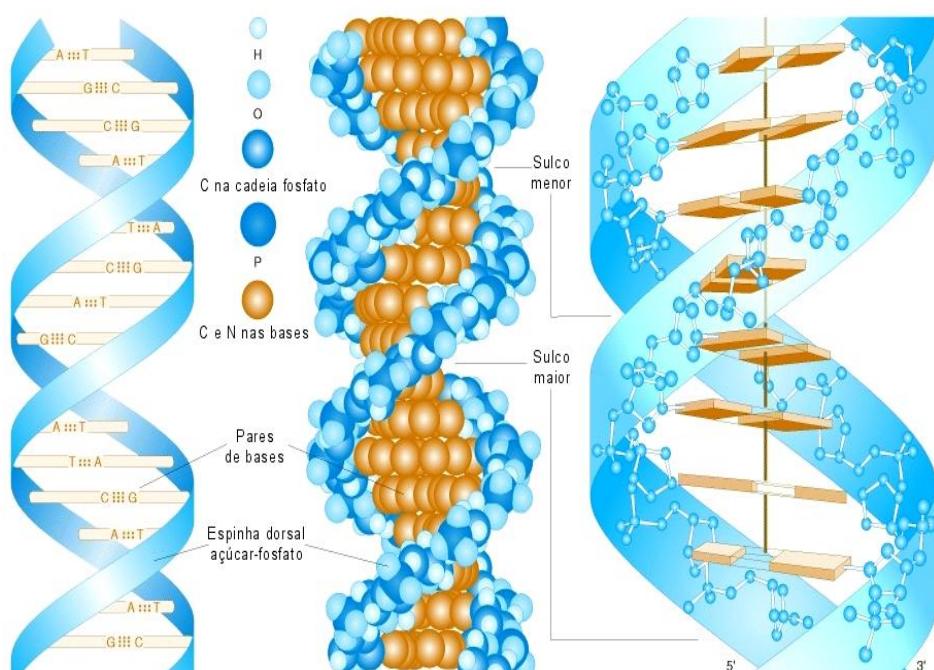
**Figura 4:** Ligações fosfodiéster entre nucleotídeos.

#### 4.1.1.2 Estrutura Secundária do DNA: A Dupla Hélice

A estrutura da dupla hélice do DNA foi proposta em 1953 por James D. Watson e Francis Crick considerando todas as informações científicas disponíveis na época. Dentre elas, o estudo dos DNAs de várias espécies realizado por Chargaff, o qual demonstrou a partir de análises quantitativas que a porcentagem em mol de

guanina era sempre equivalente a citosina, assim como a da adenina e a timina. E a investigação da estrutura do DNA utilizando difração de raios X, realizada por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins (LEHNINGER, 2014).

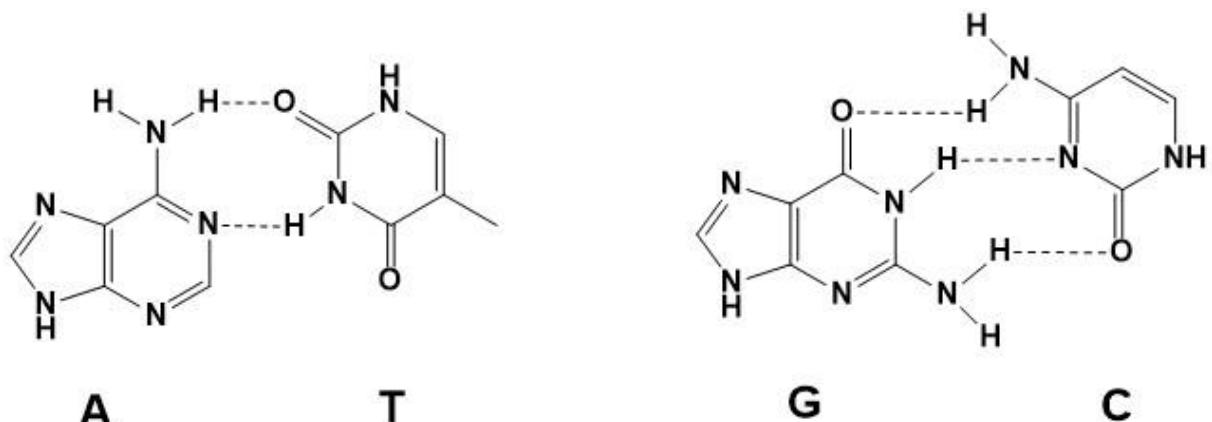
O modelo proposto por Watson e Crick representa duas cadeias de polinucleotídeos entrelaçadas para formar uma hélice dupla. As ligações de hidrogênio entre as bases em cadeias opostas determinam a formação da hélice dupla e de seu alinhamento **Fig. 5**. Além disso, as bases nitrogenadas estabelecem interações por empilhamento no interior das hélices através da projeção do grupo aromático de suas bases em paralelo, **Fig. 5**. O empilhamento das bases é um fator importante para a estabilização da estrutura da dupla hélice do DNA e contribui para a formação de interação de Van der Waals e dipolo-dipolo. Já os grupos fosfatos carregados negativamente e a desoxirribose, que são responsáveis pelo caráter hidrofílico da espinha dorsal do DNA, estão localizados nas partes externas das hélices, **Fig. 5**. Além disso, é importante relatar que as hélices estão em direções antiparalelas, uma de 3' para 5' e outra de 5' para 3' (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014).



**Figura 5: Estrutura secundária do DNA (OLIVEIRA, 2010).**

Análises quantitativas do DNA estabeleceram que a adenina de uma hélice liga-se sempre a timina da outra hélice (complementar) a partir de duas ligações de

hidrogênio. Já a guanina forma três ligações de hidrogênio com citosina de outra fita correspondente. Dessa maneira, os pares de base da estrutura secundária do DNA são AT e GC, **Fig. 6** (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2010)



**Figura 6: Pareamento de bases. Ligações de hidrogênio entre os pares de bases adenina-timina e guanina-citosina. As ligações de hidrogênio são mostradas com linhas tracejadas.**

A forma do DNA relatada até o momento é denominada de B-DNA e possui um diâmetro externo da hélice de 20 Å e extensão de uma volta completa da hélice ao longo do seu eixo de 34 Å com dez pares de bases. Além disso, nessa estrutura formam-se espaços vazios conhecidos como sulcos, **Fig. 7**. Entretanto, outras estruturas secundárias para o DNA podem ocorrer sob certas circunstâncias, tais como A-DNA e a Z-DNA, **Fig. 7**. A isoforma A-DNA é mais compacta e assume esta conformação em soluções que não contém presença significativa de água. Nesta estrutura, o DNA também apresenta igualmente como a forma B-DNA rotação para a direita, entretanto, o número de bases para uma volta completa da hélice são 11. Outra distinção é que os pares de bases complementares não estão dispostas perpendicularmente ao eixo da hélice, gerando modificação estrutural que diminui a profundidade do sulco menor e aumenta a do sulco maior. A forma Z-DNA é a conformação alongada e delgada, possui 12 pares de base por volta helicoidal e é favorecida em solução com elevada força iônica. A principal diferença desta conformação é a rotação para a esquerda, que ocorre devido a mudança dos resíduos púricos para o mesmo lado do plano (conformação *syn*) (LEHNINGER, 2014; SILVA, 2016).

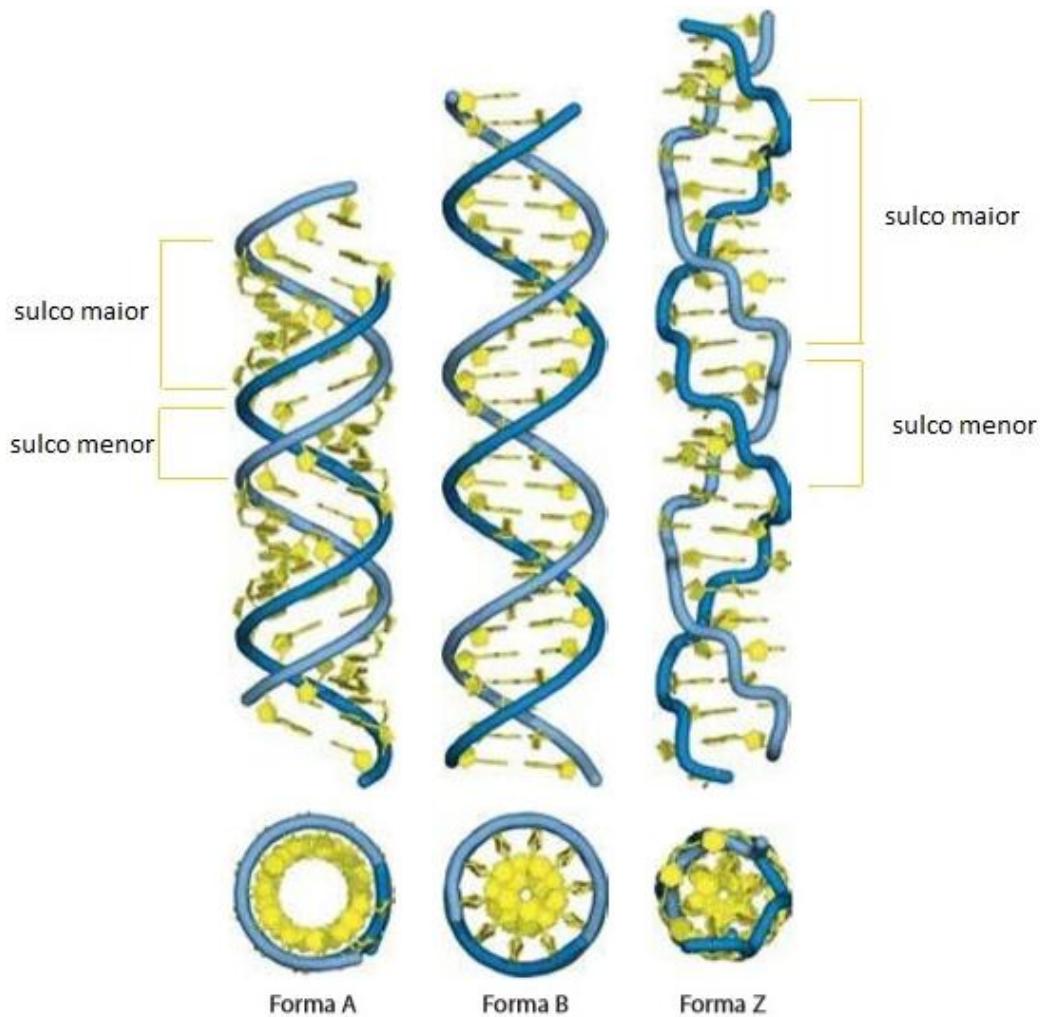
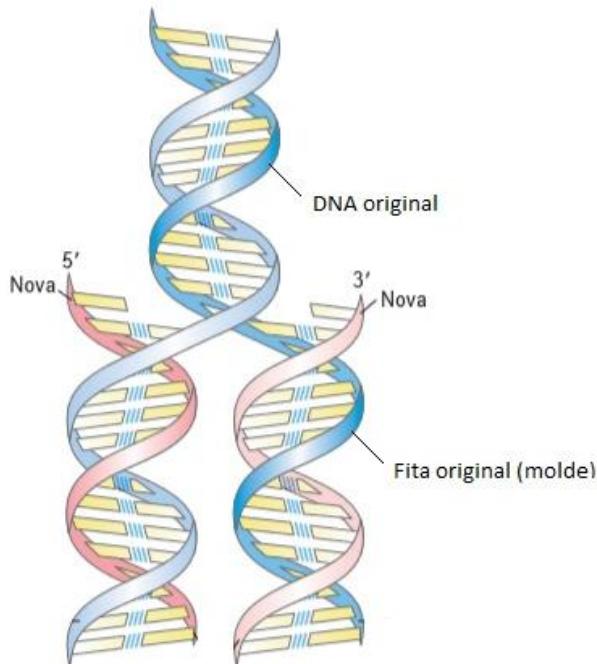


Figura 7: Estruturas de A-DNA, B-DNA e Z-DNA (LEHNINGER, 2014).

#### 4.1.1.3 Funções Biológicas do DNA

- **Replicação**

A replicação do DNA é semiconservativa ocorrendo a separação das duas duplas fitas originais, o qual cada fita será utilizada como modelo para síntese de uma nova hélice complementar, formando assim duas novas moléculas de DNA, **Fig. 8.** Entretanto, a replicação do DNA não é tão simples assim e requer em todos os organismos um complexo de proteínas que trabalham juntas denominado de replissomo (LEHNINGER, 2014; CAMPBELL & FARRELL, 2007).



**Figura 8: Replicação da molécula do DNA (LEHNINGER, 2014).**

- **Síntese de Proteínas**

O processo de formação do RNA a partir da codificação das informações de um molde de DNA é conhecida como transcrição. O RNA atua de várias formas, uma delas é como portador da informação codificada do núcleo celular ao ribossomo no citoplasma. O nome “RNA mensageiro” foi proposto por François Jacob e Jacques Monod em 1961, e é referente aos ácidos nucleicos que fornecem os moldes que definem a sequência dos aminoácidos na síntese proteica. Já o RNA transportador transfere os aminoácidos para o ribossomo, além de atuar no reconhecimento dos ácidos. A tradução consiste na formação de uma sequência de aminoácidos pela decodificação do RNA mensageiro. (LEHNINGER, 2014; FARAH, 1997).

#### 4.1.1.4 Desnaturação do DNA

A desnaturação do DNA é o processo de separação da dupla hélice através do rompimento das pontes de hidrogênio entre as bases, geralmente por aquecimento ou podendo também ser induzida via reações químicas (LIU et. al, 2002). Como consequência, a absorbância para o DNA de hélice simples é maior (hipercromismo) do que para o de hélice dupla na mesma concentração, uma vez

que as bases estão livres e não formam ligações de hidrogênio com bases complementares (CAMPBELL & FARRELL, 2007; OLIVEIRA, 2010).

#### 4.1.2 Modos de interação de pequenas moléculas com o DNA

Considerando as características estruturais da molécula do DNA diversas espécies químicas, como radicais, íons e pequenas moléculas, podem interagir na sua estrutura em diferentes locais e por diferentes maneiras, alterando processos biológicos e provocando inúmeras doenças (OLIVEIRA & BRETT, 2012). Por outro lado, os agentes antineoplásicos de ciclo-celular não específicos também interagem diretamente com a molécula do DNA, provocando a morte de células tumorais (SANTOS, 2015). Assim é de grande importância na literatura investigar essas interações e suas consequências nos processos bioquímicos (HAJIAN et. al, 2009). Diferentes técnicas analíticas vêm sendo utilizadas neste campo, como espectrometria UV-Vis, espectrometria de fluorescência, cromatográficas, eletroquímicas e outras (OLIVEIRA & BRETT, 2010).

Em geral, pequenas moléculas interagem com o DNA via ligação covalente (intra/inter-ligação cruzada e alquilação) ou por ligações não covalentes, tais como intercalação, interações nos sulcos (groove) e eletrostáticas, **Tabela 1** (SNYDER & HENDRY, 2005).

**Tabela 1: Exemplos de interações do DNA com pequenas moléculas (antineoplásicos ou carcinógenos).**

Molécula	Interações	Referência
Cisplatina	Intra/inter ligação cruzada	SIRAJUDDIN et. al, 2013
Ciclofosfamida	Alquilação	KONDO et. al, 2010
Temozolomida	Alquilação	KONDO et. al, 2010
Clorambucila	Alquilação	KONDO et. al, 2010
Dacarbazina	Alquilação	KONDO et. al, 2010
Tris(bipiridina)rutenio(II)	Ligação Eletrostática	KELLY et. al, 1985
Daunorrubicina	Intercalação	Barra & NETTO, 2015
Mitoxantrona	Intercalação	Barra & NETTO, 2015
Ansacrina	Intercalação	Barra & NETTO, 2015
Brometo de etídio	Intercalação	SILVA, 2014
Netropsina	Ligação no sulco	SILVA, 2016

Distamicina	Ligaçāo no sulco	SILVA, 2016
Procarbazina	Ligaçāo no sulco	ANWER, 2016

#### 4.1.2.1 Modo de ligação covalente

Pequenas moléculas podem interagir com o DNA covalentemente em diferentes sítios de ligações, principalmente nas bases nitrogenadas purínicas nas posições N7 e N3 (FONTES & ALMEIDA, 1997). Um exemplo deste modo de interação é do antineoplásico cisplatina, cis-[diamindicloroplatina(II)], o qual estabelece uma ligação covalente com as bases liberando cloretos, **Fig. 9** (SIRAJUDDIN et. al, 2013).

**Figura 9: Cisplatina ligado no modo covalente ao DNA na posição N7 da guanina.**  
**(COSTI, 2011).**

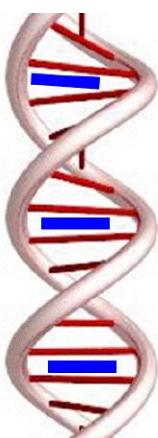
Os agentes alquilantes são compostos utilizados no tratamento do câncer e que adicionam covalentemente grupos alquila ( $C_nH_{2n+1}$ ) ao DNA, essas reações geralmente ocorrem nas bases nitrogenadas e com maior probabilidade, devido sua alta reatividade, na posição N7 da guanina (RAISKI & WILLIAMS, 1998; NASCIMENTO, 2018). As alquilações no DNA acabam dificultando a separação da dupla hélice, evitando assim a proliferação de células tumorais. São exemplos de alquilantes: ciclosfosfamida, bussulfano, temozolomida, dacarbazina, clorambucila, ciclofosfamida, iomustina (KONDO et. al, 2010).

#### 4.1.2.2 Modo não-covalente de ligação

Os agentes antineoplásicos que interagem com o DNA na forma não-covalente causam geralmente mudanças estruturais na molécula do DNA, em alguns casos promovendo até a quebra da dupla hélice. Geralmente, os agentes não-covalentes são considerados menos citotóxicos do que os agentes covalentes, uma vez que não produzem adutos covalentes no DNA. Essas interações podem contribuir para efeitos significativos na expressão gênica (SILVESTRI & BRODBELT, 2012). O modo não-covalente de ligação de pequenas moléculas com o DNA pode ser classificado em três tipos: intercalação, ligação no sulco e ligação externa (no exterior da hélice) (NI; LIN & KOKOT, 2006).

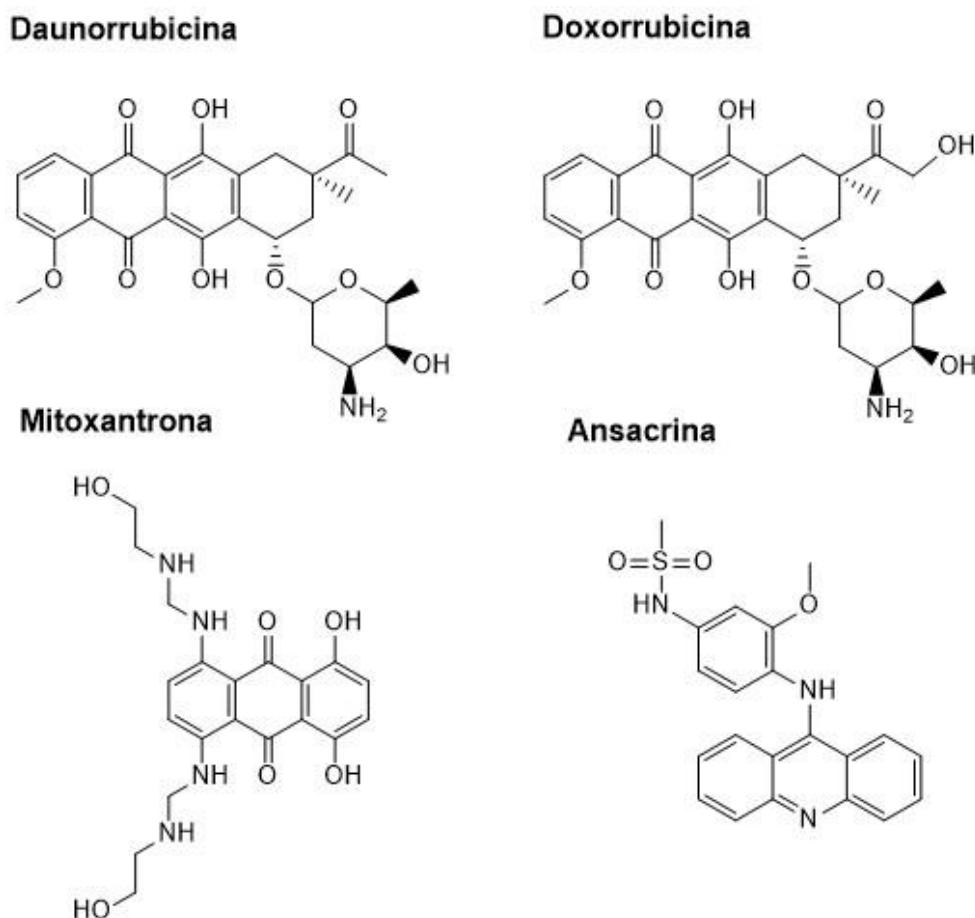
#### **4.1.2.2.1 Intercalação**

A intercalação foi relatada na literatura pela primeira vez por Lerman com a finalidade de explicar a forte afinidade de certos corantes heterocíclicos aromáticos com o DNA (LERMAN, 1961). A intercalação consiste na inserção por empilhamento de moléculas aromáticas entre os pares de bases do DNA, conduzindo sobreposições do tipo p-elétron, **Fig. 10**.



**Figura 10: Modelo genérico de intercalação de compostos heterocíclicos aromáticos com a molécula de dsDNA (SILVA, 2016).**

Os intercaladores interagem sem romper as ligações de hidrogênio entre as bases do DNA, de modo que se estabelece uma interação por empilhamento  $\pi$  entre os grupos aromáticos heterocíclicos dos pares de bases do DNA e as estruturas aromáticas do agente intercalador, **Fig. 10**. Além dessa interação, a estabilidade do DNA-intercalador também é mantida por ligação de hidrogênio, forças de Van der Waals e forças hidrofóbicas (MARTÍNEZ & GARCÍA, 2005; SHUI et. al, 2000; WARING & BAILLY, 1994; REHN & PINDUR, 1996; BAGINSKI, 1997). Os medicamentos que atuam como intercaladores no tratamento quimioterápico possuem a função de inibir a replicação do DNA no rápido crescimento de células cancerosas (BARRA & NETTO, 2015). Existem quatro intercaladores orgânicos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento do câncer, **Fig. 11**.



**Figura 11: Intercaladores orgânicos comercializados para o tratamento quimioterápico.**

A adição de um intercalador causa mudanças na estrutura do DNA que estabiliza, aumenta, endurece e desenrola a dupla hélice (BAUER & VINOGRAD, 1970). Para que ocorra a inserção do intercalador na dupla hélice, o DNA vai se desenrolando de modo que se projete um espaço específico entre os seus pares de base. Cada espécie intercaladora promove um grau de desenrolamento na dupla hélice. O dsDNA possui uma baixa flexibilidade em sua espinha dorsal, dessa forma, apenas uma molécula intercalante é inserida a cada dois espaçamentos mantendo os adjacentes vazios (NEIDLE & ABRAHAM, 1984; KECK & LIPPARD, 1992).

#### 4.1.2.2.1.1 Brometo de Etídio

O brometo de etídio é um corante fluorescente não-radioativo muito utilizado na biologia molecular por ser um agente intercalador do DNA, **Fig 12**. A eletroforese é uma técnica bastante conhecida na utilização do brometo de etídio (BAIRD et. al, 1996). Através da imersão do gel de agarose em solução diluída de brometo de etídio é possível a visualização do deslocamento dos fragmentos do DNA sob

condição de luz UV que transmite cor vermelho-alaranjado (CARNIELLO et. al, 2008).

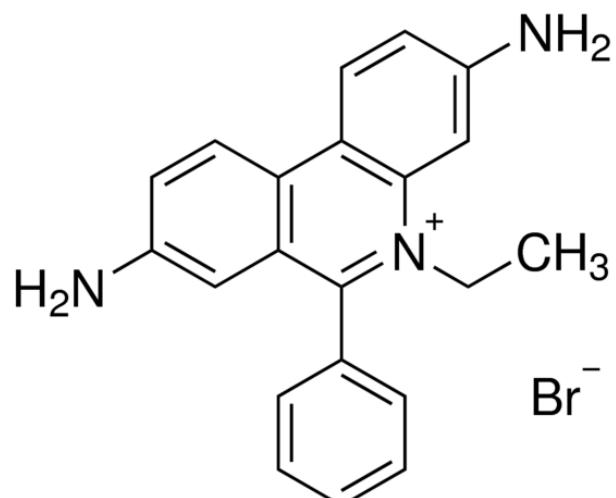


Figura 12: Estrutura molecular do brometo de etídio.

Ao se intercalar, o brometo de etídio desenrola o DNA em cerca de 26° e causa o impedimento dos processos de replicação e transcrição, **Fig. 13** (VARDEVANYAN, et. al, 2003).

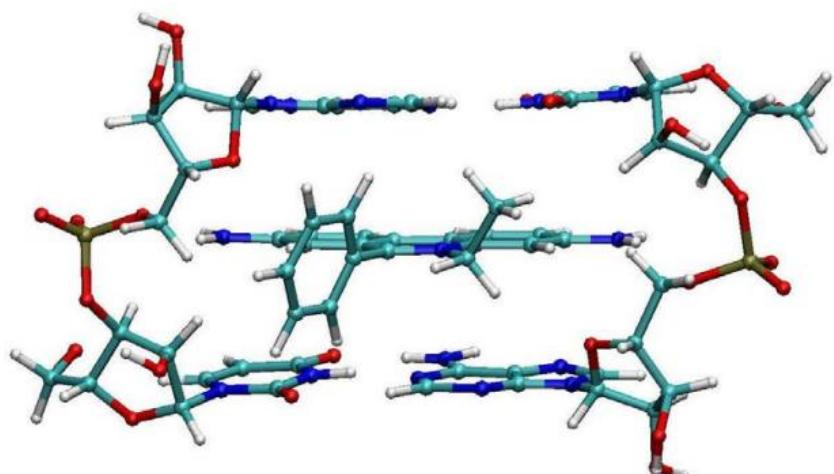


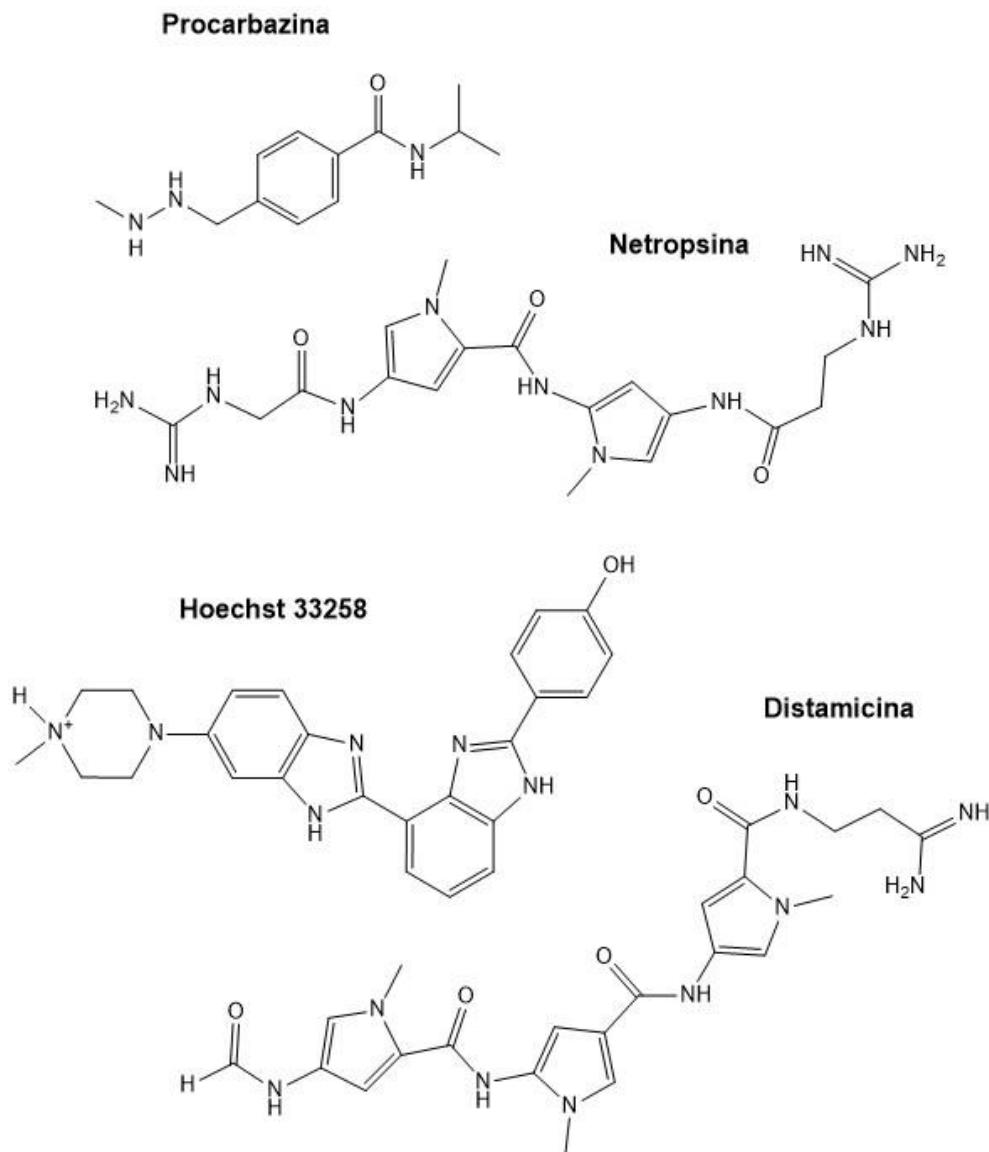
Figura 13: Intercalação do brometo de etídio entre as bases do DNA (BARRA, 2015).

Por ser um potente agente intercalador do DNA torna-se muito perigoso o uso dessa substância que apresenta alto poder mutagênico e possível poder carcinogênico e teratogênico (SILVA, 2014). O contato através da inalação, ingestão, contato com a pele, contato com os olhos e exposição crônica podem causar diversos efeitos colaterais (BARROS, 2003).

Estudos realizados com ratos e camundongos demonstraram que o brometo de etídio não é um potencial mutagênico, mas que seus metabólitos possuem essa característica. O brometo de etídio vem sendo investigado como possível quimioterápico antitumoral devido a sua ação como veneno de topoisomerase I, além disso esses estudos apontam que essa substância pode ser tóxica em concentrações elevadas (OUCHI, 2011). Entretanto, não há estudos sobre a toxicidade do brometo de etídio em humanos (ROCHA, 2014).

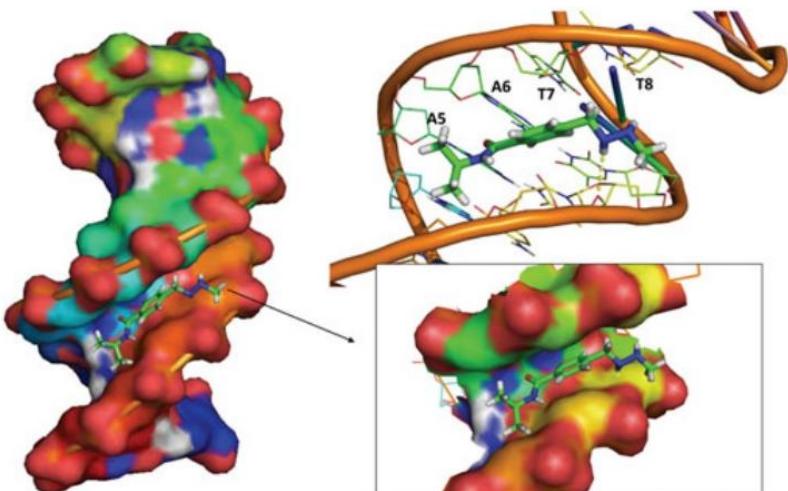
#### **4.1.2.2 Ligação no sulco menor**

Algumas moléculas ligam-se ao sulco menor do DNA e formam ligações de Van der Waals e ligação de hidrogênio. Geralmente, os ligantes que interagem nessa região do DNA apresentam diversos anéis aromáticos em sua estrutura tais como pirrol, furano e benzeno, **Fig. 14** (MEI & BARTON, 1986; SALVIA, 2013).



**Figura 14:** Moléculas que interagem preferencialmente nos sulcos dupla hélice do DNA.

A ligação nessa região da molécula do DNA é facilitada pela curva do sulco menor que promove uma interação com ligantes na forma de curvas estreitas, possibilitando interações como a de Van der Waals, **Fig. 15**. As sequências de Adenina-Timina (AT) se encontram nas regiões mais estreitas nos sulcos em relação as regiões onde a Guanina-Citosina estão mais presentes, assim há uma propensão formação de ligações nas curvas ricas em AT (MEI & BARTON, 1986). As forças hidrofóbicas e/ou ligação de hidrogênio proporcionam a estabilidade do ligante-DNA, além disso, os ligantes que interagem com o DNA nessa região provocam pouca ou nenhuma mudança na estrutura da dupla hélice (KOPKA et. al, 1985; AMBROSEK et. al, 2010).



**Figura 15: Molécula da procarbazina interagindo no sulco menor do DNA (ANWER, 2016).**

#### 4.1.2.2.3 Ligação Externa (eletrostática)

As ligações externas são ligações eletrostáticas entre os grupos fosfatos carregados negativamente, em condições fisiológicas (pH 7,2), e espécies catiônicas como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  que interagem com o DNA e fazem parte de mecanismos celulares (CAMPBELL & FARREL, 2007). Entretanto, cátions metálicos como  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  são considerados carcinogênicos uma vez que suas interações com o DNA se iniciam geralmente pela afinidade eletrostática favorecendo outros tipos de interações como danos oxidativos nas bases (OLIVEIRA & BRETT, 2007).

#### 4.1.3 Técnicas usadas no estudo da interação do DNA com agentes carcinogênicos e antineoplásicos

Com o desenvolvimento da biotecnologia e biomedicina, diversas técnicas foram utilizadas para o estudo das interações de espécies com o DNA, os seus métodos de análise também se tornaram mais sensíveis e seletivos. Algumas técnicas com destaque são a espectrometria UV-Vis, infravermelho e Raman, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de massa, microscopia de força atômica (AFM) e de varredura por tunelamento (STM), técnicas eletroquímicas como a voltametria de pulso diferencial (DPV), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese em gel, técnicas de modelagem molecular e DNA Footprinting (OLIVEIRA & BRETT, 2010). Dentre essas técnicas, a espectrometria de absorção molecular no UV-Vis tem se destacado por ser a técnica instrumental mais simples e frequentemente empregada para o estudo das

interações droga-DNA e sua influência na estabilidade da dupla hélice (SUN et. al, 2011).

#### 4.1.3.1 Espectrometria de absorção molecular UV-Vis

A espectrometria de absorção molecular utiliza a radiação eletromagnética de uma fonte externa para estabelecer a absorbância da espécie química analisada. Através da espectrometria de absorção molecular inúmeros estudos reacionais e cinéticos, analíticos qualitativos e quantitativos podem ser realizados para caracterização e quantificação de compostos orgânicos e inorgânicos.

A radiação eletromagnética interage com a matéria devido sua dualidade onda-partícula, com propriedades de onda (frequência, amplitude e comprimento de onda) e de partícula (pacotes discretos de energia denominados fôtons). A energia de um fóton é inversamente proporcional ao comprimento de onda e diretamente proporcional a frequência, de acordo com a **Equação 1** (SKOOG, 2006).

$$E = h \nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (\text{Eq. 1})$$

Dessa forma, nas faixas espectrais, **Fig. 16**, com o aumento do comprimento de onda espera-se a diminuição da energia. Por exemplo, a faixa de comprimento de onda da região do ultravioleta de 200 a 400 nm é mais energética quando comparada a faixa do visível de 400 a 750 nm. A espectrometria que utiliza a região entre 200-750 é denominada de espectrometria no UV-Vis, sendo essa faixa amplamente explorada em estudos reacionais, cinéticos e analíticos qualitativos e quantitativos (SKOOG, 2006).

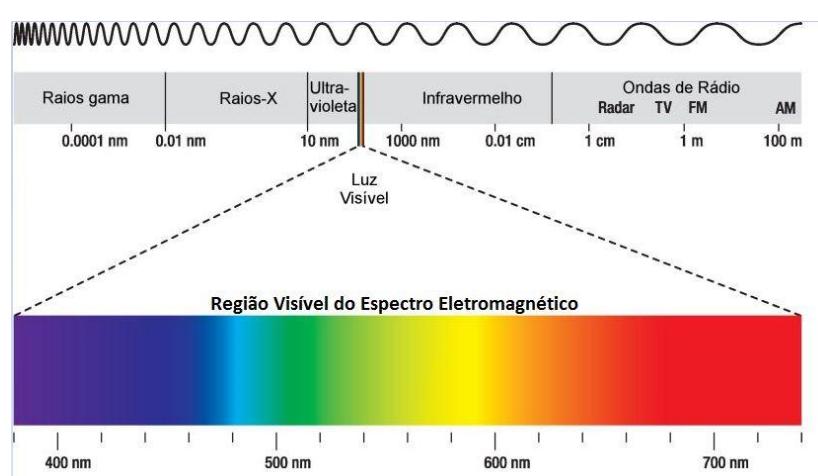


Figura 16: Espectro da radiação eletromagnética

(<http://knoow.net/cienciasexactas/fisica/espectroelectromagnetico/>, acessado em 2019).

Na espectrometria no visível a seleção do comprimento de onda possibilita que um feixe incidente de determinada energia interaja com a espécie, dessa forma a substância em análise absorve uma coloração específica. A cor observada é conhecida como sendo a cor complementar da absorvida. Por exemplo, se a substância absorve na região azul no espectro visível (480 a 490 nm) a solução apresentará coloração alaranjada, que por sua vez é a cor complementar, **Tabela 2**.

**Tabela 2: Cor absorvida e observada no espectro eletromagnético.**

Comprimento de onda da luz (nm)	Cor absorvida	Cor observada
380 a 435	Violeta	Verde-amarelado
435 a 480	Azul	Amarelo
480 a 490	Azul-esverdeado	Alaranjado
490 a 500	Verde-azulado	Vermelho
500 a 560	Verde	Púrpura
560 a 580	Verde-amarelado	Violeta
580 a 595	Amarelo	Azul
595 a 650	Alaranjado	Azul-esverdeado
650 a 780	Vermelho	Verde-azulado

Quando a radiação eletromagnética incidente interage com moléculas de uma substância, parte dessa energia é absorvida. Neste processo os elétrons transitam de um menor nível energético para um maior nível energético, porém apenas por um instante, logo retornando ao nível fundamental liberando calor para o sistema. Como uma quantidade dessa radiação incidente é absorvida, a energia é consequentemente atenuada após a interação. A partir da medição da radiação eletromagnética emitida (quando o elétron volta ao seu nível de menor energia) ou absorvida obtém-se informações sobre a espécie química em estudo (PARRON, 2011).

A interação da energia eletromagnética com a matéria promove a excitação dos elétrons causando transições eletrônicas, vibracionais e rotacionais. Essas transições ocorrem conforme a aplicação de quantidade específica de energia nas

moléculas. Em algumas moléculas, a luz UV é capaz de alterar sua distribuição eletrônica, entretanto, certas moléculas requerem uma energia mais alta para que a transição eletrônica ocorra. Os grupos funcionais com absorção característica na região do ultravioleta e visível, são denominados cromóforos. São nesses grupos que ocorrem a absorção da radiação e consequente mudança dos estados eletrônicos, vibracionais e rotacionais. A **Tabela 3** mostra exemplos de alguns grupos cromóforos e o comprimento de onda que absorvem radiação (SKOOG, 2006).

**Tabela 3: Características de absorção de alguns cromóforos orgânicos comuns.**

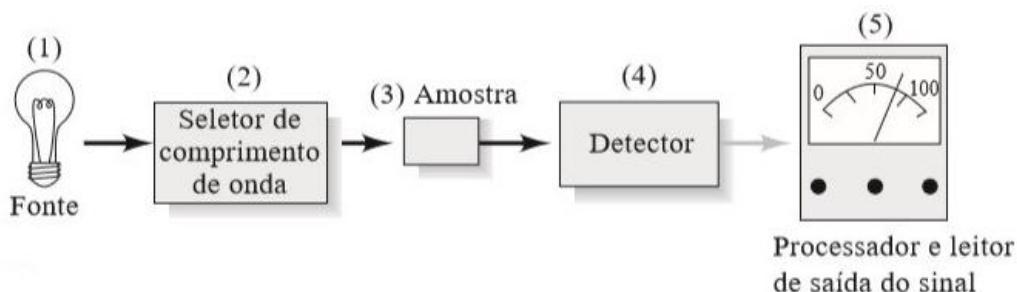
Cromóforos	Exemplo	Solvente	$\lambda_{\text{máx}} (\text{nm})$
Alceno	$\text{CH}_3\text{CH}_2=\text{CH}_2$	n-Heptano	177
Alceno conjugado	$\text{CH}_2=\text{CHCH}=\text{CH}_2$	n-Heptano	217
Carbonila	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	n-Hexano	186-280
Carboxila	$\text{CH}_3\text{COOH}$	Etanol	204
Amina	$(\text{CH}_3)_2\text{CHNH}_2$	Água	214
Amido	$\text{CH}_3\text{CONH}_2$	Água	214
Nitro	$\text{CH}_3\text{NO}_2$	Isooctano	280
Nitrato	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$	Éter etílico	270
Aromático	Benzeno	n-Hexano	204-256

Fonte: SKOOG, 2006 (Adaptado).

#### 4.1.3.1.1 O Espectrofotômetro

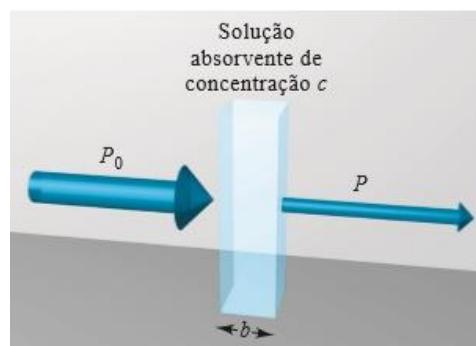
O espectrofotômetro é o instrumento utilizado nas análises espectroscópicas de absorção molecular e consiste na combinação de cinco constituintes que em ordem são: fonte contínua de radiação (1), seletor de comprimento de onda (2), cubeta para a amostra -(3), detector de radiação (4) e processador de sinal e leitor (5), **Fig. 17**. A fonte externa de energia utilizada na espetrometria UV-Vis é geralmente a lâmpada de tungstênio para a região do visível e de deutério, para a região do ultravioleta. Nos equipamentos modernos, o seletor de comprimento de onda é um monocromador que isola um comprimento de onda específico. Após ser isolada, a banda estreita passa por uma fenda de saída para interagir com a amostra. O recipiente para análise das amostras é a cubeta que pode ser de vidro ou quartzo, a primeira é utilizada em experimentos na região do visível e a segunda,

na região do ultravioleta. Em seguida, a radiação incidente atenuada passa pelo detector, este possui um transdutor que converte grandezas não elétricas em sinais elétricos. Por fim, esses sinais são expandidos por processador e direcionados ao aparelho digital de leitura (SKOOG, 2006).



**Figura 17:Componentes do espectrofotômetro (SKOOG, 2006).**

A absorbância de uma espécie é a diferença entre a radiação incidida e a radiação transmitida, uma vez que após interagir ocorre um decréscimo na quantidade de energia. A figura 18 demonstra este processo, em que a intensidade da radiação incidida  $P_0$  diminui após sua passagem pela cubeta com caminho ótico específico (b) e transmite a radiação  $P$  (SKOOG, 2006).



**Figura 18: Atenuação de um feixe de radiação após a interação com a espécie absorvente (SKOOG, 2006).**

A transmitância ( $T$ ) é determinada a partir da razão entre das radiações, ou seja, a quantidade de luz que atravessa o meio e porção de luz incidente. O aumento da absorbância ( $A$ ) acarreta na diminuição da transmitância, assim, estão relacionadas de forma logarítmica, **Eq. 2** (SKOOG, 2006).

$$A = -\log T = -\log \frac{P}{P_0} = \log \frac{P_0}{P} \quad (\text{Eq. 2})$$

A partir da concentração de uma espécie, a absorbância também pode ser determinada utilizando a lei de Beer-Lambert, **Eq. 3**. Assim, absorbância é uma grandeza unidimensional que está relacionada com o aumento ou diminuição da concentração (c) e do caminho ótico (b). A absorvidade (a) é uma constante de proporcionalidade que difere em cada espécie (SKOOG, 2006).

$$A = abc \quad (\text{Eq. 3})$$

Quando a concentração é expressa em molaridade e o caminho ótico em centímetros, obtém-se a absorvidade molar ( $\epsilon$ ) da espécie com unidades de  $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , **Eq. 4** (SKOOG, 2006).

$$A = \epsilon bc \quad (\text{Eq. 4})$$

Na espectrometria UV-Vis é de extrema importância, antes de analisar uma espécie, a execução de uma prova em branco que consiste na passagem da radiação incidente através de uma amostra que contém apenas o solvente ou água destilada. Isto é feito para descontar a interferência do fenômeno de reflexão decorrente da interação do feixe incidente com as interfaces da célula que contém a amostra. Além disso, o processo de espalhamento também ocorre pela interação da luz com partículas presentes no solvente, que acrescenta uma atenuação à radiação que chega ao detector. A comparação da potência transmitida com e sem a presença do analito e nas mesmas condições experimentais, permite que estes interferentes não sejam evidenciados (SKOOG, 2006).

#### 4.1.3.2 Interações ligante-DNA por espectrometria UV-Vis

A espectrometria de absorção UV-Visível é talvez a técnica instrumental mais comumente utilizada para o estudo da interação entre pequenas moléculas com o DNA (SUN et. al, 2011; BHADRA & KUMAR; JAUMONT & GARGALLO 2012). Diversos estudos de diferentes espécies com o DNA têm sido realizados utilizando esta técnica, **Tabela 4**.

**Tabela 4: Estudos de espécies e suas interações com o DNA utilizando espectrometria UV-Vis.**

Espécie	Referência
Lapatinib	DOGAN-TOPAL et. al, 2014
Complexo de Európio (III)	ZHANG et. al, 2009
Pazufloxacina	LING et. al, 2008
Levetiracetam	SHAHABADI & HADIDI, 2012
Mitoxantrona	AGARWAL et. al, 2013
Amsacrina	JANGIR et. al, 2012
Berberina	TIAN et al, 2008
Ractopamina	NI, WANG & KOKOT, 2010
Hesperidina e Naringerina	ASHWINI et. al, 2012
Aminocarbe	ZHANG et al, 2010
Isoprenalina	NI, WEI & KOKOT, 2011
Bromo de etídio	BARANOVSKY et. al, 2009
Ratiltrexato	QUEIROZ et. al, 2018
Talidomida	OLIVEIRA et. al, 2009

O estudo das interações droga-DNA por espectrometria de absorção UV-Vis é realizado pela observação das mudanças das propriedades de absorção do ligante ou do DNA (SUN et. al, 2011; BHADRA & KUMAR; JAUMONT & GARGALLO 2012). Entretanto, uma desvantagem dessa técnica decorre do fato de não fornecer informações relevantes quando o ligante apresenta banda de absorção na mesma região que o DNA. Ao interagir com a espécie absorvente, a radiação eletromagnética é atenuada, dessa forma, a absorção do ligante e do DNA em comprimentos de ondas próximos resulta na interferência espectral pela influência do sinal proveniente de um em outro (SILVA, 2016). Uma vez que as moléculas usadas como ligantes apresentam uma banda de absorção distingível na região do visível, a análise do deslocamento e alteração da absorbância de quando a espécie está livre em solução para quando está ligado ao DNA evidencia a interação entre a droga e o DNA. A força de interação entre a estrutura do DNA e do ligante está associado a magnitude desse deslocamento (SUN et. al, 2011; BHADRA & KUMAR; JAUMONT & GARGALLO 2012).

Existem dois tipos de descolamentos que podem ser identificados na interação ligante-DNA. O primeiro é o deslocamento batocrômico (deslocamento vermelho) que consiste no aumento do comprimento de onda de máxima absorção. O segundo deslocamento é o hipsocrômico (deslocamento azul) referente a diminuição do comprimento de onda de máxima absorção. Além disso, os efeitos hipercrômico ou hipocrômico, responsáveis pelo aumento e diminuição da absorbância da banda, respectivamente, também podem ser observados.

Geralmente, a intercalação dos compostos aromáticos na estrutura do DNA resulta no hipocromismo e batocromismo (deslocamento vermelho). O hipocromismo ocorre pela proximidade entre o composto intercalado e as bases nitrogenadas do DNA nas interações por empilhamento entre os elétrons  $\pi$  dos grupos aromáticos do intercalador e os elétrons  $\pi$  das bases do DNA. O efeito batocrômico contribui para o hipocromismo e está associado a diminuição do nível de energia da transição do elétron  $\pi-\pi^*$ . O deslocamento para o vermelho também pode ser identificado nas interações de moléculas no sulco menor do DNA, entretanto, esse efeito não ocorre de forma significativa como na intercalação (LIU et. al, 2002).

O hipercromismo é observado no caso de ligação externa (eletrostática) de espécies catiônicas com os grupos fosfato na espinha dorsal do DNA que resulta na compressão da estrutura complexo-DNA causando danos na estrutura da dupla hélice. Além disso, algumas espécies provocam o efeito hipsocrômico como na interação do complexo de zinco (II) com a molécula de DNA. A dupla hélice é mantida pelas interações por empilhamento, ligações de hidrogênio e efeito hidrofóbico entre as bases (ARJMAND & JAMSHEERA, 2011; SIRAJUDDIN et. al, 2013).

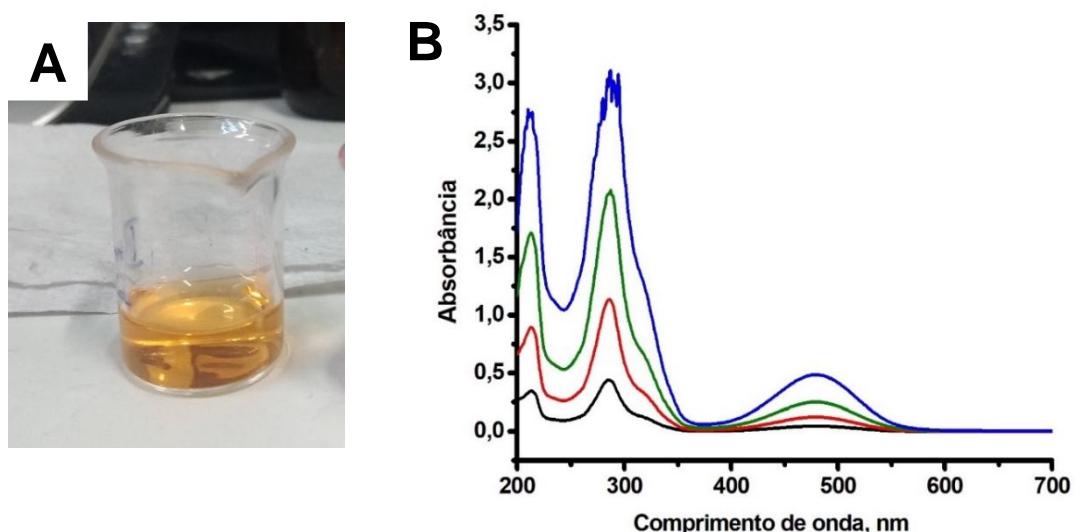
O efeito hipercrômico também é verificado na desnaturação da estrutura secundária do DNA, uma vez que as bases vão estar nas suas formas livres em solução, sem estabelecer ligações de hidrogênio com suas bases complementares (LEHNINGER, 2014).

## 4.2 PARTE EXPERIMENTAL

#### 4.2.1 Espectrometria UV-Vis da interação entre brometo de etídio e dsDNA

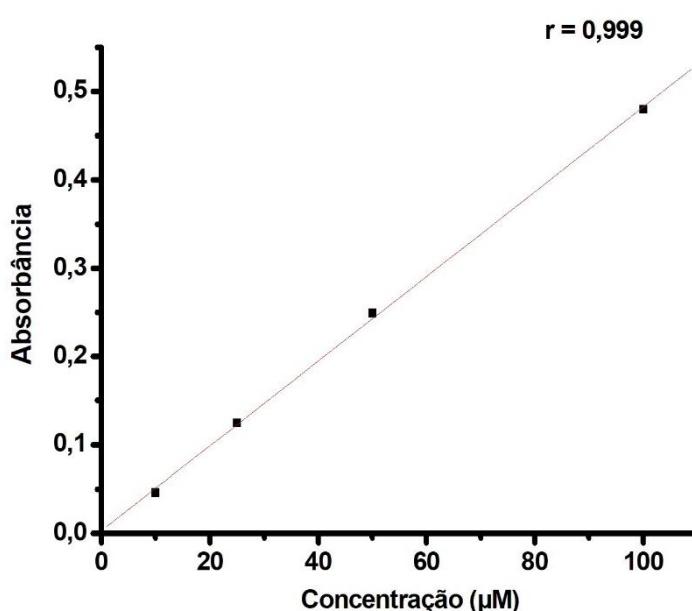
Para analisar a interação do BE com a molécula do dsDNA, primeiramente foram obtidos os espectros de absorção molecular individuais dessas espécies na região do UV-Vis.

Espectros de absorção molecular de soluções aquosas 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BE foram registrados na região de 200-700 nm e apresentaram três bandas de absorção características bem definidas, com comprimentos de onda de máxima absorção em 211 nm, 286 nm e 480 nm, **Fig. 19B**. Considerando a teoria das cores complementares da espectrometria no visível, **Tabela 2**, a terceira banda em 480 nm corresponde a luz absorvida azul-esverdeado com a cor complementar transmitida laranja, como observado na solução de BE, **Fig. 19A**. A absorção molecular do BE, tanto na região espectral ultravioleta quanto na região visível, era esperada devido a presença de vários grupos cromóforos em sua estrutura, **Fig. 12** e **Tabela 3**, com orbitais  $\pi$  conjugados que permitem as respectivas transições eletrônicas entre os níveis de energia. Além disso, o BE possui elétrons não-ligantes que são capazes de serem excitados a outros níveis energéticos (ROCHA, 2014). Observou-se também que a absorbância do BE aumentou linearmente com o aumento de sua concentração nas três bandas de absorção, **Fig. 19B**, como discutido a seguir para a banda da região do espectro visível.



**Figura 19:** (A) Solução do BE 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato pH = 7,0 e (B) Espectros de absorção do BE em tampão fosfato, pH = 7,0, em 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Uma curva analítica para o BE foi levantada utilizando a banda do visível com máxima absorção em 480 nm. Como esperado, considerando a Lei de Lambert-Beer, a curva analítica demonstrou uma excelente linearidade entre os valores de absorbância e a concentração do BE, com coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,999 (**Fig. 20**). Esses resultados demonstram a possibilidade da análise qualitativa e quantitativa do BE utilizando espectrometria UV-Vis.



**Figura 20:** Curva analítica do BE em concentrações de 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  por espectrometria.  $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$ .

A partir dos dados experimentais da **Fig. 20** e utilizando a expressão da lei Lambert-Beer, **Equação 4**, foi calculada a absorvidade molar do BE, como apresentado a seguir.

### Calculo da absorvidade molar do BE

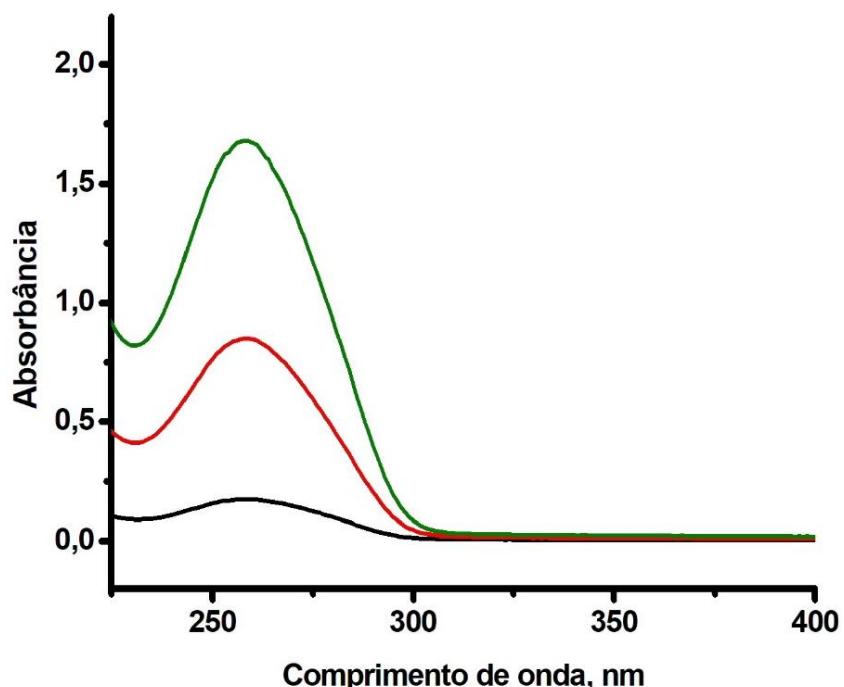
Considerando a concentração de 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o BE, a célula de 1 cm de comprimento e a absorbância detectada de 0,1244 a absorvidade molar calculada foi:

$$\epsilon = A/b.c$$

$$\epsilon = 0,1244 / 1,00 \text{ cm} \times 25 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$$

$$\epsilon = 4,97 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

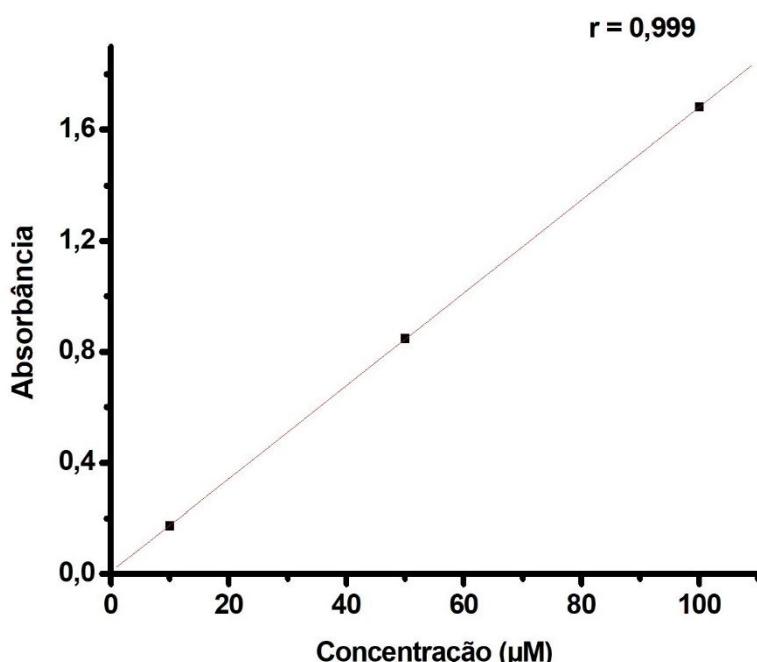
Soluções aquosas de dsDNA 10, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (incolors) foram preparadas e seus espectros de absorção registrados numa faixa de comprimento de onda de 230-400 nm, **Fig. 21**. Uma única banda larga foi detectada, com comprimento de onda de máxima absorção em 260 nm, em concordância com a literatura (LEHNINGER, 2014). As características espectrais no UV detectadas para o DNA se devem a interação da radiação eletromagnética com os resíduos das bases nitrogenadas guanina, adenina, timina e citosina, uma vez que seus anéis aromáticos possuem alta probabilidade de transições eletrônicas (GONZALEZ-RUIZ et. al, 2011). A molécula do DNA, devido a presença de várias bases nitrogenadas aromáticas, apresenta uma elevada absorvividade molar da ordem de  $10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (GONZALEZ-RUIZ et. al, 2011). Um aumento da absorbância do DNA com o aumento da sua concentração, foi também observado (**Fig. 21**), como discutido a seguir.



**Figura 21:** Espectros de absorção do dsDNA em tampão fosfato, pH = 7,0, em 10, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

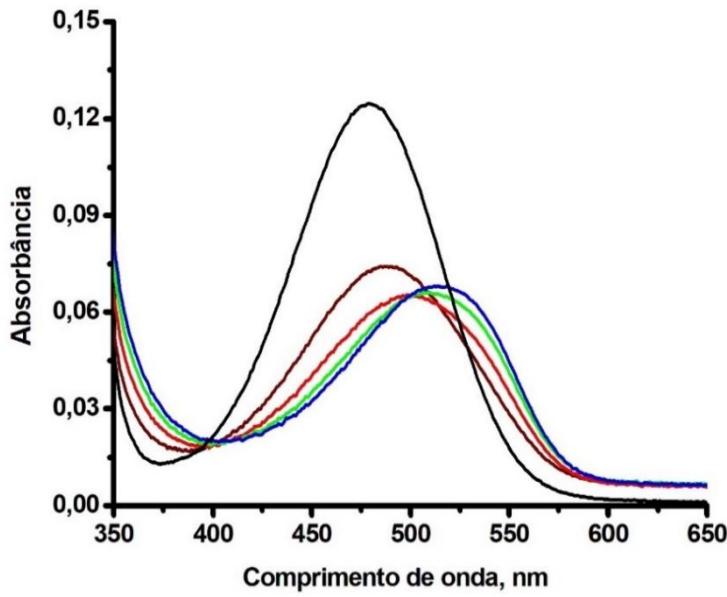
Uma curva analítica para o DNA foi elaborada utilizando os dados da **Fig. 21**. A curva demonstrou uma excelente linearidade de resposta entre os valores de

absorbância e a concentração do DNA, com coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0.999, **Fig. 22.**



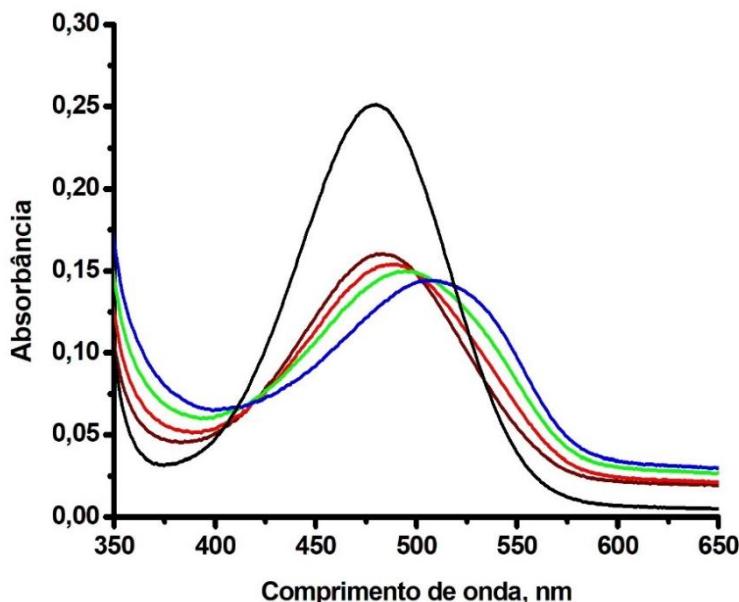
**Figura 22:** Curva analítica (Absorbância vs. [dsDNA]) em concentrações de 10, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Para investigar a interação do BE com a molécula do DNA de hélice dupla, vários espectros de absorção na região UV-Vis foram registrados para diferentes misturas de BE com DNA em pH 7,0 (**Fig. 23, 24 e 25**). No primeiro experimento manteve-se a concentração do BE em  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ , variando-se as concentrações do DNA (12, 24, 36 e  $48 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) **Fig. 23**. Comparando-se os espectros na região visível de 350-650 nm para as misturas BE-DNA com o espectro de absorção do BE (controle), **Fig. 23**, observa-se claramente que o aumento da concentração do DNA resultou numa diminuição significativa da absorbância do BE em 480 nm (hipocromismo), além do seu deslocamento para valores comprimentos de onda maiores (batocromismo), em pleno acordo com a literatura (BARANOVSKY, 2009).



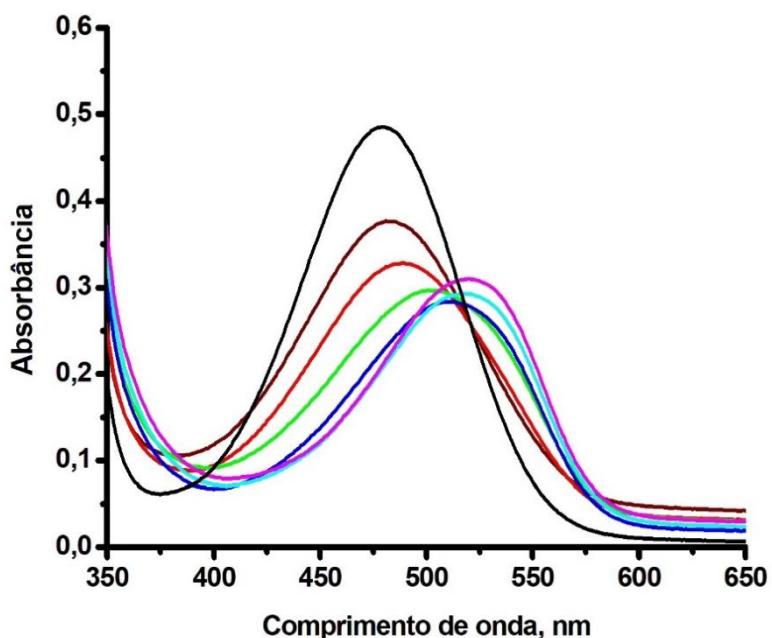
**Figura 23:** Espectros de absorção do BE em  $25 \mu\text{mol mL}^{-1}$  (—) e misturas do BE  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  com dsDNA em diferentes concentrações (—)  $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ , (—)  $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ , (—)  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$  e (—)  $48 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

O experimento acima foi repetido dobrando-se a concentração do BE (de 25 para 50 μmol L⁻¹), **Fig. 24**. Os resultados foram bem concordantes com os da **Fig. 23**, reafirmando claramente a ocorrência do hipocromismo e do batocromismo para a banda do BE com o aumento da concentração do DNA, um comportamento típico de uma interação via intercalação de uma molécula com o DNA (LIU et. al, 2002).



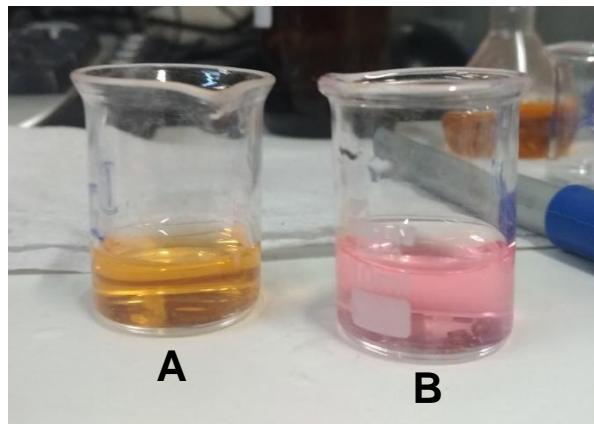
**Figura 24:** Espectros de absorção do BE em  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  (—) e misturas do BE  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  com dsDNA em diferentes concentrações (—)  $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ , (—)  $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ , (—)  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$  e (—)  $48 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Por fim misturas foram realizadas em tampão fosfato pH = 7,0 mantendo-se sempre a concentração do BE  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  e variando as concentrações do DNA (25, 50, 75, 100, 125 e  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), totalizando 6 amostras, **Fig. 25**. Os resultados demonstraram claramente a intercalação do BE na dupla hélice do DNA, considerando a comparação dos espectros de absorção das misturas com o controle do BE, o qual demonstraram o hipocromismo e o batocromismo para a banda do intercalante BE.



**Figura 25:** Espectros de absorção do BE  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  (—) e misturas do BE  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  com dsDNA (—)  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , (—)  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , (—)  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  e (—)  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , (—)  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  e (—)  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A mistura da solução de dsDNA  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$  (incolor) com a solução de BE  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  (alaranjado) mostra claramente uma mudança de coloração de laranja para rosa, **Fig. 26**, em concordância com o deslocamento da banda para o vermelho (red shift) apresentado nos resultados espetrais das **Figs. 23, 24 e 25**.



**Figura 26: Solução de BE 100  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  (A) e sua mistura com uma solução de dsDNA 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B) em tampão fosfato, pH = 7,0.**

Assim, considerando todos os resultados das **Figs. 23, 24, 25 e 26**, bem como a literatura (BARANOVSKY, 2009) a intercalação do BE no dsDNA foi detectada e ocorreu devido ao empilhamento  $\pi$  dos anéis aromáticos da estrutura do BE, **Fig. 12**, e os grupos heterocíclicos aromáticos presentes nos pares de bases do DNA, **Fig. 2**. Além disso, através da interação entre os elétrons  $\pi$  do BE e os elétrons  $\pi$  do dsDNA houve uma diminuição no nível de energia da transição  $\pi-\pi^*$  que resultou no deslocamento para o vermelho (red shift) (LIU et. al, 2002).

## 5 CONCLUSÃO

Este trabalho procurou apresentar de forma clara e didática a importância da espectrometria de absorção molecular UV-Vis nos estudos das interações de diferentes espécies com o DNA e sua aplicação nas investigações da estabilidade do DNA. O trabalho foi dividido em duas partes principais, onde na primeira foi uma revisão bibliográfica sobre o tema sugerido estabelecendo tópicos como, estrutura do DNA, suas propriedades, conformações e funções, modos de interações covalente e não-covalente de drogas com o DNA, técnicas usadas no estudo da interações do DNA com agentes carcinogênicos e antineoplásicos, espectrometria de absorção molecular no ultravioleta e visível, interações ligantes-DNA utilizando espectrometria UV-Vis. Na segunda parte do trabalho um estudo experimental foi realizado para demonstrar o uso da técnica de espectrometria de absorção molecular nas interações intercalador-DNA, na qual o intercalante usado foi o brometo de etídio.

Na revisão bibliográfica, os tópicos associados ao tema abordado foram descritos didaticamente e discutidos, como a estrutura, propriedades, conformações e funções do DNA, modos de interação covalente de espécies com o DNA como ligações intra-inter hélices e agentes alquilantes, modos de interação não-covalente como intercalação, ligação no sulco menor e ligação externa, técnicas utilizadas nas investigações ligante-DNA, espectrometria de absorção molecular, seus conceitos e aplicações, espectrofotômetro e seus componentes, funções e determinações experimentais, a espectrometria UV-Vis nos estudos de espécies com o DNA, sua limitação, efeitos observados nas análises como hipocromismo, hiperchromismo, batocromismo, hipsocromismo e sua relação com os modos de ligação não-covalente com o DNA.

Na parte experimental, o comportamento do brometo de etídio e do DNA foram investigados por espectrometria UV-Vis e seus espectros foram estabelecidos em diferentes concentrações. Uma curva analítica foi levantada com os espectros registrados e a absorbividade molar para o brometo de etídio foi calculada. A interação BE-DNA foi investigada em pH fisiológico e em diferentes misturas numa faixa de 350-650 nm. Como esperado, foi observado uma diminuição e deslocamento vermelho significativo da banda do BE na região do visível, em 480 nm, com o aumento da concentração do DNA, que está associada a intercalação do BE na dupla hélice do DNA, estando em pleno acordo com a literatura.

Esses experimentos realizados foram importantes para demonstrar a aplicação da espectrometria UV-Vis nos estudos de interações de diferentes espécies químicas com a molécula do DNA, demonstrando a potencialidade desta técnica neste campo de investigação. Além disso, os experimentos realizados podem ser propostos para aulas de disciplinas experimentais focando a espectrometria no UV-Vis, uma vez que demonstra na prática vários conceitos importantes facilitando e contextualizando a aprendizagem do tema.

## 6 REFERÊNCIAS

- AGARWA, S.; JANGIR, D. K.; MEHROTRA, R. Spectroscopic studies of the effects of anticancer drug mitoxantrone interaction with calf-thymus DNA, **Biophysical Chemistry**, v. 116. n. 3. p. 199-205, 2005.
- AMBROSEK, D.; LOOS, P. F.; ASSFEL, X.; DANIEL, C. A theoretical study of Ru(II) polypyridyl DNA intercalators: structure and electronic absorption spectroscopy of  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  and  $[\text{Ru}(\text{tap})_2(\text{dppz})]^{2+}$  complexes intercalated in guanine–cytosine base pairs, **J. Inorg. Biochem.** v. 104. p. 893-901, 2010.
- ANWER R. et. al. Interaction of procarbazine with calf thymus DNA - a biophysical and molecular docking study. **Journal of Molecular Recognition**. v. 30. p. 6, 2016.
- ARJMAND, F.; JAMSHEERA, A. DNA binding studies of new valine derived chiral complexes of tin(IV) and zirconium(IV), **Spectrochim.** v. 78. p. 45-51, 2011.
- ASHWINI, H.; HEDGE, S. N.; PRASHANTH, J.; SEETHARAMAPPA, J. Interaction of antioxidant flavonoids with calf thymus DNA analyzed by spectroscopic and electrochemical methods, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 63. p. 40-46, 2012.
- BAGINSKI, M.; FOGOLARI, F.; BRIGGS, J. M. Electrostatic and non-electrostatic contributions to the binding free energies of anthracycline antibiotics to DNA, **J. Mol. Biol.** v. 274. p. 253, 1997.
- BAIRD, D.J. et al. Ecotoxicology: ecological dimensions. New York: Chapman & Hall, 1996.
- BARANOVSKY, S. F.; BOLOTIN, P. A.; EVSTIGNEEV M. P. Interaction of ethidium bromide and caffeine with DNA in aqueous solution. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 76, n. 1, p. 143-151, 2009.
- BARBOSA, K. B. F. et. al. Estresse oxidativo: conceitos, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.** v. 23. n. 4. p. 629-643.
- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Antitumour Complexes and DNA Interactions and their Tools of Analysis: an Approach to Metalointercalators, **Rev. Virtual Quim.** v. 7. p. 1998-2016, 2015.
- BARROS, I. C. et. al. Recomendações referentes à segurança nos laboratórios da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. p. 101, 2003.
- BAUER, W.; VINOGRAD, J. The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes: III. Dependence of the buoyant density upon superhelix density and base composition, **J. Mol. Biol.** v. 54. p. 281-298, 1970.

BERG, M. J.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; PAYNE, C. M. Garewal, **Mutation Research**. v. 511. p. 145, 2002.

BHADRA, K.; KUMAR, G. S. Interaction of berberine, palmatine, coralyne, and sanguinarine to quadruplex DNA: a comparative spectroscopic and calorimetric study, **Biochim. Biophys.** v. 2011. p. 485-496, 1810.

BRUN, R.; LEON, W. Effect of ethidium bromide on growth and morphology of Leishmania tarentolae promastigotes in vitro. v. 35. n. 3. p. 239-246, 1978.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica** v. 2. São Paulo: Thomson Learning, 2007.

CARNIELLO, R. S.; SILVA, R. F.; FIORINI, A. IV Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar. Maringá – Paraná, 2008.

COSTIN, M. P; GREEN J. A; FERRARI S. Ovarian Cancer Drug Resistance. In: Schwab M. (eds) **Encyclopedia of Cancer**. Springer, Berlin, Heidelberg).

DOGAN-TOPAL, B. et. al. Investigation of anticancer drug lapatinib and its interaction with dsDNA by electrochemical and spectroscopic techniques Sensors And Actuators B v. 194. p. 185-194, 2014.

FARAH, S. B. **DNA Segredos e Mistérios**. São Paulo: Editora Savier, p. 276, 1997.

FONTES, A. P. S.; ALMEIDA, S. G. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. **Química Nova**. v. 20. n. 4. p. 398-402, 1997.

GONZALEZ-RUIZ, V.; OLIVES, A. I.; MARTIN, M. A.; RIBELLES, P.; RAMOS, M. T.; MENENDEZ, J. C. An overview of analytical techniques employed to evidence drug–DNA interactions. Applications to the design of genosensors, in: M.A. Komorowska, S. Olsztyńska-Janus (Eds.), **Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies**. p. 65-90, 2011.

HAJIAN, R.; SHAMS, N., MOHAGHEGHIAN, M. Study on the interaction between doxorubicin and deoxyribonucleic acid with the use of methylene blue as a probe, J. Braz. **Chem. Soc.** v. 20. n. 8. p. 1399-1405, 2009.

HEPP, D.; NONOHAY, J. S. Scientia Tec: Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS – Campus Porto Alegre, v. 3, n. 2, p. 114-124, 2016.

JANGIR, D. K.; DEY, S. K.; KUNDU, S.; MEHROTRA, R. Assessment of amsacrine binding with DNA using UV-visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. v. 114. p. 38-43, 2012.

JAUMONT, J.; GARGALLO, R. Experimental methods for studying the interactions between G-quadruplex structures and ligands, *Curr. Pharmaceut.* v. 18. n. 14. p.1900–1916, 2012.

KECK, M. V.; LIPPARD, S. J. Unwinding of supercoiled DNA by platinum–ethidium and related complexes, *J. Am. Chem. Soc.* v. 114. p. 3386-3390, 1992.

KELLY, J. M.; TOSSI,. A. B.; MCCONELL, D.J.; OH UIHIN, C. A study of the interactions of some polypyridylruthenium(II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation, *Nucl. Acids Res.* v. 13. p. 6017-6034, 1985.

KONDO, N.; TAKAHASHI, A.; ONO, K.; OHNISHI, T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways, *J. Nucleic Acids* v. 2010. p. 1-7, 2010.

KOPKA, M. L.; YOON, C.; GOODSELL, D. S.; PJURA P.; DICKERSON R. E. Binding of an antitumor drug to DNA: netropsin and C-G-C-G-A-A-T-T-BrC-G-C-G, *J. Mol. Biol.* v. 183. p. 553-563, 1985.

LEHNINGER A. L.; NELSON D. L.; COX. M. M.; Principles of Biochemistry. 6th edition, p. 281-297, 2014.

LERMAN, L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines, *J. Mol. Biol.* v. 3. p. 18-30, 1961.

LING, X. et. al. Spectroscopic studies on the interaction of pazufloxacin with calf thymus DNA, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 93. n.3, p. 172-176, 2008.

LIU, J.; ZHANG, T.; LU, T.; QU, L.; ZHOU, H.; ZHANG, Q.; JI, L. DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes, *J. Inorg. Biochem.* v. 91. p. 269-276, 2002.

MALINS, D. C.; POLISSAR; GUNSELMAN, S.J. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v. 93. p. 2557, 1996.

MARTÍNEZ, R.; GARCÍA, L. C. The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work, *Curr. Med. Chem.* v. 12. p. 127-151, 2005.

MEI, H. Y.; BATON, J. K. Chiral probe for A-form helices of DNA and RNAtris(tetramethylphenanthroline)ruthenium(II), *J. Am. Chem. Soc.* v. 108. p. 7414-7416, 1986.

NASCIMENTO, R. F. et al. Electrochemical detection of 7-methylguanosine and DNA-methylation. *Analytical. Methods.* v. 37. p. 4525-4534, 2018.

NEIDLE, S.; ABRAHAM, Z. Structural and sequence-dependent aspects of drug intercalation into nucleic acid, *CRC Crit. Rev. Biochem.* v. 171. p. 73-121, 1984.

NI, Y.; WANG, Y.; KOKOT, S. Voltammetric, UV–Vis Spectrometric and Fluorescence Study of the Interaction of Ractopamine and DNA with the Aid of Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares, **Electroanalysis**. v.22. n. 19. p. 2216-2224, 2010.

NI, Y.; WEI, M.; KOKOT, S. Electrochemical and spectroscopic study on the interaction between isoprenaline and DNA using multivariate curve resolution-alternating least squares, **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 49. n. 4. p. 622-628, 2011.

OLIVEIRA, M. A. R. Determinação estrutural e estudo da estereoespecificidade de compostos de paládio II. p. 15. Tese - Universidade de São Paulo. São Carlos, 2010.

OLIVEIRA, S. C. B. Biosensores electroquímicos com DNA: Desenvolvimento e aplicações para detecção *in-situ* de danos oxidativos causados ao DNA. 2010. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

OLIVEIRA, S. C. B. **Biosensores eletroquímicos de DNA para investigação de mecanismo de ação de interação entre fármacos antineoplásicos e DNA**. 2011. 24 p. Projeto de Pesquisa (Bioeletroquímica) – Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, 2011.

OLIVEIRA, S. C. B. et. al. In situ electrochemical and AFM study of thalidomide–DNA interaction, **Bioelectrochemistry**. v. 76. n. 1-2. p. 201-207, 2009.

OLIVEIRA, S. C. B.; CORDUNEANO, O.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. In situ evaluation of heavy metal-DNA interactions using na electrochemical DNA biosensor. **Bioelectrochemistry**. v. 72. n. 1. p. 53-58, 2008.

OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. v. 13. p. 628, 2010.

OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA BRETT, A. M. *In Situ*DNA Oxidative Damage by Electrochemically GeneratedHydroxyl Free Radicals on a Boron-Doped Diamond Electrode. **Langmuir**. n. 28, p. 4896-4901, 2012. Disponível em: <[pubs.acs.org/Langmuir](http://pubs.acs.org/Langmuir)>

OUCHI, R. Y. Avaliação dos Efeitos do Brometo de Etídio em *Drosophila melanogaster* (DipteraDrosophilidae). p. 11-14. Tese – Unesp, São José do Rio Preto, 2011.

PARRON, L; MUNIZ, D. H. F.; PEREIRA, C. M. Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água. Colombo: Empraba Florestas, 2011.

QUEIROZ, N. L. et. al. Electrochemistry Study of Antineoplastic Raltitrexed Oxidation Mechanism and its Interaction with DNA. **Electroanalysis**. v. 30. p. 1-9, 2018.

RAISKI, S. R.; WILLIAMS, R. M. DNA cross-linking agents as antitumor drugs. **Chem.** v. 98. p. 2723-2796, 1998.

REHN, C.; PINDUR, U. Molecular modeling of intercalation complexes of antitumor active 9-aminoacridine and a [d,e]-anellated isoquinoline derivative with base paired deoxytetranucleotides, **Monatsh. Chem.** v. 127. p. 645-658, 1996.

ROCHA, C. C. Degradação do brometo de etídio em solução aquosa via ozonização. p. 5. Dissertação - Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2014.

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

SANTOS, I. C. Introdução ao mecanismo molecular do Câncer, tratamento e prevenção. p. 82. Monografia (Graduação em Licenciatura em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

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**. v. 96. p. 278-283, 2012.

SHUI, X. et. al. Effects of cationic charge on three-dimensional structures of intercalative complexes structure of a bisintercalated DNA complex solved by MAD phasing, **Curr. Med. Chem.** v. 7. p. 59-71, 2000.

SILVA, M. M. Interação entre compostos biologicamente ativos e ctDNA (Calf Thymus): Uma abordagem espectroscópica. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química e em Biotecnologia. p. 20-25. Universidade Federal de Alagoas, 2016.

SILVA, R. Influência do intercalante brometo de etídio na condensação do DNA induzida por espermina: um estudo por espectroscopia de força e eletroforese em gel. p. 24-25. Dissertação - Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2014.

SILVESTRI, C.; BRODBELT, J. S. Tandem mass spectrometry for characterization of covalent adducts of DNA with anticancer therapeutics, **Mass Spectrom Rev.** 2. p. 1-20, 2012.

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

SKOOG, et al. Fundamentos de Química Analítica, 8th edition Editora Thompson, p. 671-733, 2006.

SNYDER, R. D.; HENDRY, L. B. Toward a greater appreciation of noncovalent chemical/DNA interactions: application of biological and computational approaches, **Environ. Mol. Mutagen.** v. 45. p. 100-105, 2005.

SUN, H.; XIANG, J.; LIU, Y.; LI, L.; LI, Q; XU, G; TANG, Y. A stabilizing and denaturing dual-effect for natural polyamines interacting with G-quadruplexes depending on concentration, **Biochimie** v. 93. p. 1351-1356, 2001.

TIAN, X.; SONG, Y.; DONG, H.; YE, B. Interaction of anticancer herbal drug berberine with DNA immobilized on the glassy carbon electrode, **Bioelectrochemistry**. v. 73. n. 1. p. 18-22, 2008.

VARDEVANYAN, P. O. et. al. The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures. **Experimental & Molecular Medicine**. v. 35. p. 527–533, 2003.

WARING M. J.; BAILLY C. The purine 2-amino group as a critical recognition element for binding of small molecules to DNA, **Gene**. v. 149. p. 69-79, 1994.

WATSON J. D.; MYERS R. M.; CAUDY A. A.; WITKOWSKI J. A. DNA Recombinante – Genes e Genomas, 3th edition, 2009.

ZHANG, et. al, Spectroscopic studies on the interaction of morin–Eu(III) complex with calf thymus DNA, **Journal of Molecular Structure**. v. 923, n.1-3. p. 114-119, 2009.

ZHANG, G; HU, X.; ZHAO, N.; LI, W.; HE, L. Studies on the interaction of aminocarb with calf thymus DNA by spectroscopic methods, **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 98. n. 2. p. 206-212, 2010.

