

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE MESTRADO EM QUÍMICA**

PAULO CÉZAR PRADO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A 9,10-FENANTRENOQUINONA
GUANILHIDRAZONA E UM FRAGMENTO DE DNA**

Rio de Janeiro

2017

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

PAULO CÉZAR PRADO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A 9,10-FENANTRENOQUINONA
GUANILHIDRAZONA E UM FRAGMENTO DE DNA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. José Daniel Figueroa Villar – Ph.D.

Orientador: Prof. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida – Ph.D.

Orientadora: Profa. Claudia Jorge do Nascimento – D.Sc.

Rio de Janeiro
2017

c2017

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ CEP: 22.290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmар ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador(es).

540	Prado, Paulo César
P896e	<p>Estudo da interação entre a 9,10 – Fenantrenoquinona Guanilhidrazona e um fragmento de DNA / Paulo César Prado; orientado por José Daniel Figueroa Villar; Fábio Ceneviva L. De Almeida; Cláudia Jorge do Nascimento –Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2017.</p> <p>112p.: il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2017.</p> <p>•Curso de Química – teses e dissertações. 2. Câncer. 3. Radiação. I. Villar, José Daniel Figueroa. II. Almeida, Fábio Ceneviva L. III. Nascimento, Cláudia Jorge do. IV. Título. V. Instituto Militar de Engenharia.</p>

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

PAULO CÉZAR PRADO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A 9,10-FENANTRENOQUINONA
GUANILHIDRAZONA E UM FRAGMENTO DE DNA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. José Daniel Figueroa Villar – Ph.D.

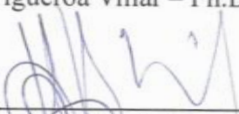
Orientador: Prof. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida – Ph.D.

Orientadora: Profa. Claudia Jorge do Nascimento – D.Sc.

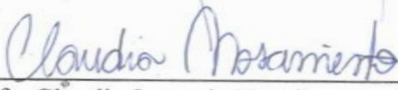
Aprovada em 25 de abril de 2017 pela seguinte Banca Examinadora:



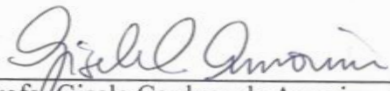
Prof. José Daniel Figueroa Villar – Ph.D. do IME – Presidente



Prof. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida – Ph.D. da UFRJ



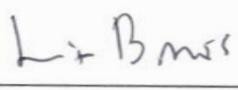
Profa. Claudia Jorge do Nascimento – D.Sc. da UNIRIO



Profa. Gisele Cardoso de Amorim – D.Sc. da UFRJ



Profa. Maria Agnese Morando – D.Sc. da Fiocruz



Prof. Luiz Eduardo Pizarro Borges – D.Sc. do IME

Rio de Janeiro

2017

Dedico este trabalho ao gênesis da
minha saga no Instituto Militar de
Engenharia, ao “mimado” Plínio
Cardoso dos Santos.
Meu irmão gêmeo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que me diz: “Você consegue! Dê o melhor de si! Não para não! Vamos! Você consegue, não desiste não, só mais um pouco! Mais um passo! Passo após passo! Você consegue!”;

Todo discípulo se espelha em seu mestre e no meu caso não foi diferente, agradeço seus ensinamentos e inspiração para continuar estudando a Ressonância Magnética Nuclear: Fernanda Rodrigues Garcez.

Aos meus orientadores: José Daniel Figueroa Villar, Fábio Ceneviva Lacerda Almeida e Claudia Jorge do Nascimento. Não vou negar que me estressei, como todo aluno, mas o que dizer sobre o carinho, cuidados e paciência (e quanta paciência!) que tiveram comigo? Espero poder orgulhá-los, mesmo que só um pouquinho, pelas suas belas palavras de ensinamento e motivação: “Eu gosto muito de você Paulo. Eu quero que você vá para fora do país, estude bastante e volte para ajudar as pessoas do Brasil” (Figueroa); “Eu quero ajudar e vejo que o Paulete está fazendo um bom trabalho e caminhando no tempo certo” (Fábio); “Caraca Paulo, quanto coisa você aprendeu! Eu estou muito satisfeita com seu crescimento” (Claudia).

À minha mãe, a mulher, que dei meu primeiro beijo e me fortalece dizendo: “você é o cara”;

Ao meu pai, por ser meu melhor amigo e me deixar usar suas sandálias quando meus pés já não aguentam mais caminhar;

À minha família postiça, por ter me amado e ensinado a ser um homem de melhor coração. Deixo aqui citado as minhas mães como referência de toda essa família emprestada: Ana Cristina (provavelmente me xingue, mas todo mundo perguntava se eu não era filho), Anita, Helenise, Ivone, Lu Pires, “Dona” Nilza e Vicentina;

Ao apoio dos meus amigos e alunos que acreditando na minha capacidade, me motivaram e não deixaram o sorriso no meu rosto desaparecer em qualquer circunstância.

Muito obrigado!

“Porque não posso ser MVP da
NBA? Porque não posso ser o
melhor jogador da NBA? Não vejo
porque não...”

DERRICK ROSE

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10	
LISTA DE TABELAS.....	15	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	17	
LISTA DE SIGLAS.....	18	
1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1	Ácido desoxirribolucleico.....	24
2.2	Dodecâmero de Dickerson-Drew	29
2.3	Radiossensibilizadores.....	30
2.4	Agentes intercalantes.....	33
2.4.1	Intercalação.....	35
2.4.2	Mecanismo de intercalação clássica.....	37
2.4.3	Mecanismo de intercalação não-clássica: intercalação por rosqueamento.....	39
2.5	9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.....	40
2.6	Ressonância magnética nuclear (RMN) no estudo de DNA.....	41
3	OBJETIVOS.....	43
3.1	Objetivo geral.....	43
3.2	Objetivos específicos.....	43
4	METODOLOGIA.....	44
4.1	Síntese da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.....	44
4.2	Preparação da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona para análise por RMN.....	45
4.3	Caracterização por RMN da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.....	45
4.4	Determinação da estrutura tridimensional da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona no vácuo.....	46
4.5	Purificação do DDD.....	46

4.6	Preparação do DDD para análise por RMN.....	47
4.7	Assinalamento por RMN do DDD.....	47
4.8	Medidas da constante de associação/dissociação.....	48
4.9	Preparação do complexo: DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona para análise por RMN.....	49
4.10	Assinalamento das ressonâncias do complexo: DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.....	49
4.11	Modelo hipotético de interação do complexo: DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
5.1	Síntese da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.....	51
5.2	Caracterização por RMN da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.....	53
5.3	Determinação da estrutura tridimensional da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona no vácuo.....	56
5.4	Purificação do DDD.....	57
5.5	Assinalamento por RMN do DDD.....	58
5.6	Medidas da constante de associação/dissociação.....	69
5.7	Assinalamento das ressonâncias do complexo: DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.....	75
5.7.1	Assinalamento por RMN do DDD no complexo.....	75
5.7.2	Assinalamento por RMN da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona no complexo.....	86
5.8	Modelo hipotético de interação do complexo: DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.....	88
6	CONCLUSÕES.....	91
7	PERSPECTIVAS E SUGESTÕES.....	93
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

9	APÊNDICES.....	105
9.1	Espectros de RMN da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.....	106

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 2.1	(a) Cadeia polipeptídica simples do RNA constituída de fosfato pentose e base nitrogenada com grupo uracila exclusivo (b) Cadeia polipeptídica dupla do DNA constituída de fosfato pentose e base nitrogenada com grupo timina exclusivo (Adaptado de RESCIFINA <i>et al.</i> , 2014).....	25
FIG. 2.2	Parte da dupla hélice do DNA mostrando o esqueleto açúcar-fosfato, as regiões terminais 5' e 3' das fitas e as ligações de hidrogênio entre os pares de bases (Adaptado de MCKEE, T. MCKEE, J. R., 2004).....	27
FIG. 2.3	Bases do DNA e esqueleto açúcar-fosfato mostrando seus átomos numerados. A linha tracejada mostra a ligação entre os dois nucleotídeos (adaptado de http://www.bmrw.wisc.edu/referenc/nomenclature/).....	28
FIG. 2.4	Variações das formas estruturais do DNA (Adaptado de ANDERSON, 2012).....	29
FIG. 2.5	Dickerson-Drew Dodecamer ilustrado com seu o esqueleto de água representado pelo pontilhado cinza (Adaptado de http://necat.chem.cornell.edu/Structures2/4PWM.html).....	30
FIG. 2.6	(a) Doxorrubicina, (b) daunorrubicina, (c) epirubicina, (d) mitoxantrona, (e) pirarrubicina, (f) idarrubicina, (g) actinomicina, (h) Proflavina; (i) Acridina; (j) Amsacrina; (k) bisfenazina (MLN944 e XR5944); (l) 1-(2-desoxi-B-D-ribofuranosil)-4-(3-benzamido) fenilimidazol (D ₃); (m) 1-O-(1-pirenilmetil) glicerol.....	34
FIG. 2.7	Esquema representativo da inserção de um intercalante, paralelamente, entre pares de bases nitrogenadas adjacentes da dupla hélice do DNA. O processo resulta no deslocamento dos pares de bases que ladeiam o local da intercalação em direções opostas ao longo do eixo helicoidal (Adaptado de Protein Data Bank Entry ID 1JDG) (PRADHAN, <i>et al.</i> , 2001).....	36
FIG. 2.8	Exemplos de compostos intercalantes clássicos: (a) Proflavina; (b) Brometo de etídeo.....	37

FIG. 2.9	Representação de intercalação clássica (RESCIFINA <i>et al.</i> , 2014). As Figuras mostram a movimentação do intercalante clássico para realizar a inserção entre bases adjacentes. (a) A forma catiônica do intercalante interage eletrostaticamente com carga negativa do grupo fosfato do esqueleto do DNA; (b) Representação do afastamento entre pares de bases nitrogenadas para alocação do intercalante; (c) Intercalante inserido entre pares de bases nitrogenadas do DNA.....	38
FIG. 2.10	Exemplos de compostos intercalantes não-clássicos: (a) Metapirilina; (b) Nogalamicina.....	39
FIG. 2.11	Representação de intercalação por rosqueamento (Adaptado de RESCIFINA <i>et al.</i> , 2014).....	40
FIG. 2.12	Estrutura molecular da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.....	41
FIG. 4.1	Síntese da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.....	44
FIG. 5.1	(a) Assinalamento completo da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em DMSO- <i>d</i> 6. Sinais de ¹ H em DMSO- <i>d</i> 6 (azul) e em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério (verde) e sinais de ¹³ C em DMSO- <i>d</i> 6 (vermelho); (b) Numeração da estrutura da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.....	55
FIG. 5.2	Estrutura tridimensional da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona no vácuo usando Spartan'8.....	56
FIG. 5.3	Espectro de purificação do DDD (Absorção de energia em mAU <i>versus</i> Volume em mL de eluição). A análise do espectro revela a separação das moléculas do DDD na forma de fita dupla, nas frações de oito a doze, da forma de fita simples.....	58
FIG. 5.4	Estrutura molecular do DDD.....	59
FIG. 5.5	Espectro de RMN de NOESY para o DDD em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério (verde água). O espectro mostra a interação espacial entre a metila (H7) da timina com o hidrogênio H3 pertencente a mesma base nitrogenada (negrito).....	63

FIG. 5.6	Sobreposição dos espectros de RMN de NOESY e TOCSY (verde água e azul, respectivamente) para o DDD em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério. Os espectros mostram a interação espacial entre a metila (H7) da timina com o hidrogênio H6 pertencente a mesma base nitrogenada (negrito).....	63
FIG. 5.7	Espectro de RMN de NOESY para o DDD em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério (verde água). O espectro mostra a interação espacial entre a metila (H7) da timina com os hidrogênios H2' e H2'' pertencentes a sua respectiva desoxirribose (negrito).....	64
FIG 5.8	Espectro de RMN de NOESY para o DDD em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério (verde água). O espectro mostra a interação espacial entre as metilas (H7) das timinas vizinhas.....	65
FIG. 5.9	Espectro de RMN de NOESY para o DDD em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério (verde água). O espectro mostra a interação espacial hidrogênio H3 da timina com o próton H2 da sua respectiva base nitrogenada pareada (negrito).....	67
FIG. 5.10	Espectro de absorção no UV/Vis da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (Absorbância <i>versus</i> comprimento de onda em nm) para cada alíquota de 2 µL deste ligante (1,67 mM) adicionada em 1005 µL do tampão fosfato de sódio. A análise do espectro revela comprimento de onda de absorção máxima da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em médio de 361 nm durante o processo de titulação.....	71
FIG. 5.11	Espectro de absorção no UV/Vis do DDD (Absorbância <i>versus</i> comprimento de onda em nm). A análise do espectro revela comprimento de onda de absorção máxima do DDD em 260 nm.....	72

- FIG. 5.12 Espectro de absorção no UV/Vis da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (Absorbância *versus* comprimento de onda em nm) para cada alíquota de 2 μ L deste ligante (1,67 mM) adicionada em 1005 μ L do tampão fosfato de sódio contendo 3,98 nmols do DDD - Processo de titulação do DDD. A análise do espectro revela comprimento de onda de absorção máxima da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona, constantemente, em torno de 360 nm durante o processo de titulação..... 74
- FIG. 5.13 Sobreposição dos espectros de RMN de NOESY para o DDD na ausência e na presença do ligante (verde água e verde, respectivamente) em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério. Os espectros mostram as variações, mais significativas, para os deslocamentos químicos dos hidrogênios H5 e H1' da citosina em posição 1 (0,09 e 0,07 ppm respectivamente)..... 81
- FIG. 5.14 Sobreposição dos espectros de RMN de NOESY para o DDD na ausência e na presença do ligante (verde água e verde, respectivamente) em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério. Os espectros mostram a variação, mais significativa, do deslocamento químico para o hidrogênio H6 da citosina em posição 1 (negrito; 0,06 ppm)..... 82
- FIG. 5.15 Sobreposição dos espectros de RMN de NOESY para o DDD na ausência e na presença do ligante (verde água e verde, respectivamente) em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério. Os espectros mostram a variação, mais significativa, do deslocamento químico para o hidrogênio H2' da citosina em posição 1 (negrito; 0,05 ppm)..... 82
- FIG. 5.16 Sobreposição dos espectros de RMN de NOESY para o DDD na ausência e na presença do ligante (verde água e verde, respectivamente) em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério. Os espectros mostram a variação, mais significativa, do deslocamento químico para o hidrogênio H1' da citosina em posição 3 (negrito; 0,05 ppm)..... 83

- FIG. 5.17 (a) Estrutura tridimensional do DDD elucidando os sítios de interação mais significativos do DDD (vermelho) na presença da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona; (b) Estrutura tridimensional do DDD ilustrando os sítios de interação mais significativos do DDD (vermelho) com o ligante para a construção de um modelo hipotético de interação do complexo (DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona) - usando PyMol..... 85
- FIG. 5.18 (a) Estrutura molecular numerada da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona; (b) Sítios de interação mais significativos por medidas de T1 e T2, variação de deslocamento químico e STD para a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona com o DDD - usando PyMol..... 87
- FIG. 5.19 (a) Hipótese de interação do complexo: DDD (azul)/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (laranja) - usando PyMol; (b) Ampliação da região de interação do DDD (azul) com 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (laranja). Em preto, os sítios de interação mais significativos tanto do oligonucleotídeo (obtidos por padronização nossa) quanto do ligante no complexo..... 89

LISTA DE TABELAS

TAB.5.1	Dados de RMN de ^1H para a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em DMSO- <i>d</i> ₆ e em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério.....	54
TAB. 5.2	Dados de RMN para o DDD em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério: H = Prótons das bases nitrogenadas; H' = Prótons da pentose.....	60
TAB. 5.3	Distância máxima entre prótons do DNA não intercambiáveis com a água: H = Prótons da base nitrogenada; H' = Prótons da pentose (WÜTHRICH, 1986).....	66
TAB. 5.4	NOE's observáveis entre os prótons intercambiáveis com a água das bases nitrogenadas do DDD (WÜTHRICH, 1986).....	68
TAB. 5.5	Comprimento de onda de absorção máxima da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona para cada alíquota de 2 μL deste ligante (1,67 mM) adicionada em 1005 μL do tampão fosfato de sódio.....	70
TAB. 5.6	Comprimento de onda de absorção máxima da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona para cada alíquota de 2 μL deste ligante (1,67 mM) adicionada em 1005 μL do tampão fosfato de sódio contendo 3,98 nmols do DDD - Processo de titulação do DDD.....	73
TAB. 5.7	Dados de RMN para o DDD na presença da 9,10- fenantrenoquinona guanilhidrazona em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério: H = Prótons das bases nitrogenadas; H' = Prótons da pentose.....	76
TAB. 5.8	Dados de RMN (NOESY, deslocamentos químicos) para o DDD na ausência e na presença do ligante em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério: H = Prótons das bases nitrogenadas; H' = Prótons da pentose. Obs. A média e desvio padrão da coluna contendo os valores de $\Delta\delta_{\text{DDD}}$ são de 0.011 e 0.021, respectivamente. Considera-se que $\Delta\delta_{\text{DDD}}$ acima de 0.042 ppm são significativas (variação maior que dois desvios padrão) (negrito).....	78

TAB. 5.9 Dados de RMN (NOESY, deslocamentos químicos) mais representativos para o DDD na ausência e na presença do ligante em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério: H = Prótons das bases nitrogenadas; H' = Prótons da pentose Em negrito, sítios de interação mais significativos do DDD com o ligante para a construção de um modelo hipotético de interação do complexo (DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona)..... 84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS

DMSO- <i>d6</i>	–	dimetilsulfóxido hexadeuterado
ADE	–	adenina
CIT	–	citossina
GUA	–	guanina
TIM	–	timina
ms	–	milissegundos

SÍMBOLOS

Å	–	Angstroms
J	–	Constante de acoplamento
p	–	Parâmetro biofísico
T ₁	–	Tempo de relaxação longitudinal
T ₂	–	Tempo de relaxação transversal
δ	–	Deslocamento químico
Δδ	–	Varição de deslocamento químico
θ	–	Grau de ligação

LISTA DE SIGLAS

APT	<i>Attached Proton Test</i>
COSY	<i>COrelated SpectroscopY</i>
DDD	<i>Dickerson-Drew Dodecamer</i>
DM	Dinâmica Molecular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DOSY	<i>Diffusion Ordered SpectroscopY</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bound Correlation</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect (Efeito Overhauser Nuclear)</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
STD	<i>Saturation Transfer Difference</i>
TOCSY	<i>TOtal COrelated SpectroscopY</i>

RESUMO

O câncer é uma das doenças mais importantes do ponto de vista medicinal e científico, sendo estimado, no Brasil, 600 mil novos casos para o biênio 2016-2017. A radioterapia é um tratamento local e de alta eficácia para diferentes tipos de câncer. Entretanto, a radiação não causa danos somente ao DNA de células tumorais, levando-as à morte, mas também a algumas células saudáveis. Radiossensibilizadores, como os agentes intercalantes de DNA, são uma classe atrativa para o tratamento do câncer por radioterapia, pois aumentam o potencial letal da radiação em uma dosagem reduzida. Estudos prévios desenvolvidos pelo grupo de química medicinal do Instituto Militar de Engenharia culminaram no preparo da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona, que reduziu em 50% a dose de radiação ionizante para quebra do DNA em dupla fita. Neste trabalho, identificou-se, por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a região de interação entre a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona e um fragmento palindrômico de dupla fita de DNA, o dodecâmero de Dickerson-Drew (DDD). Para o estudo da interação deste oligonucleotídeo com o ligante aqui apresentado, foi realizado o assinalamento do DDD na ausência e na presença da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona através dos experimentos bidimensionais NOESY e TOCSY. Através das variações mais significativas dos deslocamentos químicos dos hidrogênios do DDD quando na presença do ligante, foi possível determinar os sítios de interação do DDD com o ligante: H5 e H6, pertencentes à citosina em posição 1; H1' e H2' da desoxiribose da citosina em posição 1; e H1' da desoxiribose da citosina em posição 3. Para esses hidrogênios, por ordem de citação, foram medidas as variações de 0,09 ppm, 0,06 ppm, 0,07 ppm, 0,05 ppm e 0,05 ppm. Os dados indicam que a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona não intercala com o DDD, mas interage fracamente com a extremidade 5' do fragmento de dupla fita do DNA. Com base nos resultados experimentais de perturbação dos deslocamentos químicos dos prótons do DDD na presença do ligante e através da análise dos sítios de interação da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona, previamente obtidos no estudo de interação com este mesmo fragmento de dupla hélice de DNA, neste trabalho, é apresentado um modelo hipotético da interação do complexo (DDD/Ligante). Este trabalho contribuiu com uma estratégia racional para o desenvolvimento de compostos intercalantes baseados nos anéis (A, B, C) da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.

ABSTRACT

Cancer is one of the most important diseases from a medical and scientific point of view, being estimated in Brazil 600 thousand new cancer cases for the biennium 2016-2017. Radiation therapy is a highly effective treatment for many types of cancer. However, radiation damages not only the DNA of the cancer cells, leading to their death, but also some healthy cells. Radiosensitizers DNA intercalators, have been proved to be an attractive class for the treatment of cancer with radiotherapy, because they increase the lethal radiation in a reduced dosage. Previous studies developed by the medical chemistry group of the Military Engineering Institute resulted in the preparation of 9,10-phenanthrenequinone guanylhydrazone, which reduced the dose of ionizing radiation for DNA in double-strands breakage by 50%. In this work, the interaction sites of 9,10-phenanthrenequinone guanylhydrazone with a double-stranded palindromic DNA fragment, the Dickerson-Drew Dodecamer (DDD) was mapped by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). For the study of the interaction of this oligonucleotide with the ligand presented here, the DDD was assigned by NMR in the absence and in the presence of the 9,10-phenanthrenequinone guanylhydrazone through the two-dimensional experiments NOESY and TOCSY. The most significant chemical shifts perturbations for the DDD resonances when in the presence of the ligand, occurred for the hydrogens H5 and H6, from cytosine in position 1; for H1' and H2', from desoxyribose of cytosine in position 1; and H1', from desoxyribose of cytosine in position 3. For these protons, the observed variations were 0.09 ppm, 0.06 ppm and 0.07 ppm, 0,05 ppm and 0,05 ppm, respectively. These data indicate that the 9,10-phenanthrenequinone guanylhydrazone did not intercalate with DDD, but it interacts weakly with the 5' end of the DNA double helix. Based on the chemical shifts perturbations observed for the protons of DDD in the presence of the ligand and also through the analysis of the interaction sites of the 9,10-phenanthrenequinone guanylhydrazone (previously obtained in the interaction study with this same DNA double helix fragment), this work presents a hypothetical model for the interaction of the complex (DDD / Ligand). This work contributed with a rational strategy for the development of DNA intercalating agents based on 9,10-phenanthrenequinone guanylhydrazone rings (A, B, C).

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer é uma das doenças mais importantes do ponto de vista medicinal e científico devido à sua ampla e constante presença na sociedade moderna (RALPH *et al.*, 2016). Segundo o projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14 milhões de casos novos de câncer e um total de 8 milhões de mortes por câncer, em todo mundo, em 2012 (INCA, 2016). No Brasil, a estimativa do biênio 2016-2017, apontou para uma incidência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer (INCA 2016). Países desenvolvidos e emergentes apresentam maior expectativa de vida, refletida pelo crescimento da população senil. O crescimento e envelhecimento da população podem ser atribuídos à redução da mortalidade devido a transições epidemiológicas, ou seja, substituição de enfermidades antigas como parasitárias e infecciosas, por novas doenças degenerativas, como o câncer. Por isso, especialmente para países desenvolvidos é esperado, que para as próximas décadas, o impacto do câncer sobre a população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos de câncer estimados para 2025 (INCA, 2016).

A palavra tumor tem origem latina, significando inchaço (SCOTTINI, 1998). Clinicamente, tumor, também chamado de neoplasia, está associado ao aumento descontrolado da divisão celular. Se o crescimento celular originar uma massa de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, o tumor é subclassificado como benigno. Por outro lado, se a proliferação celular for rápida e desordenada de maneira a invadir tecidos e órgãos, a neoplasia é subclassificada como maligna (INCA, 2017). Câncer é o nome atribuído ao conjunto de mais de 100 doenças que possuem em sua raiz o processo de metástase, ou seja, clinicamente definido como o processo de origem do tumor maligno (INCA, 2017).

As mutações genéticas, caracterizadas como as variações das informações genéticas, podem ocorrer em qualquer célula normal. As células eucarióticas são complexas e compartimentalizadas. De forma simplificada, são constituídas pela membrana plasmática; citoplasma; núcleo, sendo este último, o abrigo para os cromossomos que são constituídos pelo ácido desoxirribonucleico (DNA, sigla em inglês), responsável pelo armazenamento de

todas as informações genéticas. Cada segmento de DNA que guarda e fornece instruções sobre o funcionamento celular é chamado de gene.

No processo de combate às células tumorais são utilizados inúmeros tratamentos, dentre eles a quimioterapia e a radioterapia. Na quimioterapia são utilizados compostos químicos (quimioterápicos) para o tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao tratamento do câncer, a quimioterapia é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antitumoral (INCA, 2017). A radioterapia é um tratamento destinado ao combate de células tumorais utilizando feixe de radiações ionizantes. Ambas as técnicas causam danos tanto às células tumorais quanto às células saudáveis. Entretanto, contrariamente à quimioterapia, a resistência total à radioterapia em tumores é menos frequente (JOINER *et al.*, 1999; NYGAARD *et al.*, 1992). O tumor torna-se mais resistente à radioterapia em casos de hipóxia (SHIRLEY, 2015).

O DNA armazena todas as informações genéticas do organismo por meio de sua sequência de bases nitrogenadas. Radiações ionizantes possuem a capacidade de atuar diretamente sobre o DNA celular de modo a danificar a sequência das cadeias nitrogenadas, podendo, assim, levar ao mal funcionamento da célula, principalmente as células que apresentam alta taxa de divisão celular, tais como as células tumorais. A radioterapia, que se baseia no princípio da emissão de radiações ionizantes, tem por finalidade inibir a ameaça neoplásica por meio da alteração do funcionamento das células tumorais, que varia por diversos mecanismos, desde a inativação de sistemas vitais para a célula até sua incapacidade de reprodução (RESCIFINA *et al.*, 2014). Embora a absorção de radiação seja maior nas células tumorais (necessária para danificar a sequência das cadeias nitrogenadas do DNA e, por consequência, levar à morte a célula tumoral), os tecidos saudáveis também podem ser afetados por ela.

Devido aos grandes desafios na busca pela cura de tumores, pesquisas são realizadas com enfoque em estudos direcionados à potencialização de terapias tradicionais anticâncer como a radioterapia. Nesse sentido, radiosensibilizadores – agentes químicos que aumentam a sensibilidade das células tumorais à radiação (HARASAKI *et al.*, 2005) – demonstram ser uma classe atraente para o tratamento do câncer, pois aumentam o potencial letal das radiações, em uma dosagem reduzida, quando combinados em tratamentos radioterápicos, diminuindo, assim, os efeitos sobre células vizinhas saudáveis (GIRDHANI *et al.*, 2016; NEGRÓN *et al.*, 2002).

Uma das classes de agentes radiosensibilizadores são os compostos intercalantes (JOHNSON *et al.*, 2015; SANGEETHA *et al.*, 2014). Estes compostos se ligam ao DNA, facilitando sua quebra durante o processo de ionização, sendo responsáveis pela modificação da estrutura do ácido desoxirribonucleico, o que acarreta a inativação dos processos de duplicação e/ou transcrição (RESCIFINA *et al.*, 2014), aumentando a eficácia da radioterapia (NEGRÓN *et al.*, 2002). Portanto, estudos relacionados ao mecanismo de interação entre estes agentes ligantes e o DNA são fundamentais para o desenvolvimento de novos compostos intercalantes.

Neste trabalho, foi estudada a interação da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona com um oligonucleotídeo de 12 pares de base (Dodecâmero de Drew-Dickerson, DDD).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)

As células dos seres vivos são constituídas por ácidos nucleicos, macromoléculas de natureza orgânica presentes no núcleo celular de organismos eucariotos e dispersos no hialoplasma dos procariotos e nas partículas virais. Os ácidos nucleicos são constituídos por nucleotídeos que, por sua vez, são formados pelo agrupamento de três grupos químicos: um grupo fosfato; um açúcar ou pentose; e uma base nitrogenada (BEDREGAL, 2011). O fosfato está ligado diretamente ao açúcar através de uma ligação fosfodiéster, e a pentose dispõe-se ligada covalentemente, pelo carbono 1 a uma base nitrogenada como mostrado na FIG. 2.1. Os ácidos nucleicos são subdivididos em duas classes: RNA, sigla em inglês para o ácido ribonucleico, e o DNA, o ácido desoxirribonucleico (BEDREGAL, 2011).

A apresentação da estrutura da pentose e da base nitrogenada são os critérios que mais se destacam para a distinção entre os nucleotídeos. O RNA é uma cadeia polinucleotídica simples, em que a ribose é o açúcar constituinte, enquanto o DNA é uma dupla fita e formado pelo açúcar desoxirribose (FIG. 2.1) (RODWELL *et al.*, 2017). O DNA nos cromossomos é estruturado, principalmente, como dupla-fita com pareamento de Watson e Crick (WATSON, 1994).

As bases nitrogenadas podem ser de dois tipos: purínicas e pirimidínicas. As bases purínicas são a adenina e guanina, comuns, tanto para o RNA quanto para o DNA; as pirimidínicas são a citosina e a timina para o DNA e a citosina e a uracila para o RNA (FIG. 2.1) (COOPER *et al.*, 2015).

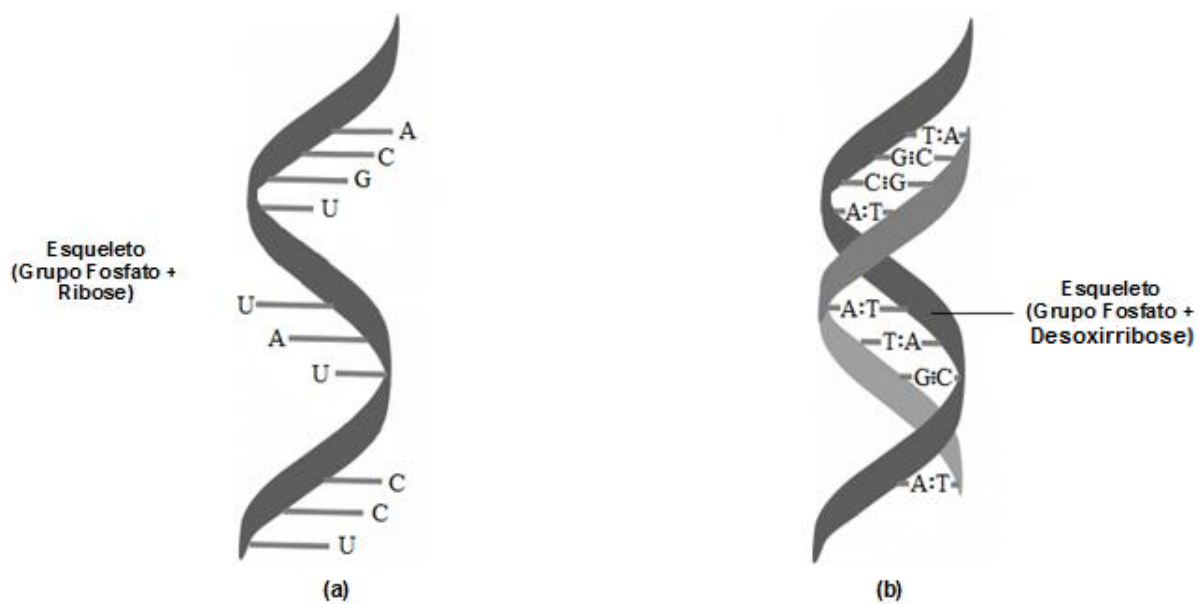
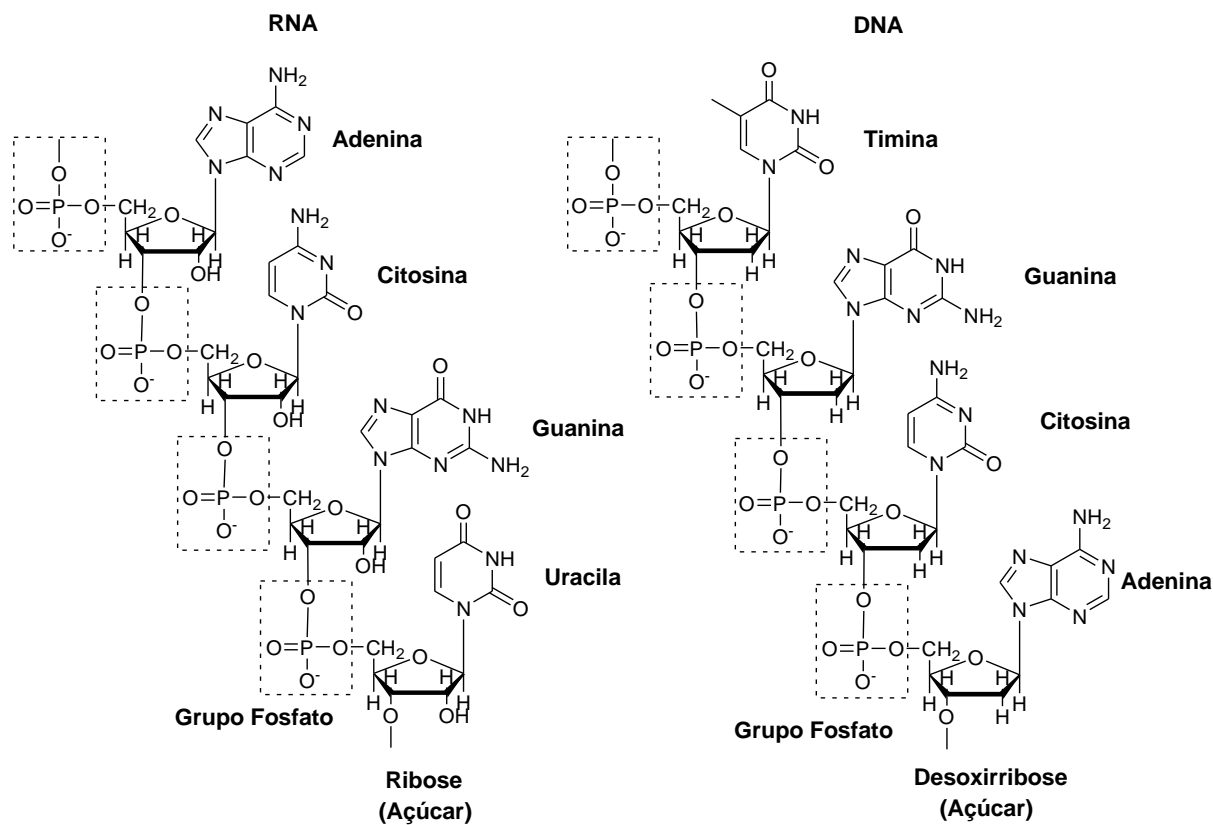


FIG. 2.1 – (a) Cadeia polinucleotídica simples do RNA constituída de fosfato, pentose e base nitrogenada com grupo uracila exclusivo; (b) Cadeia polinucleotídica dupla do DNA constituída de fosfato, pentose e base nitrogenada com grupo timina exclusivo (Adaptado de RESCIFINA *et al.*, 2014).

A estrutura do DNA foi proposta em 1953 por Watson e Crick, que se basearam nos resultados da difração de raios X, obtidas de Rosalind Franklin e Chargaff (WATSON, 1994). Este modelo proposto e aceito até os dias de hoje, consiste em duas cadeias (fitas) polinucleotídicas, formando uma dupla hélice. O DNA dupla fita possui duas fendas, denominadas fenda maior e fenda menor. A ligação entre os resíduos de açúcar com o fosfato forma o esqueleto açúcar-fosfato, sendo este posicionado na parte mais externa da fita. As cadeias estendem-se em direções antiparalelas: uma no sentido 3' para 5' e outra no sentido 5' para 3' (FIG. 2.2). Na extremidade 5' encontra-se um resíduo de ácido fosfórico como grupo terminal; na extremidade 3', o fosfato ligado à ribose é substituído por um grupo -OH terminal. Em pH fisiológico, o DNA tem, em cada grupo fosfato do esqueleto, uma carga negativa (RUIZ-CHICA, 2001; WESTHEIMER, 1987)

As fitas do DNA são unidas por ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas que constituem cada fita. A base nitrogenada de uma fita possui complementaridade com a base nitrogenada da outra fita, ou seja, a união da dupla hélice se dá pela especificidade da ligação de hidrogênio entre uma base purínica com uma pirimidínica. O pareamento de ligação é específico e sempre ocorre entre a adenina e a timina, por duas ligações de hidrogênio e entre a citosina e a guanina, por três ligações de hidrogênio (FIG. 2.2) (JUSTINA *et al.*, 2008). Em um DNA de dupla fita, as bases purínicas e pirimidínicas são equimolares (WATSON, 1994).

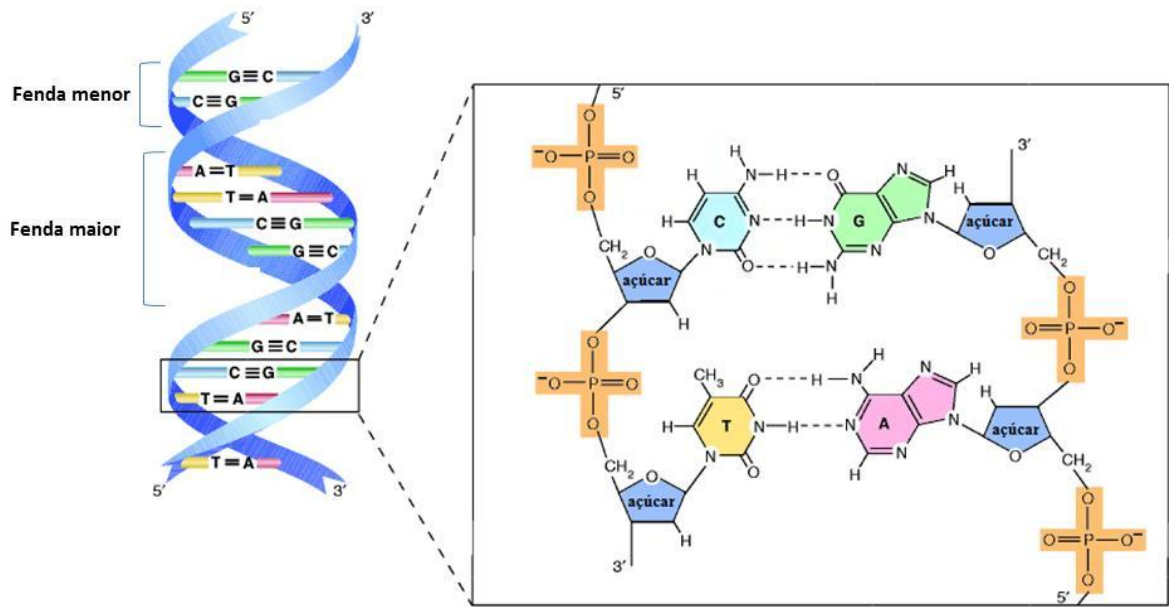


FIG. 2.2 – Parte da dupla hélice de DNA mostrando o esqueleto açúcar-fosfato, as regiões terminais 5' e 3' das fitas e as ligações de hidrogênio entre os pares de bases (Adaptado de MCKEE, T. MCKEE, J. R., 2004).

A numeração dos átomos dos ácidos nucleicos (FIG. 2.3) é baseada nas regras IUPAC para peptídeos e ácidos nucleicos (IUPAC–IUB, 1979).

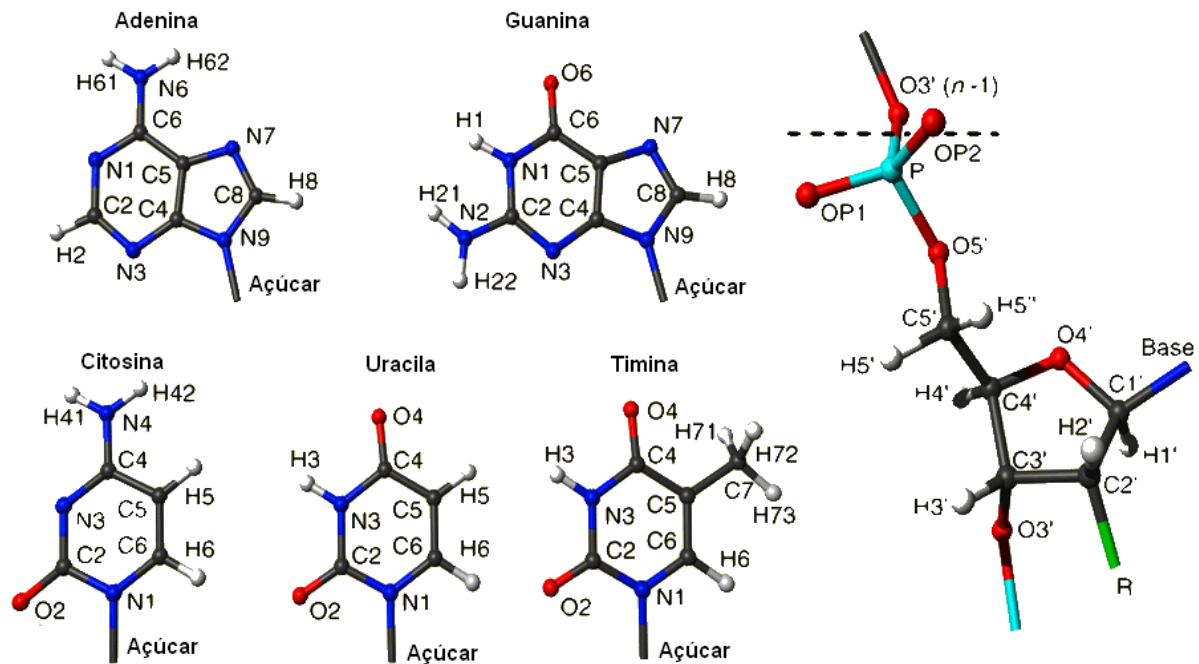


FIG. 2.3 – Bases nitrogenadas e esqueleto açúcar-fosfato mostrando seus átomos numerados.

A linha tracejada mostra a ligação entre os dois nucleotídeos (adaptado de <http://www.bmrwisc.edu/referenc/nomenclature/>).

A molécula de DNA apresenta diferentes disposições estruturais na natureza, devido às ligações de hidrogênio e empilhamento π - π entre bases nitrogenadas, às repulsões eletrostáticas entre as cargas negativas dos grupos fosfato do esqueleto da dupla hélice e à hidratação (SIMÕES, 2013). Dentre as diversas formas estruturais tem-se a quadruplex, a triplex e a duplex, sendo a última subclassificada em A-DNA, B-DNA e Z-DNA (FIG. 2.4) (LODISH *et al.*, 2000).

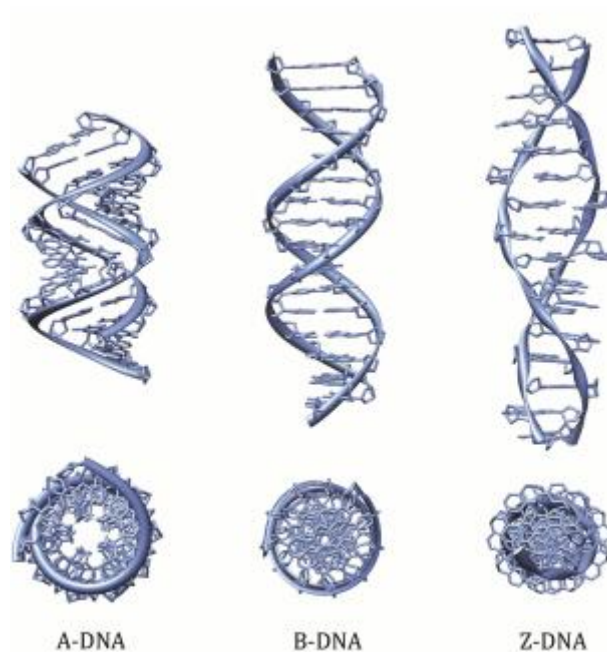


FIG. 2.4 – Variações das formas estruturais do DNA (Adaptado de ANDERSON, 2012).

2.2 DODECÂMERO DE DICKERSON-DREW

Em 1981, Horance Drew e Richard Dickerson divulgaram a estrutura cristalina do B-DNA sintético com a sequência de bases nitrogenadas CGC-GAA-TTC-GCG, a qual batizaram como Dickerson-Drew Dodecamer (DDD) (FIG 2.5) (DREW *et al.*, 1981). A sequência palindrômica corresponde ao sítio de ação da endonuclease de restrição EcoR1.

Além do DDD possuir sequência de bases nitrogenadas com complementaridade palindrômica, o que torna seu assinalamento relativamente fácil, foi amplamente utilizado para estudos de interação com diversas moléculas como o complexo Fe(II)·Bleomicina A₂ (KECK *et al.*, 2001), a cisplatina (WING *et al.*, 1984), a netropsina (Kelly *et al.*, 2009) a Distamicina A (KLEVIT *et al.*, 1986).

As pesquisas de Drew e Dickerson forneceram, por cristalografia, as primeiras imagens, em boa resolução, da estrutura da dupla fita do B-DNA, sendo esta constituída de dez pares de bases por volta completa da hélice, torção de 19° no eixo da hélice a partir da presença de 11 pares de bases e possuindo torção própria individual para cada par de bases (ângulo diedro em relação ao plano da base) (DREW *et al.*, 1981).

Além destas características, possui um estreitamento da fenda menor em regiões ricas em sequência de bases AATT e pela presença de um esqueleto de água nesta fenda. As moléculas de água do esqueleto estabelecem ligações de hidrogênio entre a primeira concha de solvatação com o átomo O2 da timina e o N3 da adenina (SIMÕES, 2013).

Simulações de mecanismos de dinâmica molecular sugerem que íons sódio teriam a capacidade de se situar em regiões de bases AATT que constituem a fenda menor do B-DNA (YOUNG *et al.*, 1997).

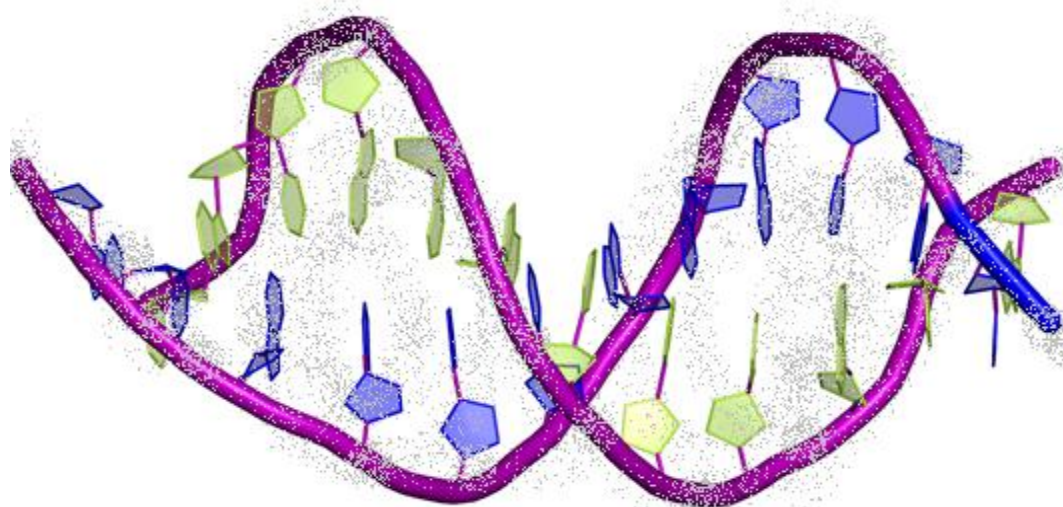


FIG 2.5 – Dodecâmero de Dickerson-Drew ilustrado com seu o esqueleto de água representado pelo pontilhado cinza (Adaptado de <http://necat.chem.cornell.edu/Structures2/4PWM.html>).

2.3 RADIOSENSIBILIZADORES

Devido aos grandes desafios acarretados pela heterogeneidade genética de tumores e ao aparecimento da resistência de diversos tipos de câncer aos tratamentos atuais, pesquisas são realizadas focando novos estudos direcionados a terapias anticâncer (PILAT *et al.*, 2006). Uma das vertentes de estudos mais promissoras na terapia anticâncer está relacionada aos agentes radiosensibilizadores. Radiosensibilizadores são agentes químicos responsáveis por

aumentarem a sensibilidade das células neoplásicas frente a radiação ionizante (HARASAKI *et al.*, 2005), ou seja, por promoverem o potencial letal das radiações, em uma dosagem reduzida, conservando as células vizinhas saudáveis e, assim, intensificando o tratamento do câncer através da radioterapia (GIRDHANI *et al.*, 2016; NEGRÓN *et al.*, 2002).

Devido ao intenso uso de tratamentos radioterápicos e quimioterápicos disponíveis para o combate do câncer no final da década de 1970, Steel e Parkham descreveram os possíveis mecanismos a serem explorados para derivados de radiosensibilizadores que apresentaram interações significativas com células tumorais, levando a várias modalidades terapêuticas (STEEL; PECKHAM, 1979 apud HARASAKI *et al.*, 2005). A classificação dos radiosensibilizadores se dá através de seus mecanismos de ação (BENTZEN; HARARI, 2007 apud KATZ, *et al.*, 2009; RAVIRAJ *et al.*, 2009 e SHIRLEY, 2015). Como são complexos, não há um consenso de classificação na literatura, pois existem muitos mecanismos de ação reportados para esses agentes (SHENOY *et al.*, 1992). Aqui são descritos os principais mecanismos de ação.

Um dos principais agentes radiosensibilizadores é o oxigênio. Tecidos expostos a alta concentração de oxigênio e à radiação sofrem lesão pela formação de espécies reativas de oxigênio. Uma vez que células tumorais apresentam naturalmente baixo teor de oxigênio (hipóxia), agentes que aumentam a acessibilidade de oxigênio nos tecidos tumorais são radiosensibilizadores. Uma melhora na oxigenação do tumor resulta em um aumento na radiosensibilidade: células hipóxicas necessitam de duas a três vezes mais doses de radiação do que células oxigenadas (SHIRLEY, 2015). Por exemplo, em condições de hipóxia, compostos nitroaromáticos e nitroheterocíclicos, como os nitroimidazóis, devido à sua alta radiosensibilidade, são preferencialmente ionizados por radiação, formando nitro radicais que atuam sobre todas as organelas de modo a interferir em suas atividades celulares. São alvos importantes para tumores sólidos devido à condição de hipóxia nestes tecidos tumorais (WARDMAN, 2007). Nesta classe, destacam-se o metronizadol, o misonidazol e a nicotinamida, sendo aplicados clinicamente (SHENOY *et al.*, 1992).

Um outro mecanismo consiste na substituição da timidina presente no DNA por um análogo de timidina halogenada. A mudança estrutural consiste basicamente na substituição do grupo metila da timina por um átomo de halogênio (cloro, bromo ou iodo), devido ao tamanho próximo desses átomos e do grupo metila. Esses agentes antimetabólitos têm sido reconhecidos como radiosensibilizadores por mais de 40 anos (SHIRLEY, 2015). A substituição do grupo metila pelo halogênio torna a cadeia polinucleotídica mais sensível à

radiação ionizante. Os antimetabólitos são avidamente incorporados pelo tumor, devido à alta taxa de divisão celular. Assim, há um aumento da radiosensibilidade diferencial entre as células tumorais e normais. Dentre os radiosensibilizadores por pirimidinas nitrogenadas destaca-se a iododesoxiuridina e a bromodesoxiuridina, estando ambas, atualmente, em uso clínico como radiosensibilizador (SHENOY *et al.*, 1992).

Existe uma outra classe de radiosensibilizadores antimetabólitos. Estes são análogos da uracila (fluoruracilas ou outras uracilas halogenadas) que agem sobre o RNA mensageiro, RNA transportador, ribossomo, e micro RNAs. A uracila é preferencialmente usada por células tumorais. Assim, um análogo fluorado interfere seletivamente no metabolismo de células tumorais. Estudos foram desenvolvidos a partir da década de 50 para o preparo de fármacos análogos da uracila. Fármacos à base de fluorpirimidina como a fluoruracila, o 5-flúor-2'-desoxiuridina demonstraram ter propriedades radiosensibilizantes *in vitro* e ter aplicação clínica (LAWRENCE *et al.*, 2003). Também foi demonstrado o potente efeito radiosensibilizador da fludarabina *in vivo* e da gencitabina *in vitro* e *in vivo* (SHENOY *et al.*, 1992).

Uma outra classe de radiosensibilizadores são os fármacos a base de platina, compreendendo cisplatina, carboplatina e oxaliplatina. Todos esses compostos foram testados *in vitro* e *in vivo* e estão entre os compostos radiosensibilizadores aplicados clinicamente e mais utilizados na terapia contra o câncer. Os compostos de platina induzem lesões no DNA ao formarem ligação covalente da platina com resíduos de purina, formando ligações cruzadas (tanto inter quanto intrafitas) (LIMA, 2014); as tentativas de reparo dessas ligações cruzadas resultam em quebras na fita do DNA. Quando esses compostos são utilizados em conjunto com a radiação, aumentam o número dessas quebras de forma letal (SHIRLEY, 2015).

Ainda entre os radiosensibilizadores, incluem-se os agentes alquilantes, que são um grupo diversificado de agentes anticancer, com a característica comum de reagirem através de um grupo alquil eletrofílico ou um grupo alquil substituído para se ligarem covalentemente à ampla gama de sítios nucleofílicos celulares, incluindo as bases do DNA. Embora os agentes alquilantes reajam com células em todas as fases do ciclo celular, sua eficácia e toxicidade quimioterápica resultam da interferência com tecidos que proliferam rapidamente, tendo assim preferência pelo tecido tumoral. Foram desenvolvidos vários fármacos alquilantes aplicados clinicamente no tratamento de tumores sólidos. Entre eles destaca-se a temolozomida, que também apresenta propriedades radiosensibilizantes, tornando-se então

um potente fármaco aplicado na quimioradioterapia para alguns tipos de tumores (SHENOY *et al.*, 1992).

Dentre as diferentes classes de radiosensibilizadores, inclui-se ainda a dos agentes intercalantes de DNA, responsáveis por inibir tanto o processo de transcrição como a replicação do DNA. Essa classe tem sido amplamente estudada, incluindo compostos como a vosaroxina (GORDON *et al.*, 2012), NLP-1 (5[3-(2-nitro-1-imidazolil)-propil]-fenantridiniumbrometo, (PANICUCCI *et al.*, 1989), NLA-1 (acridina ligada ao 2-nitroimidazol) (DENNY *et al.*, 1992). Nem todo agente intercalante é um radiosensibilizador, mas todos apresentam algum efeito sobre o DNA, de forma que possam ser estudados para o tratamento de câncer. Essa classe de compostos será o foco desse trabalho.

2.4 AGENTES INTERCALANTES

Pequenas moléculas podem interagir com biomoléculas como o DNA. Existem diversas modalidades de interação, sendo os estudos direcionados à inserção dessas moléculas entre sequências específicas de pares de bases adjacentes do ácido desoxirribonucleico um atrativo para a terapia clínica do câncer. A este grupo de pequenas moléculas, que podem interagir entre dois pares de bases nitrogenadas adjacentes, dá-se o nome de agentes intercalantes de DNA, sendo fundamentais no processo de alteração estrutural do ácido nucléico de maneira a proporcionar a inativação de sua replicação *in vivo*.

A primeira explicação para o mecanismo de ação desses compostos considera a sua planaridade e, portanto, a possibilidade de inserção entre bases nitrogenadas do DNA, impedindo a sua replicação. Vários intercalantes são derivados das antraciclinas (FIG. 2.6): doxorubicina (Adriamycin®, Rubex®) (BONNER *et al.*, 1990), daunorubicina (Daunorubicin™) (LEVIN *et al.*, 1991), epirubicina (Ellence™) (YU, 2015; STEVENS *et al.*, 2012), mitoxantrona (Novantrone™) (SAZGARNIA *et al.*, 2013), pirarrubicina (Theprubicin™) (DARUWALLA, 2008; JIA *et al.*, 2017), idarrubicina (Idamycin™) (HOLLINGSHEAD *et al.*; STEVENS *et al.*, 2012), actinomicina (Dactinomycine™) (ROOTS *et al.*, 1976) e amsacrina (AMSA P-D™) (ALMEIDA, *et al.*, 2005). Outros exemplos de intercalantes de DNA incluem a proflavina, acridina, bisfenazina (MLN944) (DAI *et al.*, 2004), 1-(2-desoxi-B-D-ribofuranosil)-4-(3-benzamido) fenilimidazol (D₃)

(WANG *et al.*, 1996), 1-*O*-(1-pirenilmetil) glicerol (NIELSEN *et al.*, 2004) e a bisfenazina (XR5944) (LIN *et al.*, 2014) – (FIG. 2.6).

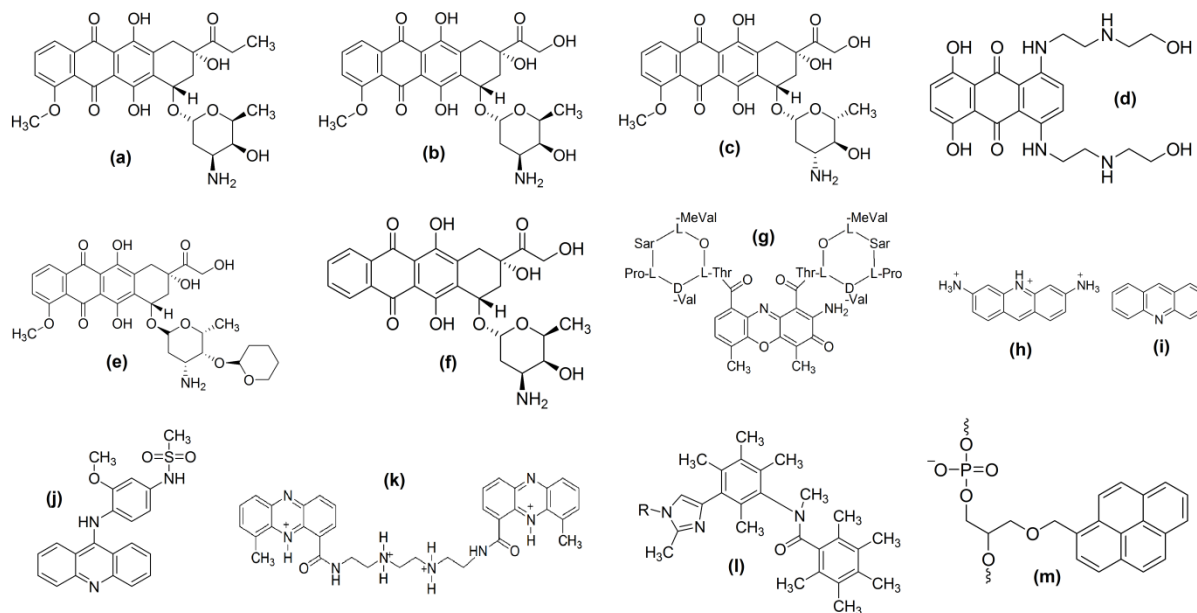


FIG. 2.6 – (a) Doxorubicina, (b) daunorubicina, (c) epirubicina, (d) mitoxantrona, (e) pirarubicina, (f) idarubicina, (g) actinomicina, (h) Proflavina; (i) Acridina; (j) Amsacrina; (k) bisfenazina (MLN944 e XR5944); (l) 1-(2-desoxi-B-D-ribofuranosil)-4-(3-benzamido)fenilimidazol (D₃); (m) 1-*O*-(1-pirenilmetil) glicerol.

O DNA foi identificado como um alvo promissor no tratamento de neoplasias por meio da modificação de sua conformação estrutural. Por isso, estudos relacionados às aplicações terapêuticas do complexo DNA-intercalante como agente anticâncer têm um papel chave em farmacologia. A busca de novos agentes intercalantes de DNA, mais potentes e seletivos, vem motivando estudos direcionados à terapia do cancro (RESCIFINA *et al.*, 2014).

As ligações que se estabelecem entre DNA e intercalantes normalmente envolvem agentes orgânicos como grupo intercalante, especificamente, uma classe de compostos planares constituídos de grupos poliaromáticos (RESCIFINA *et al.*, 2011; RESCIFINA *et al.*, 2012). O encaixe dos agentes de estruturas aromáticas planares com as bases do DNA ocorre pelo fenômeno denominado empilhamento π - π (LUÍS, 2011).

Os diferentes tipos de interações que podem ocorrer entre o DNA e pequenas moléculas envolvem ligações covalentes e não-covalentes (ZHANG *et al.*, 1993). No caso dos intercalantes, a interação com o DNA é estabelecida através de ligações não-covalentes (iônicas, Van der Waals, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio).

O conhecimento das estruturas, assim como o mecanismo de interação de agentes intercalantes, contribuem para o planejamento da síntese de novos agentes intercalantes.

2.4.1 INTERCALAÇÃO

O primeiro registro sobre compostos que poderiam interagir com o DNA foi evidenciado em 1961 por Lerman, que demonstrou a ligação não-covalente formada entre derivados da acridina com bases nitrogenadas do DNA (LERMAN, 1961). Na interação, os intercalantes são dispostos como lâminas entre os pares de bases específicas, sem que ocorra o rompimento das ligações de hidrogênio (FIG 2.7). Ao processo de interação entre agentes intercalantes com bases nitrogenadas do DNA dá-se o nome de intercalação (GOFTAR *et al.*, 2014; GRAVES *et al.*, 2000; RESCIFINA *et al.*, 2014).

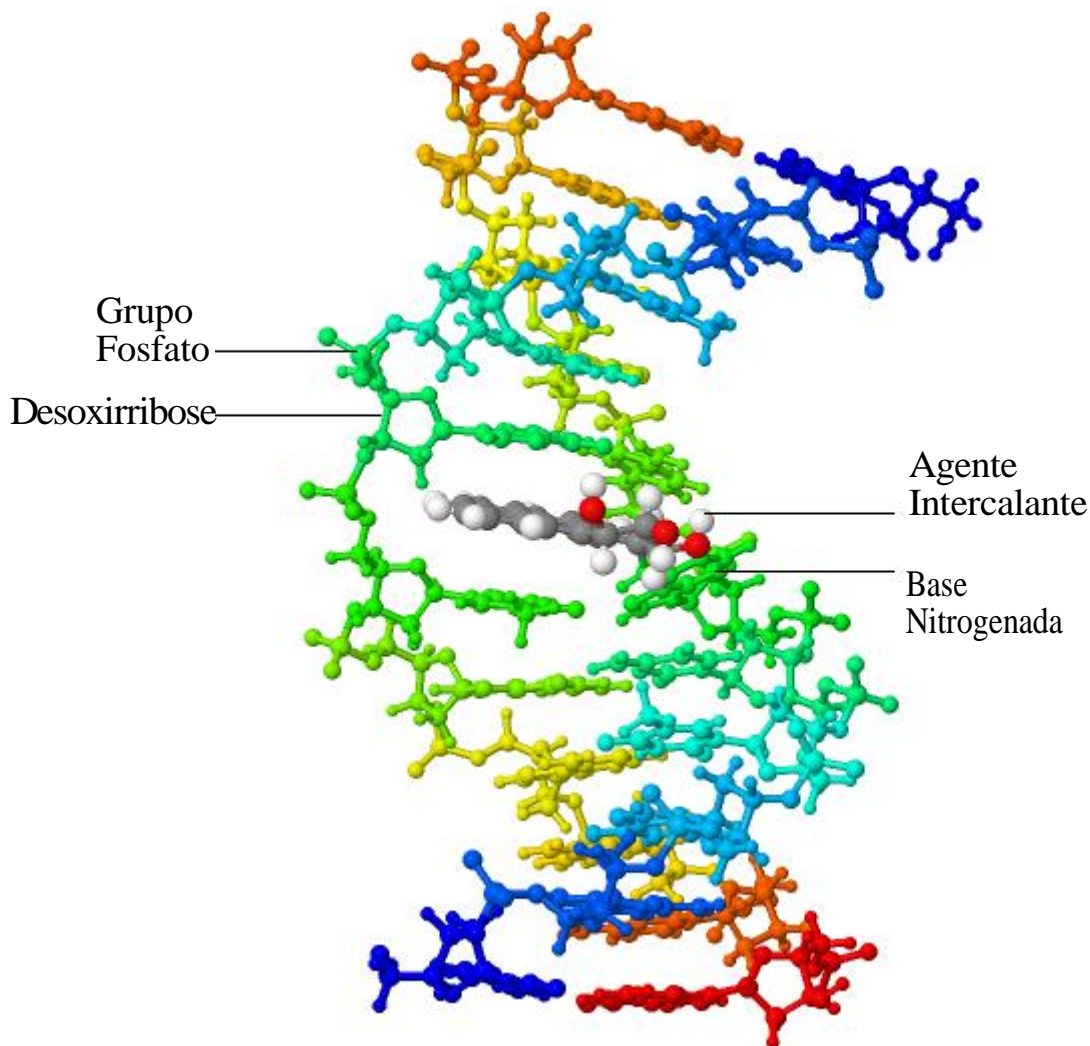


FIG. 2.7 – Estrutura mostrando a inserção de um intercalante ((+)-(7S,8R,9S,10R)-7,8-dihidroxi-9,10-epoxi-7,8,9,10-tetrahidrobenzo[α]pireno), paralelamente, entre pares de bases nitrogenadas adjacentes da dupla hélice do DNA. O processo resulta no deslocamento dos pares de bases que ladeiam o local da intercalação em direções opostas ao longo do eixo helicoidal (Adaptado de Protein Data Bank Entry ID 1JDG) (PRADHAN, *et al.*, 2001).

A inserção de um intercalante, paralelamente, entre pares de bases nitrogenadas da dupla hélice do DNA resulta na mudança substancial da estrutura do DNA, pois requer alterações nos ângulos torcionais do grupo fosfato e açúcar a fim de acomodar o intercalante. A intercalação acarreta o deslocamento dos pares de bases que ladeiam o local da ligação em direções opostas ao longo do eixo helicoidal, ocasionando, conseqüentemente, um alongamento da dupla hélice de 3,4 Å e uma diminuição da torção helicoidal (RESCIFINA *et al.*, 2014). A modificação tanto da estrutura do esqueleto quanto das bases nitrogenadas do

DNA causa o enfraquecimento das ligações entre os pares de bases que unem a dupla hélice, refletindo, assim, no processo de quebra das bases, no esqueleto açúcar-fosfato da molécula de DNA, por uma menor dosagem de radiação ionizante, durante um tratamento radioterápico (HOLLAND *et al.*, 2003; GIRDHANI *et al.*, 2016). A presença de um intercalante – paralelamente – entre dois pares de bases nitrogenadas exclui o acesso de outro agente intercalante para o local de interação ao lado vizinho à intercalação (RESCIFINA *et al.*, 2014). Este fenômeno é comumente referido como o “princípio da exclusão do vizinho mais próximo”, proposto por Crothers (CROTHERS, 1968).

2.4.2 MECANISMO DE INTERCALAÇÃO CLÁSSICA

A intercalação clássica faz o uso de agentes orgânicos planares constituídos de grupos poliaromáticos fundidos como grupo intercalante. Neste tipo de intercalação o intercalante (tais como a proflavina e o brometo de etídeo, FIG. 2.8) tem a alocação completa do sistema aromático fundido entre pares de bases nitrogenadas do DNA.

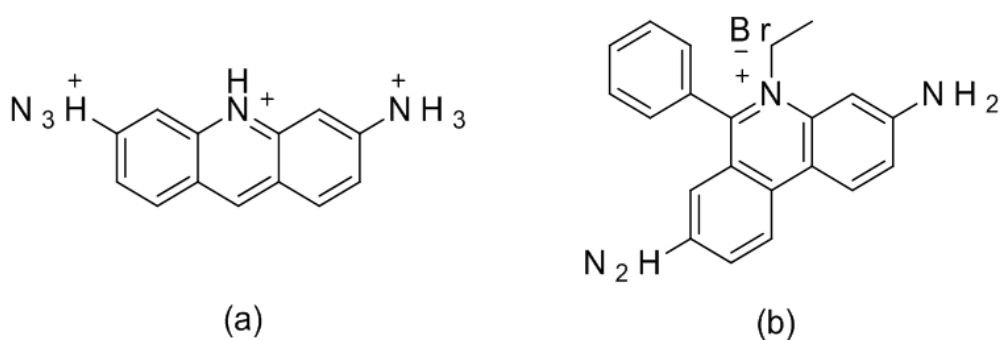


FIG. 2.8 – Exemplos de compostos intercalantes clássicos: (a) Proflavina; (b) Brometo de etídeo.

O mecanismo de intercalação clássica envolve as seguintes etapas: (a) a forma catiônica do intercalante forma um complexo com a carga negativa do grupo fosfato do esqueleto do DNA por meio de interações eletrostáticas (FIG. 2.9a); (b) o intercalante se distribui para cima e para baixo do potencial aniônico ao longo do eixo da hélice na superfície do DNA até que surjam aberturas entre os pares de bases adjacentes causados por alterações térmicas normais ou movimentos de “respiração” do DNA (FIG. 2.9b) (WILLIAMS, 2006).

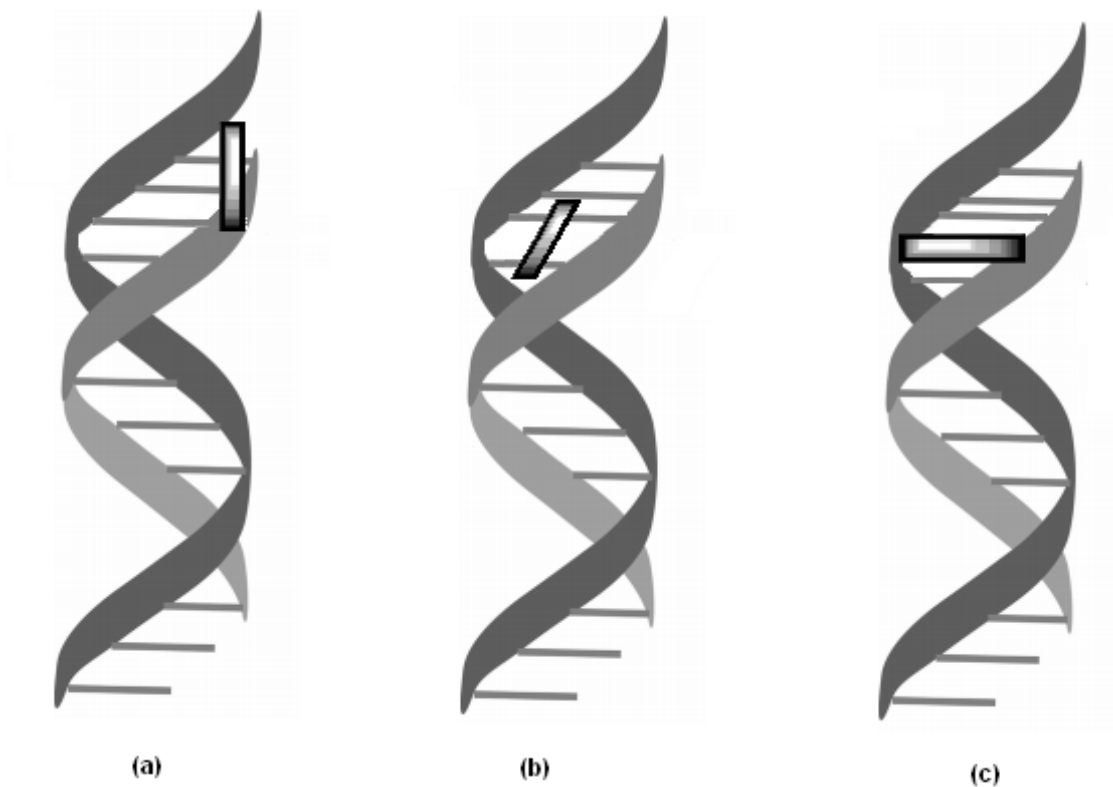


FIG. 2.9 – Representação de intercalação clássica (Adaptado de RESCIFINA *et al.*, 2014). As figuras mostram a movimentação do intercalante clássico para realizar a inserção entre bases adjacentes: (a) A forma catiônica do intercalante interage eletrostaticamente com o grupo fosfato, negativamente carregado, do esqueleto do DNA; (b) Representação do afastamento entre pares de bases nitrogenadas para alocação do intercalante; (c) Intercalante inserido entre pares de bases nitrogenadas do DNA.

2.4.3 MECANISMO DE INTERCALAÇÃO NÃO-CLÁSSICA: INTERCALAÇÃO POR ROSQUEAMENTO

A intercalação não-clássica, também conhecida como intercalação por rosqueamento, faz o uso de componentes orgânicos formados por um sistema plano de anéis aromáticos policíclicos constituído por cadeias laterais não fusionadas como grupo intercalante. Neste tipo de intercalação, o intercalante não-clássico, tais como a metapirilina e a nogalamicina (FIG. 2.10), tem a alocação do sistema aromático entre pares de bases enquanto a parte catiônica interage com a fenda maior e o outro substituinte interage com a fenda menor do DNA (FIG. 2.11) (RESCIFINA *et al.*, 2014).

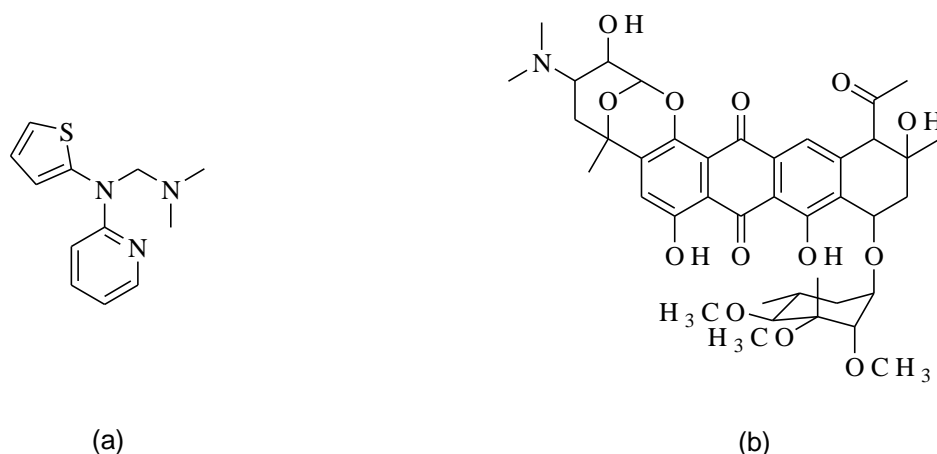


FIG. 2.10 – Exemplos de compostos intercalantes não-clássicos: (a) Metapirilina; (b) Nogalamicina.

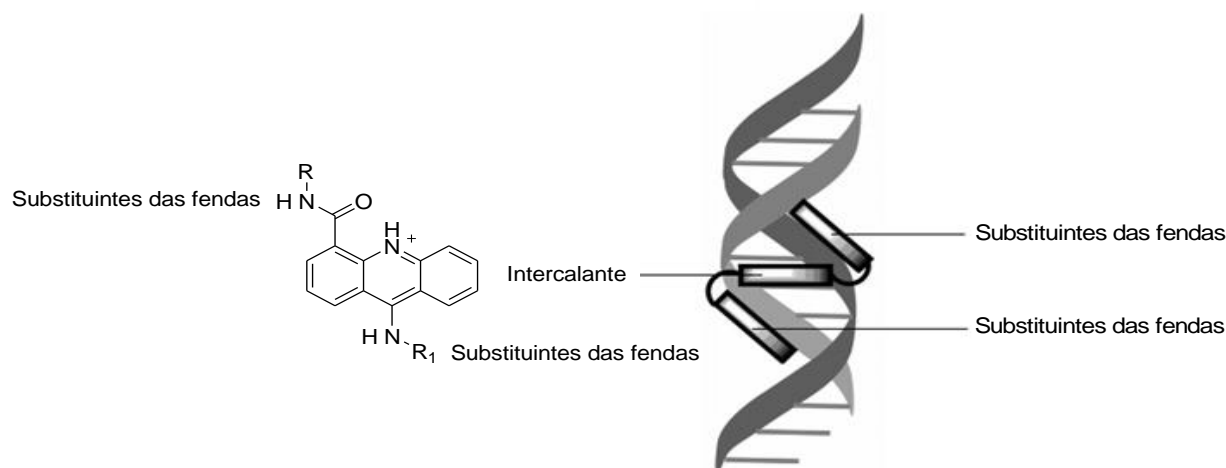


FIG. 2.11 – Representação de intercalação por rosqueamento (Adaptado de RESCIFINA *et al.*, 2014)

O mecanismo de intercalação por rosqueamento é complexo, sendo esta característica observada através da cinética de associação e dissociação do intercalante não-clássico. Como a intercalação por rosqueamento envolve componentes orgânicos mais volumosos em relação à intercalação clássica, o fenômeno de acomodamento do intercalante é mais lento e agressivo, ocorrendo em espaçamentos maiores nas fendas do DNA e rompimento das ligações de hidrogênio entre bases pareadas com ou sem distorção na hélice do oligonucleotídeo (WILLIAMS, 2006).

Apesar da cinética de intercalação por rosqueamento ser lenta, os agentes intercalantes não clássicos se ligam ao DNA com alta afinidade em relação aos agentes clássicos. Fato comprovado pelo alto valor de energia do complexo (intercalante/DNA), conseqüente das distorções da dupla hélice do oligonucleotídeo pelo processo de intercalação por rosqueamento (BLACKBURN *et al.* 2006).

2.5 9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA

Estudos prévios desenvolvidos pelo grupo de pesquisa em Química Medicinal do Instituto Militar de Engenharia (IME) culminaram na síntese da molécula 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (FIG. 2.12) que mostrou significativa interação com a

dupla fita de DDD reduzindo em 50% a dose de radiação necessária para quebra do B-DNA plasmidial (SIMÕES *et al.*, 2016). Esse composto orgânico foi planejado levando-se em consideração a planaridade dos anéis aromáticos e presença de grupo catiônico ($\text{NH}_2^+ \text{Cl}^-$) na molécula, fatores que estão relacionados com o empilhamento π - π e com interações eletrostáticas com o grupo fosfato do DNA, respectivamente (SIMÕES *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 1993), características importantes para o processo de intercalação com o DNA.

Pesquisas realizadas por tempos de relaxação nuclear (T_1 e T_2) e *Saturation Transfer Difference* (STD) mostraram que a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona interage com o DDD em meio aquoso e na proporção molar (100:1) (ligante:DDD) (SIMÕES, 2013).

Resultados obtidos por *docking* e Dinâmica Molecular (DM) mostraram que a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona interage, em meio aquoso, com a região AT através das fendas do dímero de DDD e em regiões CG-CG e CG-AT através da intercalação por espaçamento forçado entre os pares de bases adjacentes, sendo a região rica em CG, o local mais estável para ocorrer a intercalação (SIMÕES, 2013).

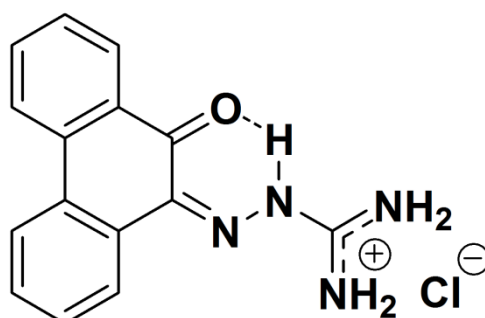


FIG. 2.12 – Estrutura molecular da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.

2.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) NO ESTUDO DE DNA

Com o progresso da instrumentação de RMN, desde sua primeira aplicação em biopolímeros, foi possível a abordagem de RMN para o estudo da estrutura, dinâmica e interações intermoleculares de proteínas e ácidos nucleicos, como o DNA. A praticidade desta abordagem foi ainda maior com o uso de experimentos multidimensionais em RMN para o assinalamento de biomacromoléculas. As condições da solução em experimentos de RMN

(pH, temperatura, força iônica, tampão) podem ser feitas em ampla variedade, permitindo, assim, comparação entre soluções da amostra nativa e desnaturada por interação molecular com outra espécie de molécula. (WÜTHRICH, 1986).

A determinação de estruturas de ácidos nucleicos em solução pode ser realizada através de cálculos de estruturas utilizando experimentos como COSY (NAGAYAMA *et al.*, 1979; YANG *et al.*, 1997), HSQC (MARCÓ *et al.*, 2017), NOESY (SEBASTIAN *et al.*, 2009), TOCSY (CELDA *et al.*, 1993).

O experimento bidimensional COSY (**C**ORrelated **S**pectroscop**Y**) permite a determinação de correlações homonucleares (^1H - ^1H), sendo possível a observação do acoplamento entre hidrogênios vizinhos em até três ligações de distância (^3J).

Para a determinação de correlações heteronucleares (^1H - ^{13}C e ^1H - ^{15}N), existem dois tipos de experimentos: (i) observações de correlações a curta distância (^1J), que podem ser obtidas por meio dos experimentos HSQC (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence) e HMQC (**H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence) e (ii) observações de correlações a longa distância (^nJ , $n>1$), por meio do experimento HMBC (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation).

Enquanto os experimentos COSY, HMQC, HSQC e HMBC permitem determinar correlações entre núcleos através das ligações químicas, o NOESY é um experimento homonuclear baseado no efeito Overhauser nuclear, que permite a observação de núcleos de ^1H próximos no espaço - em média até 5 Å (PAVIA *et al.*, 2015; SILVERSTEIN *et al.*, 2007) - mesmo que distantes a várias ligações. O resultado é um espectro semelhante ao COSY que, além de incluir o acoplamento ^3J (já esperado, uma vez que ocorre entre hidrogênios vizinhos e, portanto, próximos espacialmente), mostra também a interação espacial com os demais núcleos distantes em termos de ligação, mas próximos espacialmente.

O experimento TOCSY (**T**otal **C**orrelated **S**pectroscop**Y**) também é um experimento de correlação homonuclear. Nesse experimento ocorre a transferência da magnetização para além dos spins com acoplamento vizinho (^3J), de modo que sejam vistas as correlações entre os núcleos que não estão diretamente acoplados, mas que pertencem a um mesmo sistema de spins. A magnetização é transferida de um spin para seu vizinho, depois para o seguinte e assim por diante. (BRAUNSCHWEILER *et al.*, 1983; RANCE, 1987).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona como potencial novo agente intercalante radiosensibilizador de DNA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1-** Sintetizar e caracterizar a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.
- 2-** Assinalar por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) o fragmento de fita dupla de DDD (CGC-GAA-TTC-GCG).
- 3-** Determinar a estrutura do fragmento de fita dupla de DDD.
- 4-** Assinalar por RMN o complexo: DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.
- 5-** Estudar a região de interação de um fragmento de dupla fita de DNA (DDD) com a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona utilizando a RMN e realizar hipótese da interação do complexo (DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona).

4 METODOLOGIA

4.1 SÍNTESE DA 9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA

Em um balão de fundo redondo de 50 mL acoplado a um condensador e equipado com chapa de aquecimento e agitação magnética, foram adicionados 0,20822 g (1 mmol) de 9,10-fenantrenoquinona (Merck) (**1**) para completa solubilização em etanol (95%) (Vetec). Foram adicionadas 3 gotas de HCl (6 M) (Vetec), seguido da adição (em excesso) de 0,16583 g (1,5 mmol) de cloridrato de aminoguanidina (Sigma-Aldrich) (**2**). A mistura reacional foi refluxada por 4 horas para filtração em um novo balão de fundo redondo, o qual foi levado ao sistema de rotaevaporação a pressão reduzida (IKA[®] RV10). Foram obtidos 0,255 g (0,85 mmol) de 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (**3**), equivalente a 85% de rendimento (FIG. 4.1).

As análises cromatográficas em camada delgada (ccd) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ – MERSE. Para a visualização dos componentes nas análises em ccd, foi utilizada lâmpada ultravioleta (254 nm).

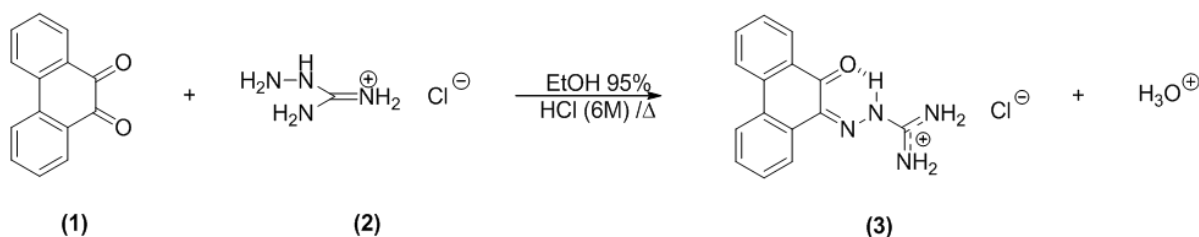


FIG. 4.1 – Síntese da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.

4.2 PREPARAÇÃO DA 9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA PARA ANÁLISE POR RMN

Foram preparadas duas soluções de 500 μL a 100 mM da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona. A primeira foi preparada em DMSO-*d*₆, (99,9% D + 0,05% V/V, TMS Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) para caracterização completa da estrutura do composto orgânico e a segunda em 90% tampão fosfato de sódio (pH=6,5) a 10 mM, NaCl a 50 mM e EDTA a 0,1 mM preparado com água (Milli-Q), contendo 10% de Óxido de Deutério (D 99,9%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) para estudo da interação com o DDD.

4.3 CARACTERIZAÇÃO POR RMN DA 9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA

Todos os experimentos foram realizados em um espectrômetro Agilent Premium COMPACT (600 MHz), a uma temperatura de 25 °C, usando sonda de 5 mm para detecção indireta.

Para a solução do composto orgânico (15 mg) em DMSO-*d*₆ (500 μL), os espectros de ¹H (número de scans = 32; janela espectral entre 0 e 16 ppm), ¹³C APT (número de scans = 50.000; janela espectral de 0 a 220 ppm), HSQC (número de scans = 16 e número de incrementos = 400) e HMBC (número de scans = 16 e número de incrementos = 400) foram adquiridos para o assinalamento.

Para a solução da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (15 mg) em 90% água/tampão fosfato e 10% Óxido de Deutério (500 μL), os experimentos de ¹H (número de scans = 32; janela espectral entre 0 e 16 ppm) e NOESY (tempo de mistura = 200 ms) foram realizados utilizando a técnica *excitation sculpting* como gradiente para supressão do sinal de água (Hwang *et al.*, 1995). Para análise de todos os espectros adquiridos foi utilizado o software VnmrJ versão 3.2.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA 9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA NO VÁCUO

A estrutura tridimensional do composto 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona no vácuo foi obtida pelo software Spartan'08, programado com o método Density Functional configurado com B3LYP e com a base 6-31G * (SHAO *et al.*, 2006). O método Equilibrium Conformer do Spartan'08 também foi empregado para determinação da conformação de menor energia da estrutura tridimensional desse composto no vácuo. Esse resultado conformacional foi utilizado para construção de um modelo hipotético da interação deste composto orgânico com o DDD.

4.5 PURIFICAÇÃO DO DDD

O fragmento de dupla hélice de DNA (Dickerson-Drew Dodecamer – CGC-GAA-TTC-GCG – 3.646,4 g/mol) contido em 10 μ mol de uma amostra liofilizada foi adquirido da empresa “Integrated DNA Technologies”.

A amostra liofilizada (10 μ mol), foi ressuspensa em 2 mL de água Milli-Q e submetido três vezes ao *annealing* para purificação: metodologicamente consistiu em levar a amostra ao banho-maria em temperatura de 60 °C durante 5 minutos e então resfriá-la a temperatura ambiente por um período de 10 minutos a fim de forçar as moléculas do DDD a assumirem conformação de dupla fita.

Para purificação do DDD a temperatura ambiente, utilizou-se um HPLC (HPLC UPL – 900) acoplado a um espectrofotômetro ultravioleta (280 nm) e a uma coluna cromatográfica Superdex Peptide 10/300 GL (GE Health Sciences).

A coluna cromatográfica Superdex Peptide 10/300 GL possui dimensões de 10x 300-310 mm e volume de leito de 24 mL. Constituída de matriz (agarose reticulada e dextrano) com 13 μ m de tamanho, a coluna foi desenvolvida para fluxo de 0,2 a 1,2 mL/min sob pressão máxima de 1,8 mPa. Suporta variações de temperatura entre 4°C e 40°C e variações de pH entre 1 e 14.

A coluna foi previamente tratada, a temperatura ambiente, com 150 mL de água Milli-Q para limpeza da matriz. Tanto para o tratamento da coluna quanto para purificação do DDD, o cromatógrafo foi configurado com pressão de 1,8 mPa e fluxo de 1 mL/min.

No processo de purificação por filtração em gel (COLLINS, 2006), foram coletadas 20 alíquotas de 0,1 mL da amostra contendo o fragmento de dupla hélice de DNA (DDD). As frações do fragmento de dupla hélice de DNA (DDD) isolado foram reunidas e liofilizadas, resultando em 7,91 μ mol do composto.

4.6 PREPARAÇÃO DO DDD PARA ANÁLISE POR RMN

7,91 μ mol do DDD purificado foram ressuspensos em 360 μ L de uma solução contendo 90% tampão fosfato de sódio (pH=6,5) a 10 mM, NaCl a 50 mM e EDTA a 0,1 mM preparado com água (Milli-Q) e 10% de Óxido de Deutério (D 99,9%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). A concentração final do fragmento de dupla fita de DDD foi igual a 21,97 mM.

4.7 ASSINALAMENTO POR RMN DO DDD

Para o assinalamento do DDD, foram realizados os experimentos NOESY (tempo de mistura = 125 ms) e HSQC – em um espectrômetro Bruker ASCEND (700 MHz) – e o experimento TOCSY (tempo de mistura = 60 ms) – em um equipamento Bruker Avance III (600 MHz). Para todos os experimentos, foi utilizada a técnica *excitation sculpting* para supressão do sinal de água (Hwang *et al.*, 1995). Todas as análises foram realizadas em tubos de Shigemi a uma temperatura controlada de 25 °C. Para o assinalamento dos espectros adquiridos utilizou-se o software Analysis (<http://www.ccpn.ac.uk>).

4.8 MEDIDAS DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO/DISSOCIAÇÃO

Para medir a afinidade entre o DDD e a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona por meio das constantes de associação/dissociação, e assim determinar a proporção estequiométrica entre a macromolécula e seu respectivo ligante, foi empregado o processo de titulação através da espectroscopia de UV/Vis. Utilizou-se um equipamento Agilent Technologies Cary 60 UV/Vis com o software Cary WinUV Scan Application.

Primeiramente, foi analisado o espectro de absorção da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona, obtido, também, pelo processo de titulação através da espectroscopia de UV/Vis. Para isso, foi preparada, em uma cubeta de quartzo, uma solução equivalente a 1005 μL de 10 mM de tampão fosfato de sódio (pH=6,5), 50 mM NaCl e 0,1 mM de EDTA. A essa solução, foram adicionadas alíquotas de 2 μL da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (1,67 mM), sendo que para cada alíquota adicionada à solução-tampão, foi medido o comprimento de onda absorvido por este composto orgânico e calculada sua respectiva concentração.

Para a titulação do DDD, foi preparada, também em uma cubeta de quartzo, a mesma solução equivalente a 360 μL do tampão fosfato de sódio, contendo, agora, 7,91 μmols do oligonucleotídeo (21,97 mM). Uma fração de 5 μL da solução preparada (109,85 nmols do DDD) foi diluída em 1000 μL do referido tampão para estocagem (concentração de 109,85 μM do DDD). Uma alíquota de 36,62 μL da solução foi transferida para uma cubeta de quartzo onde foi adicionado o mesmo tampão até volume final de 1005 μL e concentração de 3,96 μM do DDD.

A metodologia para titulação do DDD pode ser dividida em duas etapas: a primeira consistiu em levar a cubeta com 1005 μL da solução-tampão contendo o DDD (3,96 μM) ao espectrômetro UV/Vis para medir o comprimento de onda de absorção máxima do oligonucleotídeo e calcular sua respectiva concentração; a segunda, diz respeito ao processo de titulação, ou seja, à adição de alíquotas de 2 μL da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (1,67 mM) à solução-tampão contendo o DDD.

Para cada alíquota de 2 μL da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (aproximadamente 3,3 nmols) adicionada à solução-tampão contendo o DDD (3,98 nmols), foi medido o comprimento de onda absorvido pelo composto orgânico sendo, também,

calculadas as concentrações molares do agente titulado (DDD) e do seu respectivo titulante (9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona).

O titulante utilizado tanto para medir o comprimento de onda de absorção máxima da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona quanto para a titulação do DDD foi preparado a partir da diluição de 5 μmols desse composto orgânico em 3 mL de água Milli-Q.

O espectrômetro de UV/Vis foi configurado com varredura ampla de 600 a 200 nm em todos os experimentos realizados, para detectar tanto o comprimento de onda de absorção máxima da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona quanto o do DDD. A linha base de absorção dos experimentos foi ajustada em zero por uma solução (branco) equivalente a 1000 μL do tampão fosfato (10 mM) (pH=6,5), NaCl (50 mM) e de EDTA (0,1 mM).

4.9 PREPARAÇÃO DO COMPLEXO: DDD/9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA PARA ANÁLISE POR RMN

Foi preparada uma solução de 10 mL contendo tampão fosfato de sódio (pH=6,5) a 10 mM, NaCl a 50 mM e EDTA a 0,1 mM e 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona a 10,64 mM. Dessa solução foi retirada uma alíquota de 206 μL que foi misturada a 100 μL da amostra utilizada no item 4.6 (caracterização do DDD por RMN, contendo o DDD a uma concentração igual a 21,97 mM). O volume da solução do complexo DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona foi completado até 340 μL com Óxido de Deutério (D_2O 99,9%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) para obtenção de uma solução contendo 90% tampão fosfato de sódio e 10% de Óxido de Deutério. A concentração final equimolar do DDD e da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona na solução foi de 6,46 mM.

4.10 ASSINALAMENTO DAS RESSONÂNCIAS DO COMPLEXO: DDD/9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA

Foram adquiridos os experimentos NOESY (tempo de mistura = 125 ms) e TOCSY em um espectrômetro Bruker 600 MHz, usando *excitation sculpting* para supressão do sinal de

água (Hwang *et al.*, 1995). Todas as análises foram realizadas em tubos de Shigemi a temperatura ambiente. Para o assinalamento dos espectros adquiridos utilizou-se o software Analysis (<http://www.ccpn.ac.uk>).

4.11 MODELO HIPOTÉTICO DA INTERAÇÃO DO COMPLEXO: DDD/9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA

A estrutura do DDD foi extraída do “Protein Data Bank” (PDB) código 1BNA (DREW *et al.*, 1981). A estrutura da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona foi obtida após construção da molécula e minimização de energia no programa Spartan’8.

Com base na análise dos resultados experimentais, de perturbação de deslocamento químico que os hidrogênios deste oligonucleotídeo apresentaram na presença do ligante, foi possível determinar os sítios de interação mais relevantes do DDD com o ligante e assim realizar a construção de um modelo hipotético de interação do complexo através do software PyMol (DE LANO, 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

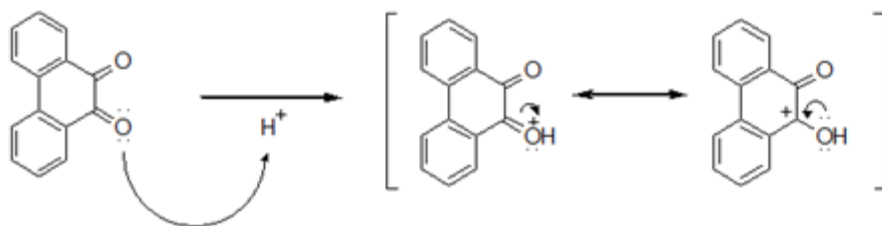
5.1 SÍNTESE DA 9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA

A rota sintética utilizada para preparação da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona pode ser detalhada em 3 etapas (ESQ 5.1), segundo o mecanismo de reação: substituição nucleofílica em carbono sp^2 para formação de iminas (MCMURRY, 2012; SOLOMONS *et al.*, 2012).

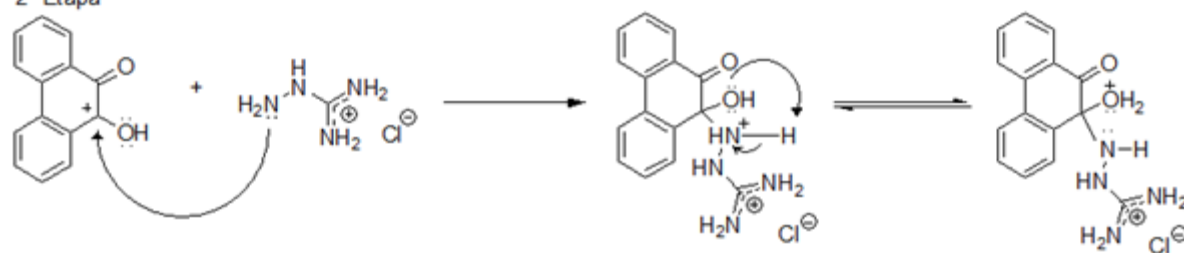
A primeira etapa consiste na protonação da carbonila da 9,10-fenantrenoquinona através da acidificação do meio reacional (Etanol 95%) com ácido clorídrico. Nesta etapa, um par de elétrons do oxigênio da carbonila aceita um próton do ácido, produzindo o cátion oxônio. O carbono de um cátion oxônio é mais suscetível ao ataque nucleofílico do que a carbonila da cetona inicial. A segunda etapa da rota consiste no ataque nucleofílico do grupo amino do cloridrato de aminoguanidina ao carbono sp^2 da carbonila. Em seguida ocorre a transferência do próton, intermolecular, do nitrogênio para o oxigênio produzindo um aminoálcool. A terceira etapa consiste na desidratação do produto obtido, seguida da transferência de um próton do nitrogênio para uma base de Brønsted-Lowry, produzindo, assim, a imina (MCMURRY, 2012; SOLOMONS *et al.*, 2012).

O rendimento da síntese da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona, foi equivalente a 85%.

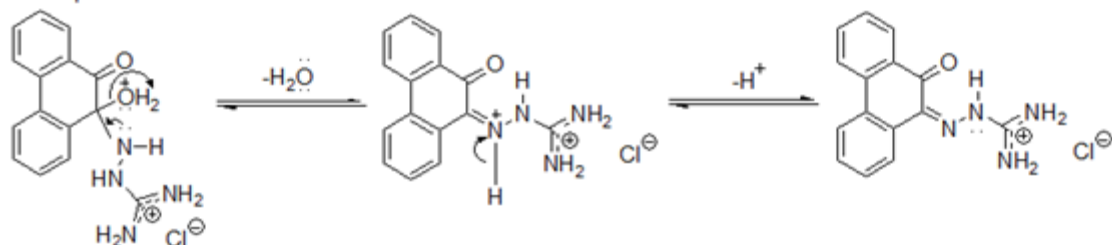
1ª Etapa



2ª Etapa



3ª Etapa



ESQ. 5.1 – Mecanismo de reação para a síntese da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona a partir da 9,10-fenantrenoquinona e cloridrato de aminoguanidina.

5.2 CARACTERIZAÇÃO POR RMN DA 9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA

Para a solução de 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (99,74 mM) em 500 μ L de DMSO-*d*6, foi observado dissolução total da substância. Para a solução deste mesmo composto (99,74 mM), preparada em 500 μ L de 90% tampão fosfato de sódio (pH=6,5) a 10 mM, NaCl a 50 mM e EDTA a 0,1 mM e 10% de Óxido de Deutério, foi observada a precipitação da substância em um tempo menor que 1 hora, indicando baixa solubilidade em tampão fosfato. Na ausência de tampão fosfato não houve precipitação.

Os resultados obtidos por RMN para a caracterização da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em DMSO-*d*6 e em 90% água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério podem ser observados na TAB 5.1 e na FIG. 5.1. Todos os dados confirmaram o produto da reação realizada como sendo a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.

TAB. 5.1. Dados de RMN de ^1H para a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em DMSO- d_6 e em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério.

RMN				
Numeração	DMSO- d_6		90% água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério	
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	$\delta_{\text{água}} - \delta_{\text{DMSO-}d_6}$ $\Delta\delta_{\text{H}}$ (ppm)
1	8,62 (d, 1H)	126,36	7,01 (d, 1H)	- 1,61
2	7,46 (t, 1H)	129,42	6,82 (t, 1H)	- 0,64
3	7,56 (t, 1H)	130,81	7,10 (t, 1H)	- 0,46
4	8,29 (d, 1H)	124,27	7,43 (d, 1H)	- 0,86
4a		129,82		
4b		136,58		
5	8,37 (d, 1H)	124,40	7,60 (d, 1H)	- 0,77
6	7,84 (t, 1H)	136,29	7,59 (t, 1H)	- 0,25
7	7,57 (t, 1H)	129,09	7,26 (t, 1H)	- 0,31
8	8,18 (d, 1H)	128,78	7,35(d, 1H)	- 0,83
8a	-	129,94	-	
9	-	182,16	-	
10	-	135,25	-	
10a	-	130,33	-	
11	-	-	-	
12	14,14 (s, 1H)	-	13,09 (s, 1H)	- 1,05
13		156,76	-	
14	8,80 (s, 2H) largo	-	-	
15	8,90 (s, 2H) largo	-	-	

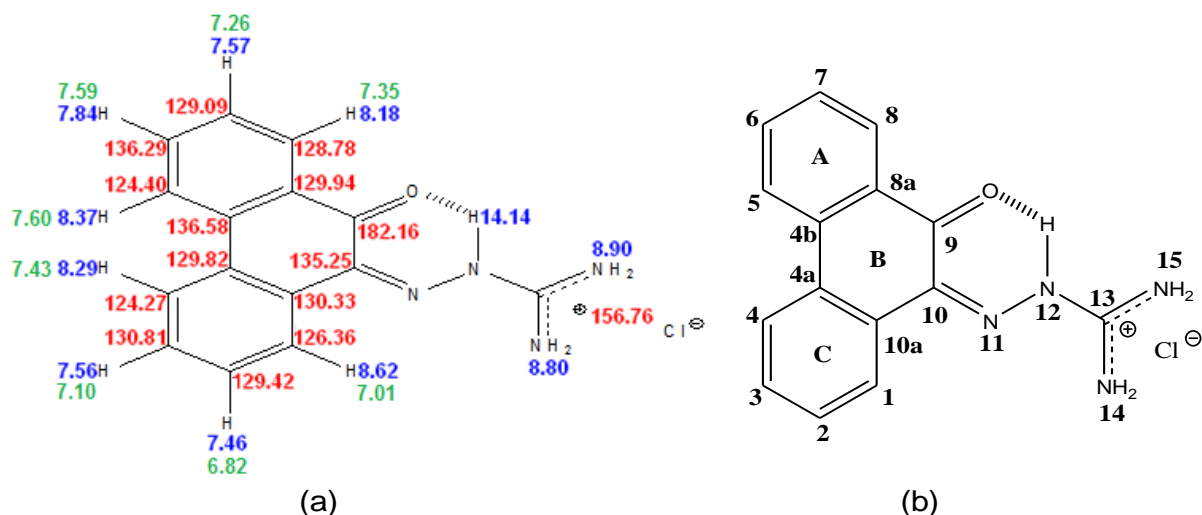


FIG. 5.1 – (a) Assinalamento completo da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em DMSO-*d*₆. Sinais de ¹H em DMSO-*d*₆ (azul) e em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério (verde) e sinais de ¹³C em DMSO-*d*₆ (vermelho); (b) Numeração da estrutura da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.

É bastante importante a diferença de deslocamento químico observado para as ressonâncias dos hidrogênios aromáticos. Houve uma blindagem dos ambientes químicos quando em solvente aquoso. As maiores blindagens ocorreram nas ressonâncias dos hidrogênios 1, 4, 5, 8 e 12. Este efeito pode sugerir a presença de empilhamento π - π quando a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona está em água. De fato, o composto é menos solúvel em água do que em DMSO, além do mais, a presença de empilhamento diminuiria a penalidade entrópica da exposição da superfície hidrofóbica dos anéis aromáticos (A, B, C) à água. Neste sentido a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona poderia estar fazendo pequenos agregados estabilizados pelo efeito entrópico e por empilhamento π - π . Entretanto, outros experimentos são necessários para se comprovar este efeito.

Além disso, o desaparecimento dos sinais dos hidrogênios 14 e 15 do ligante no espectro de ¹H em solvente constituído de 90% água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério indicam uma rápida troca destes hidrogênios com o solvente. Assim, a pressaturação da água leva à saturação destes hidrogênios. Na presença de tampão fosfato estes hidrogênios reaparecem (não mostrado), indicando forte interação do grupo aminoguanidina pelo grupo fosfato.

Todos os espectros utilizados para o assinalamento da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona encontram-se no APÊNDICE 9.1.

5.3 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA 9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA NO VÁCUO

A conformação espacial no vácuo mais estável da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona assinalada neste trabalho foi obtida pelo software Spartan'08 programado com o método Density Functional configurado com B3LYP e a base 6-31G * (SHAO *et al.*, 2006). O método Equilibrium Conformer do Spartan'08 também foi empregado para desenvolvimento da conformação de menor energia da estrutura tridimensional desse composto.

O resultado obtido para a conformação mais estável do composto no vácuo indica uma estrutura planar, com destaque para a ligação de hidrogênio entre o grupo -NH e o oxigênio da carbonila, que auxilia na formação de um pseudo anel de 6 membros entre o grupo de átomos próximos a essa ligação de hidrogênio (FIG. 5.2). O pseudo anel de 6 membros diminui a energia molecular devido à menor tensão angular proporcionada aos átomos envolvidos na formação desse pseudo ciclo. Esse resultado conformacional foi utilizado para construir um modelo hipotético de interação deste composto orgânico com o DDD.

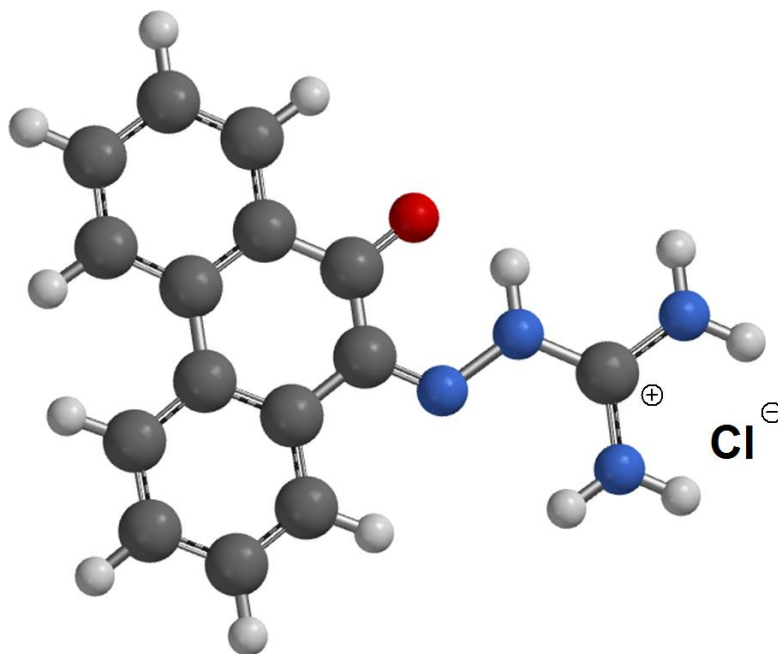


FIG. 5.2 – Estrutura tridimensional da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona no vácuo usando Spartan'8

5.4 PURIFICAÇÃO DO DDD

A amostra liofilizada do DDD foi ressuspensa em água Milli-Q e submetida três vezes ao *annealing* para purificação. O *annealing*, consiste em elevar, moderadamente, por alguns minutos, a temperatura da amostra acima de seu ponto de desnaturação (45,8 °C) e então resfriá-la a temperatura ambiente, por um tempo, com intuito de “forçar” as moléculas do DDD a assumirem a conformação de dupla fita. Acima da temperatura de fusão, as moléculas do DDD encontram-se na forma de fita simples, e quando se resfria a temperatura da amostra abaixo de seu ponto de desnaturação, força-se a formação de dupla hélice.

O DDD foi purificado, a temperatura ambiente, em HPLC através do processo de exclusão por peso molecular (também conhecido por permeação em gel ou filtração em gel) (COLLINS *et al.*, 2006), que consiste na separação de substâncias por diferença relativa de volume molecular. Basicamente, a mistura depositada sobre a matriz inerte (fase estacionária) é eluída continuamente por um solvente (fase móvel) de maneira que as moléculas de menor volume ficam mais tempo retidas devido à maior interação com a resina, ao passo que as moléculas maiores eluem com maior velocidade, possibilitando, assim, a separação da mistura (COLLINS *et al.*, 2006). Desta maneira, as moléculas do DDD na forma de dupla fita eluem mais rapidamente pela coluna do que as que se encontram em forma de fita simples, fragmentos de menor volume molecular relativo (FIG. 5.3).

Um espectrofotômetro ultravioleta acoplado à saída da coluna cromatográfica do HPLC emitia continuamente radiação eletromagnética a 280 nm (região UV) para detecção de qualquer componente da amostra que absorva radiação nesse comprimento de onda. O comprimento de onda de absorção máxima do DNA é em torno de 260 nm, sendo que maior será a absorbância pelo oligonucleotídeo quando este se encontra na forma de fita simples. Isto torna a técnica atrativa para determinação da conformação do DNA (<http://www.ufrgs.br/biofisica/Bio10003/Metfoto.pdf>).

Como o DNA absorve radiação UV na faixa de 280 nm, o espectro de purificação do DDD revela o volume de eluição dos fragmentos (em dupla fita e em fita simples) *versus* a intensidade do sinal referente à absorção de energia, medida em mAU (mili absorption unit). Quanto maior a intensidade do sinal, maior a concentração do composto. O espectro da FIG. 5.3 mostra a eluição, primeiramente, do DDD em dupla fita (maior volume molecular) seguida do DDD em fita simples (menor volume molecular). A intensidade relativamente

maior do sinal dos fragmentos em dupla fita em relação aos em fita simples indica maior predominância dos fragmentos na forma de dupla hélice na amostra. Pelo espectro de purificação do DDD, as frações de oito a doze indicaram a presença de DDD em sua forma de dupla hélice. O espectro de purificação do DDD apresentado na FIG. 5.3 é a média dos espectros obtidos para separar os fragmentos em dupla hélice de DNA (DDD) dos fragmentos em fita simples e impurezas de cada alíquota da amostra introduzida no HPLC.

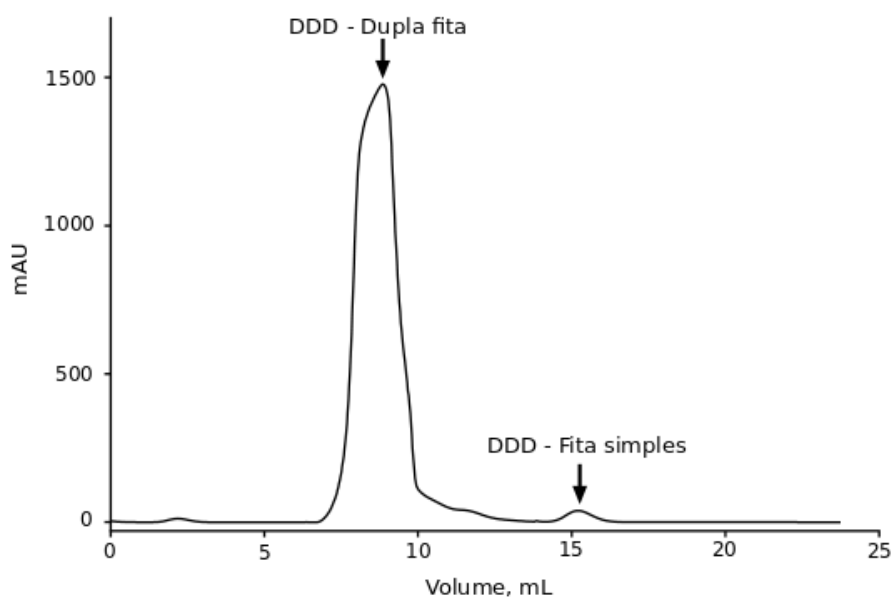


FIG. 5.3 – Espectro de purificação do DDD (Absorção de energia em mAU *versus* Volume em mL de eluição). A análise do espectro revela a separação das moléculas do DDD na forma de fita dupla, nas frações de oito a doze, da forma de fita simples.

5.5 ASSINALAMENTO POR RMN DO DDD

O DDD foi, primeiramente, assinalado na ausência do composto orgânico, tomando por base a comparação com o assinalamento prévio do mesmo oligonucleotídeo em material suplementar de RMN de ^1H (Biological Magnetic Resonance Data Bank Entry ID 17351) (De Rose *et al.*, 2012). A estrutura do DDD é apresentada juntamente com o resumo dos resultados do RMN bidimensional (NOESY) na FIG. 5.4 e na TAB. 5.2.

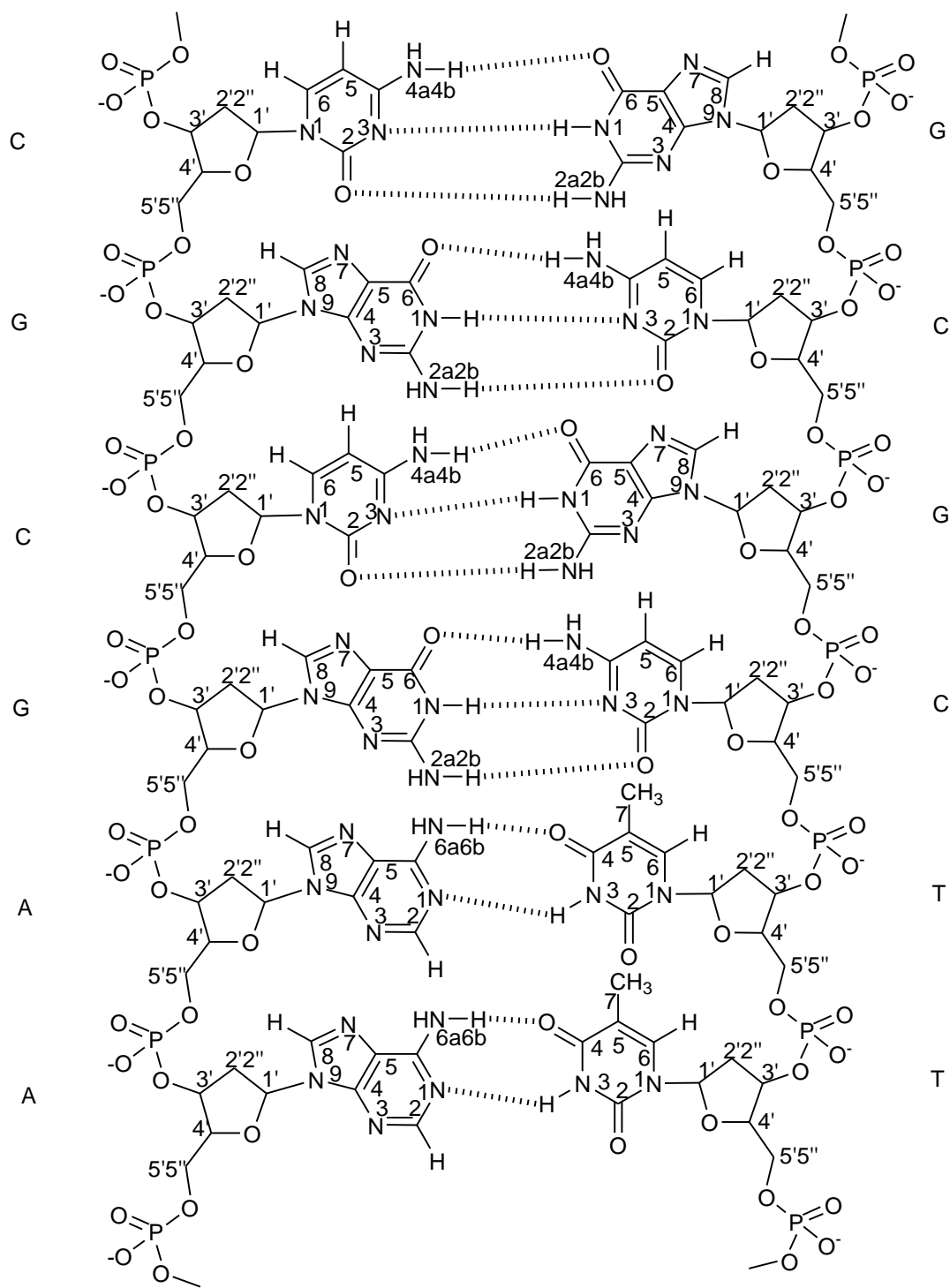


FIG. 5.4 – Estrutura molecular do DDD.

TAB. 5.2 – Dados de RMN para o DDD em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério: H = Prótons das bases nitrogenadas; H' = Prótons da pentose.

RMN BIDIOMENSIONAL(NOESY)					
Bases Nitrogenadas		δ_H (ppm)	Bases Nitrogenadas		δ_H (ppm)
1 CIT	H1'	5,70	7 TIM	H1'	5,89
	H2' H2''	1,93 / 2,38		H2' H2''	1,97 / 2,56
	H3'	4,68		H3'	4,83
	H4'	4,05		H4'	4,19
	H5' H5''	3,72 / **		H5' H5''	4,35 / 4,35
	H4a H4b	*		H3	13,68
	H5	5,83		H6	7,11
	H6	7,59		H7	1,26
2 GUA	H1'	5,86	8 TIM	H1'	6,09
	H2' H2''	2,64 / 2,69		H2' H2''	2,15 / 2,54
	H3'	4,96		H3'	4,89
	H4'	4,33		H4'	4,19
	H5' H5''	3,97 / 4,07		H5' H5''	4,11 / **
	H1	13,06		H3	13,80
	H2a H2b	*		H6	7,36
	H8	7,94		H7	1,52
3 CIT	H1'	5,57	9 CIT	H1'	5,64
	H2' H2''	1,84 / 2,26		H2' H2''	2,06 / 2,40
	H3'	4,80		H3'	4,87
	H4'	4,12		H4'	4,14
	H5' H5''	**		H5' H5''	4,03 / 4,03
	H4a H4b	6,46 / 8,38		H4a H4b	6,84 / 8,42
	H5	5,36		H5	5,61
	H6	7,26		H6	7,45
4 GUA	H1'	5,41	10 GUA	H1'	5,83
	H2' H2''	2,66 / 2,74		H2' H2''	2,64 / 2,69

5 ADE	H3'	4,99	11 CIT	H3'	4,99
	H4'	4,31		H4'	4,36
	H5' H5''	3,98 / 4,09		H5' H5''	4,03 / 4,12
	H1	12,71		H1	12,90
	H2a H2b	*		H2a H2b	*
	H8	7,85		H8	7,91
	H1'	5,99		H1'	5,72
	H2' H2''	2,69 / 2,93		H2' H2''	1,89 / 2,31
	H3'	5,06		H3'	4,81
	H4'	4,46		H4'	4,15
	H5' H5''	4,15 / 4,19		H5' H5''	**
6 ADE	H2	7,62	12 GUA	H4a H4b	6,60 / 8,45
	H6a H6b	*		H5	5,43
	H8	8,11		H6	7,31
	H1'	6,14		H1'	6,12
	H2' H2''	2,56 / 2,92		H2' H2''	2,37 / 2,62
	H3'	5,00		H3'	4,68
	H4'	4,46		H4'	4,17
	H5' H5''	4,32 / 4,32		H5' H5''	4,06 / 4,06
H2	7,62	H1	*		
H6a H6b	*	H2	*		
H8	8,12	H8	7,92		

* prótons das bases nitrogenadas cujos valores de deslocamento químico não puderam ser atribuídos devido a distância espacial superior a 5 Å de qualquer hidrogênio devidamente assinalado;

** prótons da desoxirribose cujos valores de deslocamento químico não puderam ser assinalados devido a sobreposição de sinais.

Neste trabalho o experimento NOESY foi utilizado para elucidar o acoplamento espacial (até 5 Å) tanto entre os hidrogênios pertencentes a um mesmo nucleotídeo quanto entre prótons de nucleotídeos vizinhos ou bases nitrogenadas pareadas.

O espectro TOCSY sobreposto ao espectro NOESY, permite identificar os prótons pertencentes a um mesmo sistema de spins (desoxirribose ou base nitrogenada). Os sinais do espectro NOESY sem sobreposição do TOCSY correspondem tanto a interações entre uma determinada desoxirribose e sua respectiva base nitrogenada, quanto a interações entre nucleotídeos vizinhos ou bases nitrogenadas pareadas.

O mecanismo de assinalamento do DDD inicia-se pela escolha de um hidrogênio cujo deslocamento químico é destacável entre os demais: metila (H7) da timina. Dessa forma, por meio de três procedimentos, é possível assinalar o DDD através da identificação dos prótons que interagem próximos do espaço desta metila.

O primeiro procedimento, partindo do deslocamento químico desta metila, consistiu na identificação dos sinais referentes às interações desta metila com os prótons presentes na mesma base nitrogenada (timina), ou seja, que pertencem ao mesmo sistema de spins. Este procedimento foi escolhido como inicial, pois os sinais referentes às interações espaciais da metila da timina com os prótons da mesma base nitrogenada aparecem tanto no espectro NOESY quanto, confirmados, pelo espectro TOCSY, já que estes hidrogênios que interagem entre si, estão no mesmo sistema de spins. Portanto, partindo da metila (H7) da timina, foram identificados os sinais referentes às interações deste grupo de prótons com os hidrogênios H3 (FIG. 5.5) e H6 (FIG. 5.6) pertencentes a mesma base nitrogenada.

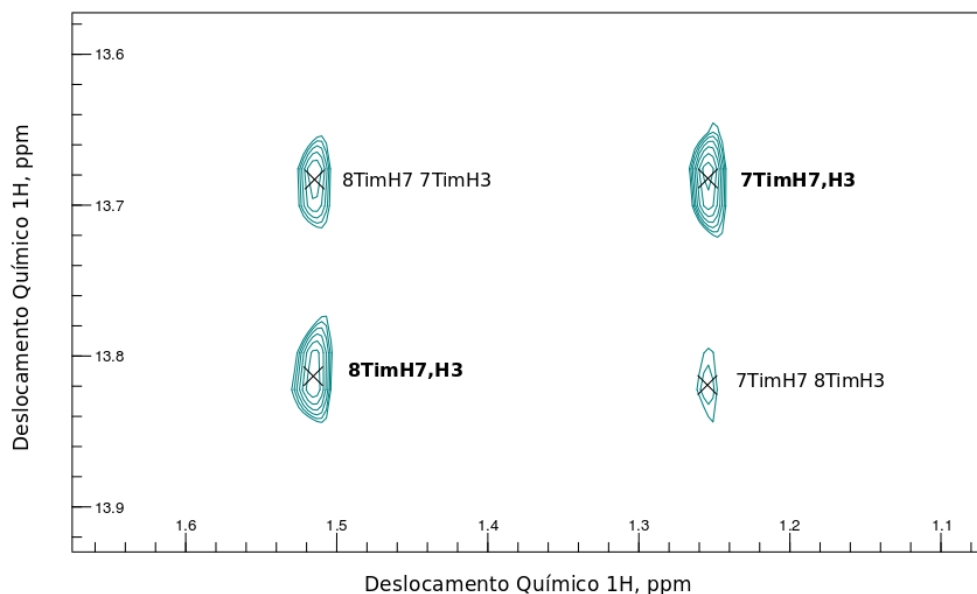


FIG. 5.5 – Espectro de RMN de NOESY para o DDD em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério (verde água). O espectro mostra a interação espacial entre a metila (H7) da timina com o hidrogênio H3 pertencente à mesma base nitrogenada (negrito).

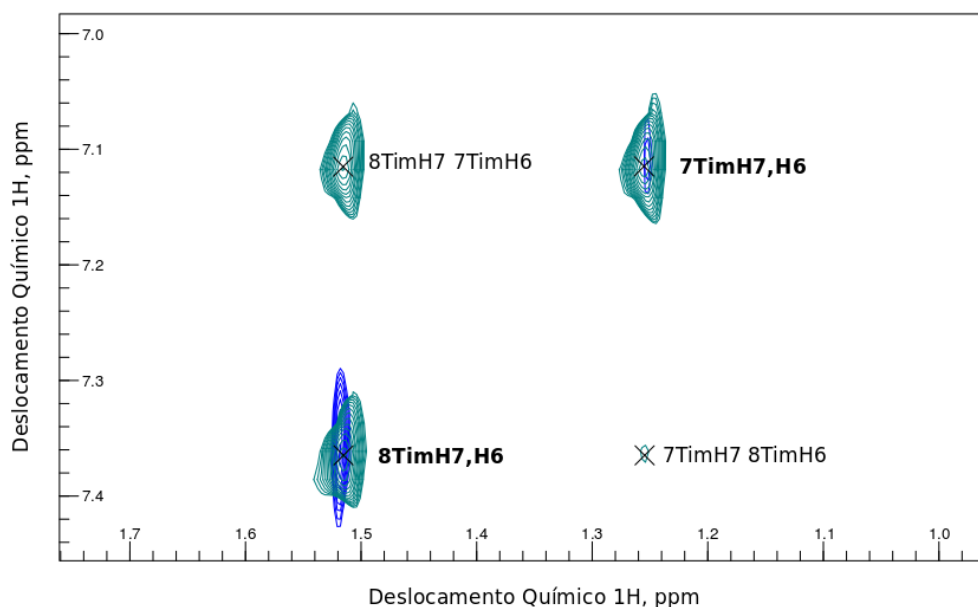


FIG. 5.6 – Sobreposição dos espectros de RMN de NOESY e TOCSY (verde água e azul, respectivamente) para o DDD em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério. Os espectros mostram a interação espacial entre a metila (H7) da timina com o hidrogênio H6 pertencente à mesma base nitrogenada (negrito).

O segundo passo foi determinar os sinais das interações da base nitrogenada assinalada com sua respectiva desoxirribose e com seus nucleotídeos vizinhos. Neste procedimento, os sinais referentes às interações da base nitrogenada assinalada com sua respectiva desoxirribose e com seus nucleotídeos vizinhos aparecem, somente, no espectro NOESY, sendo ausentes no espectro TOCSY, já que estes hidrogênios que interagem entre si, estão situados em sistema de spins diferentes. A partir da base assinalada, este procedimento, além de permitir que o sistema de spins da respectiva desoxirribose seja assinalado, permite, também, o sequenciamento dos nucleotídeos vizinhos. Uma vez identificado um próton de um determinado sistema de spins (respectiva desoxirribose ou nucleotídeos vizinhos), repete-se o primeiro procedimento para assinalar todos os hidrogênios pertencentes ao sistema encontrado.

Por exemplo, a partir da timina assinalada, pode-se observar a interação da metila (H7) desta timina tanto com os prótons H2' e H2'' da sua respectiva desoxirribose (FIG. 5.7) quanto com a metila (H7) da timina vizinha (FIG. 5.8).

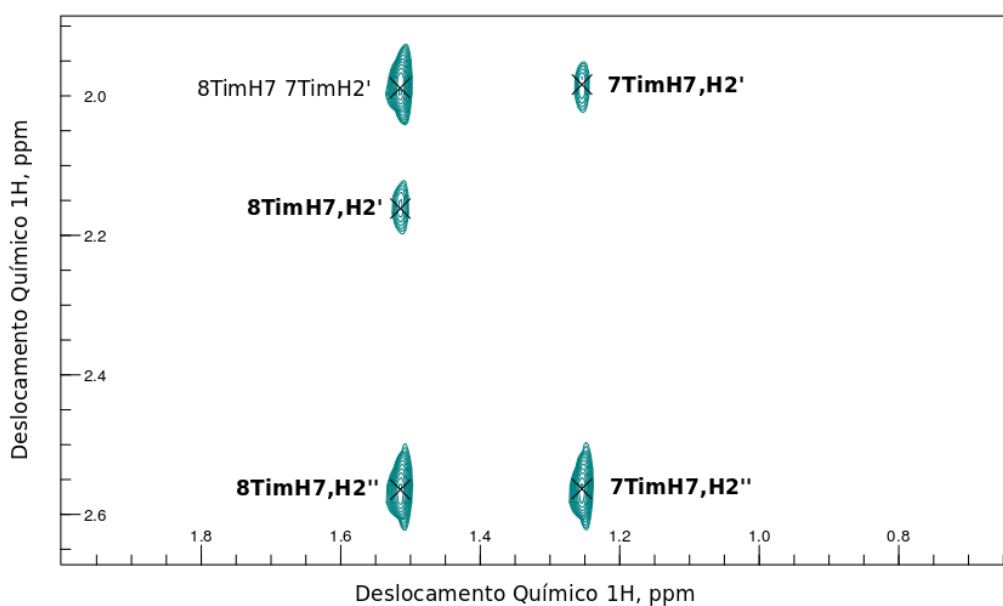


FIG. 5.7 – Espectro de RMN de NOESY para o DDD em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério (verde água). O espectro mostra a interação espacial entre a metila (H7) da timina com os hidrogênios H2' e H2'' pertencentes à sua respectiva desoxirribose (negrito).

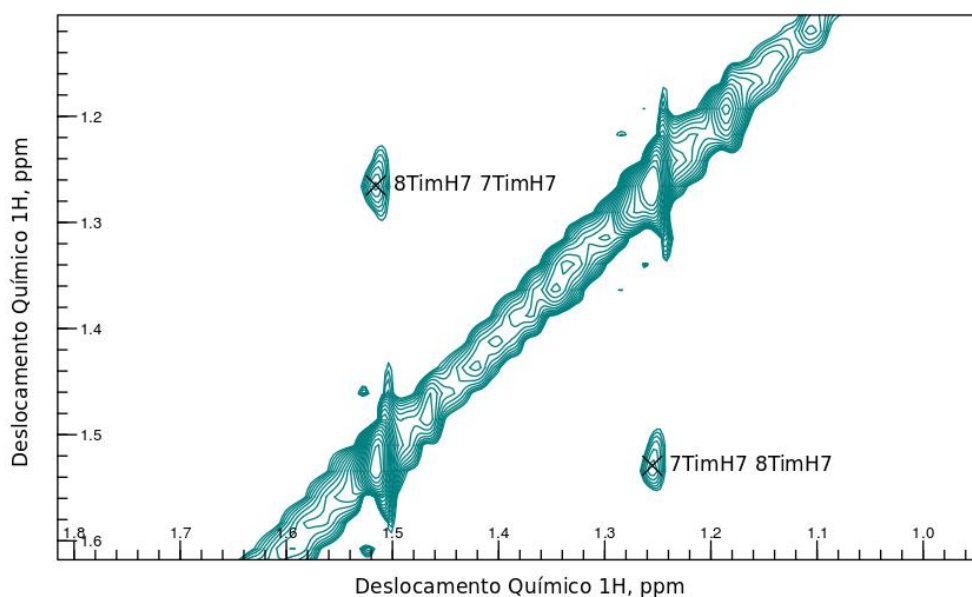


FIG. 5.8 – Espectro de RMN de NOESY para o DDD em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério (verde água). O espectro mostra a interação espacial entre as metilas (H7) das timinas vizinhas.

A identificação dos sinais referentes ao acoplamento espacial, tanto entre uma determinada desoxirribose e sua respectiva base nitrogenada, quanto entre nucleotídeos vizinhos, foi realizada tendo como base de apoio, a metodologia de distância máxima entre prótons não intercambiáveis com a água, como apresentado na TAB. 5.3.

TAB. 5.3 – Distância máxima entre prótons do DNA não intercambiáveis com a água: H = Prótons da base nitrogenada; H' = Prótons da pentose (WÜTHRICH, 1986).

Interações entre Desoxirribose e respectiva Base Nitrogenada	Distância (Å) B-DNA	Interações entre Base Nitrogenadas Vizinhas	Distância (Å) B-DNA
1'; 5 CIT	4.3	CIT 5 ; 5 CIT	4.7
1'; 6 TIM/CIT	3.5	CIT 5 ; 7 TIM	4.7
1'; 8 ADE/GUA	3.6	TIM 7 ; 7 TIM	5.0
2'; 5 CIT	3.6	TIM/CIT 6 ; 5 CIT	3.9
2'; 6 TIM/CIT	4.0	TIM/CIT 6 ; 7 TIM	3.8
2'; 7 TIM	3.4	TIM/CIT 6 ; 8 ADE/GUA	4.8
2'; 8 ADE/GUA	3.8	ADE/GUA 8 ; 5 CIT	3.9
2''; 5 CIT	2.7	ADE/GUA 8 ; 7 TIM	3.8
2''; 6 TIM/CIT	2.2	ADE/GUA 8 ; 8 ADE/GUA	5.0
2''; 7 TIM	2.9	-	-
2''; 8 ADE/GUA	2.1	-	-
3'; 6 TIM/CIT	4.6	-	-
3'; 8 ADE/GUA	4.6	-	-

O último procedimento foi identificar os sinais das interações da base nitrogenada assinalada com sua respectiva base pareada. Neste procedimento, os sinais referentes às interações da base assinalada com sua respectiva base nitrogenada pareada aparecem, somente, no espectro NOESY, sendo ausentes no espectro TOCSY, já que estes hidrogênios que interagem entre si, estão situados em sistema de spins diferentes. A partir da base assinalada, este procedimento permite identificar sua base nitrogenada complementar, ou seja, permite que o sistema de spins da sua respectiva base nitrogenada pareada seja identificado. Uma vez identificado um próton de um determinado sistema de spins (base nitrogenada pareada), repete-se o primeiro procedimento para assinalar todos os hidrogênios pertencentes ao sistema atingido. Por exemplo, a partir da timina assinalada, é possível observar a interação do hidrogênio H3 desta timina com o próton H2 da sua respectiva base nitrogenada pareada, no caso a adenina (FIG. 5.9).

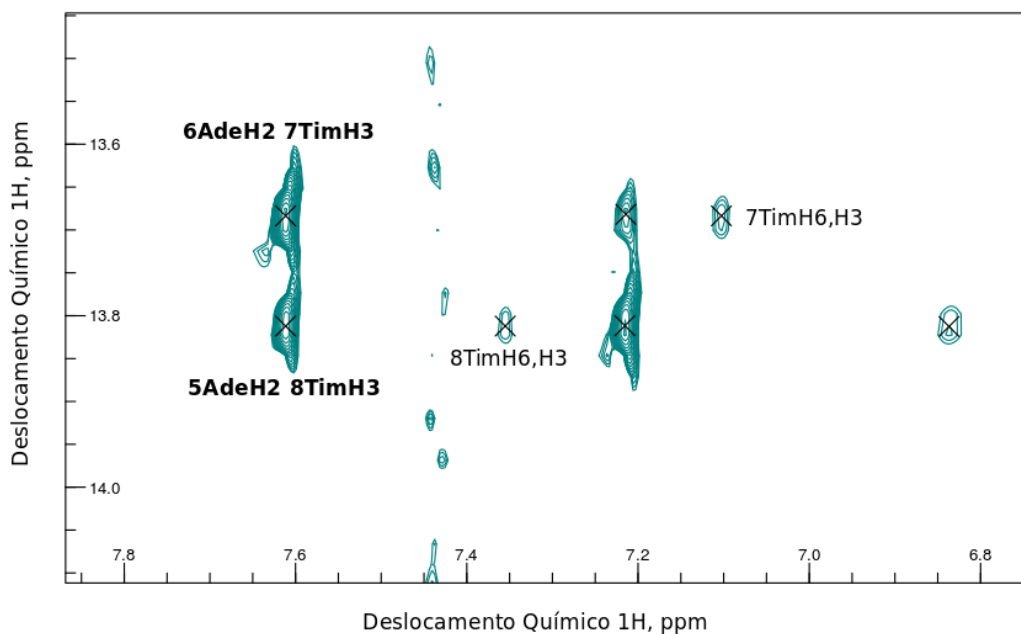


FIG. 5.9 – Espectro de RMN de NOESY para o DDD em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério (verde água). O espectro mostra a interação espacial do hidrogênio H3 da timina com o próton H2 da sua respectiva base nitrogenada pareada (negrito).

A caracterização dos sinais referentes às interações entre nucleotídeos através dos hidrogênios responsáveis pelo pareamento entre bases nitrogenadas, por meio das ligações de hidrogênio, foi realizada tendo como base a metodologia de distância máxima entre prótons intercambiáveis com a água, como apresentado na TAB. 5.4.

TAB. 5.4 – NOE's observáveis entre os prótons intercambiáveis com a água das bases nitrogenadas do DDD (WÜTHRICH, 1986).

Interações entre Bases Nitrogenadas	Interações entre Base Nitrogenadas
Pareadas	Vizinhas
TIM 3 ; 2 ADE	ADE 2 ; 2ADE
TIM 3 ; 6 ADE	ADE 6 ; 6 ADE
GUA 1 ; 4 CIT	ADE 2 ; 3 TIM
-	ADE 6 ; 3 TIM
-	ADE 2 ; 1 GUA
-	ADE 2 ; 2 GUA
-	ADE 6 ; 1 GUA
-	ADE 6 ; 4 CIT
-	GUA 1 ; 1 GUA
-	GUA 2 ; 2 GUA
-	GUA 1 ; 3 TIM
-	GUA 2 ; 3 TIM
-	GUA 1 ; 4 CIT
-	TIM 3 ; 3 TIM
-	TIM 3 ; 4 CIT
-	CIT 4 ; 4 CIT

Portanto, o DDD foi assinalado utilizando três passos para a caracterização dos sinais referentes às interações entre hidrogênios de sua cadeia polinucleotídica. Os procedimentos tiveram como base a metodologia de apoio de WÜTHRICH e o material suplementar de RMN de ^1H (Biological Magnetic Resonance Data Bank Entry ID 17351) (De Rose *et al.*, 2012) para o assinalamento do DDD.

5.6 MEDIDAS DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO/DISSOCIAÇÃO

A afinidade entre uma macromolécula e seu respectivo ligante pode ser medida por meio das constantes de associação/dissociação. As constantes de associação/dissociação são relacionadas, em geral, ao grau de ligação (θ), definido como a porcentagem de sítios da macromolécula associados a um ligante. Quanto mais próximo de 1, maior a associação entre a macromolécula com seu respectivo ligante, ou seja, mais próximo da macromolécula apresentar todos os seus sítios (100%) ocupados por um ligante.

O grau de ligação (θ) é medido através de algum parâmetro biofísico (p), que estabelece a razão entre o número de sítios ocupados e totais da macromolécula, resultando, assim, na porcentagem de sítios da macromolécula associados a um ligante. Os sítios ocupados podem ser obtidos pela diferença entre um parâmetro biofísico variável (p) e outro inicial (p_0) (macromolécula na ausência de ligante), enquanto que os sítios totais são obtidos pela diferença entre o parâmetro biofísico máximo (p_{\max}) (macromolécula em sua máxima associação com seu respectivo ligante) e inicial (p_0) (macromolécula na ausência de ligante).

A equação matemática que relaciona o grau de ligação (θ) ao parâmetro biofísico (p) é representada pela EQ. 5.1.

$$\theta = \text{sítios ocupados/ sítios totais} = \frac{p - p_0}{p_{\max} - p_0} \quad (\text{EQ. 5.1})$$

Dentre os diversos parâmetros biofísicos, podem ser utilizados o deslocamento químico em RMN, a emissão de fluorescência, a espectroscopia de Infravermelho e a espectroscopia de UV/VIS, entre outros. Neste trabalho, foi adotada a técnica de UV/Vis para o desenvolvimento dos estudos relacionados ao grau de ligação entre o DDD e a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona. Para tanto, utilizou-se o processo de titulação, medindo-se a variação do comprimento de onda (parâmetro biofísico) absorvido pela 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona, quando frações deste composto eram usadas para titulação do DDD.

A análise do espectro de absorção no UV/Vis da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona no processo de titulação de 1005 μL do tampão fosfato de sódio com alíquotas de 2 μL desse composto orgânico (1,67 mM) revelou comprimento de onda de absorção máxima em média de 365 nm para esse composto. Os resultados podem ser vistos na TAB. 5.5 e na FIG. 5.10.

TAB. 5.5 – Comprimento de onda de absorção máxima da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona para cada alíquota de 2 μL deste ligante (1,67 mM) adicionada em 1005 μL do tampão fosfato de sódio.

Número de alíquotas (2 μL) adicionadas	Volume Total (μL)	[9,10-fenantrenoquinona guanil-hidrazona] (μM)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
0	1005	0	-
1	1007	3,32	364,98
2	1009	6,62	364,85
3	1011	9,91	364,85
4	1013	13,2	365,75
5	1015	16,45	*
6	1017	19,71	365,75
7	1019	22,94	365,62
8	1021	26,17	365,11
9	1023	29,38	365,49
10	1025	32,59	366,00
11	1027	35,77	364,98
12	1029	38,95	366,00
13	1031	42,11	365,49
14	1033	45,27	365,49
15	1035	48,41	365,49

* erro experimental não-controlado na medida do comprimento de onda de absorção máxima da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona para a alíquota de número 5, impossibilitando, assim, sua leitura.

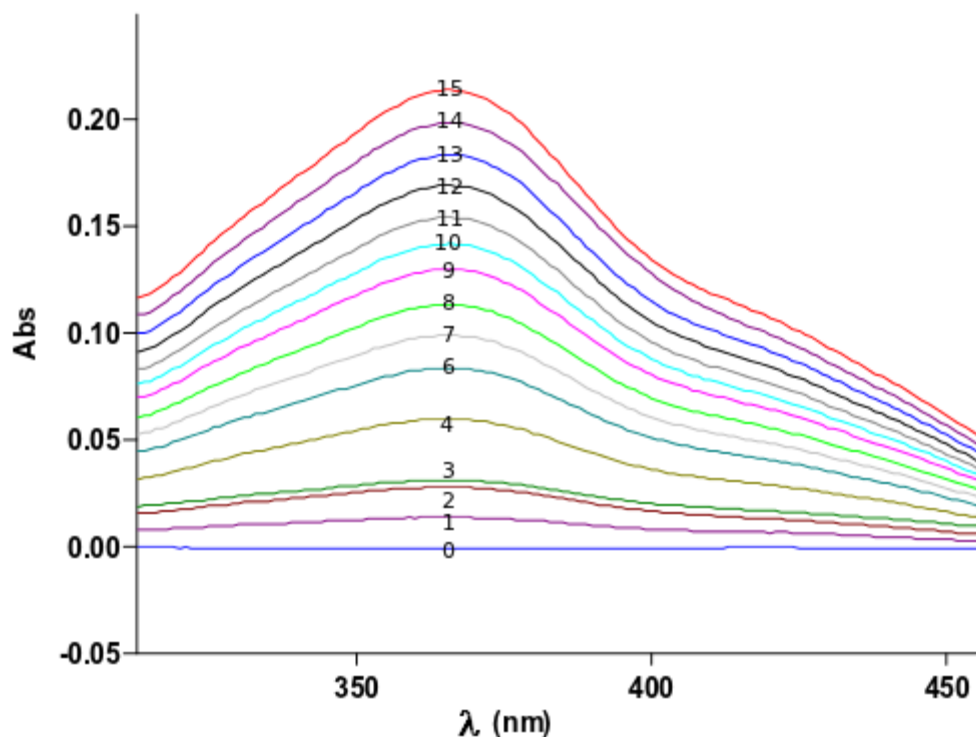


FIG. 5.10 – Espectro de absorção no UV/Vis da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (Absorbância *versus* comprimento de onda em nm) para cada alíquota (numerada) de 2 μL deste ligante (1,67 mM) adicionada em 1005 μL do tampão fosfato de sódio. A análise do espectro revela comprimento de onda de absorção máxima da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em média de 365 nm durante o processo de titulação.

A interpretação do espectro de absorção no UV/Vis do DDD (3,96 μM) em 1005 μL do tampão fosfato de sódio revelou comprimento de onda de absorção máxima em 260 nm para esse oligonucleotídeo – como previamente relatada na literatura (FIG. 5.11).

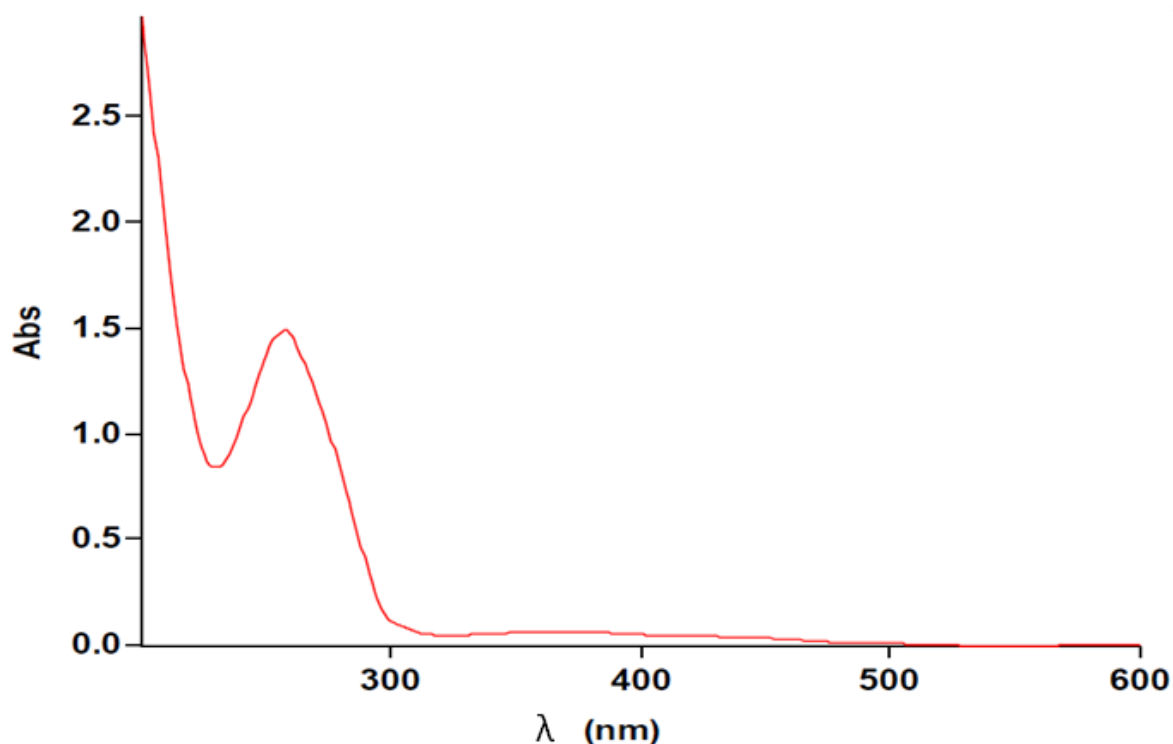


FIG 5.11 – Espectro de absorção no UV/Vis do DDD (Absorbância *versus* comprimento de onda em nm). A análise do espectro revela comprimento de onda de absorção máxima do DDD em 260 nm.

Para processo de titulação do DDD, ou seja, a adição de alíquotas de 2 μL da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (1,67 mM) a 1005 μL do tampão fosfato de sódio contendo o DDD (3,96 μM) foram analisados os comprimentos de onda de absorção desse composto.

Para cada alíquota de 2 μL da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (aproximadamente 3,3 nmols) adicionada à solução-tampão contendo o DDD (3,98 nmols) foi medido o comprimento de onda absorvido pelo ligante em função de sua respectiva concentração molar. Os resultados dessa titulação podem ser vistos na TAB 5.6 e na FIG 5.12.

TAB. 5.6 – Comprimento de onda de absorção máxima da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona para cada alíquota de 2 μL deste ligante (1,67 mM) adicionada em 1005 μL do tampão fosfato de sódio contendo 3,98 nmols do DDD - Processo de titulação do DDD.

Número de alíquotas (2 μL) adicionadas	Volume Total (μL)	[DDD] (μM)	[9,10-fenantrenoquinona guanil-hidrazona] (μM)	$\lambda_{\text{máx}}$(nm)
0	1005	3,960	0	-
1	1007	3,952	3,32	364,96
2	1009	3,944	6,62	365,05
3	1011	3,937	9,91	364,96
4	1013	3,929	13,2	364,96
5	1015	3,921	16,45	364,86
6	1017	3,913	19,71	364,77
7	1019	3,906	22,94	364,49
8	1021	3,900	26,17	364,40
9	1023	3,891	29,38	364,96
10	1025	3,883	32,59	366,82
11	1027	3,875	35,77	364,58
12	1029	3,868	38,95	364,40
13	1031	3,860	42,11	364,77
14	1033	3,853	45,27	364,49
15	1035	3,845	48,41	364,58

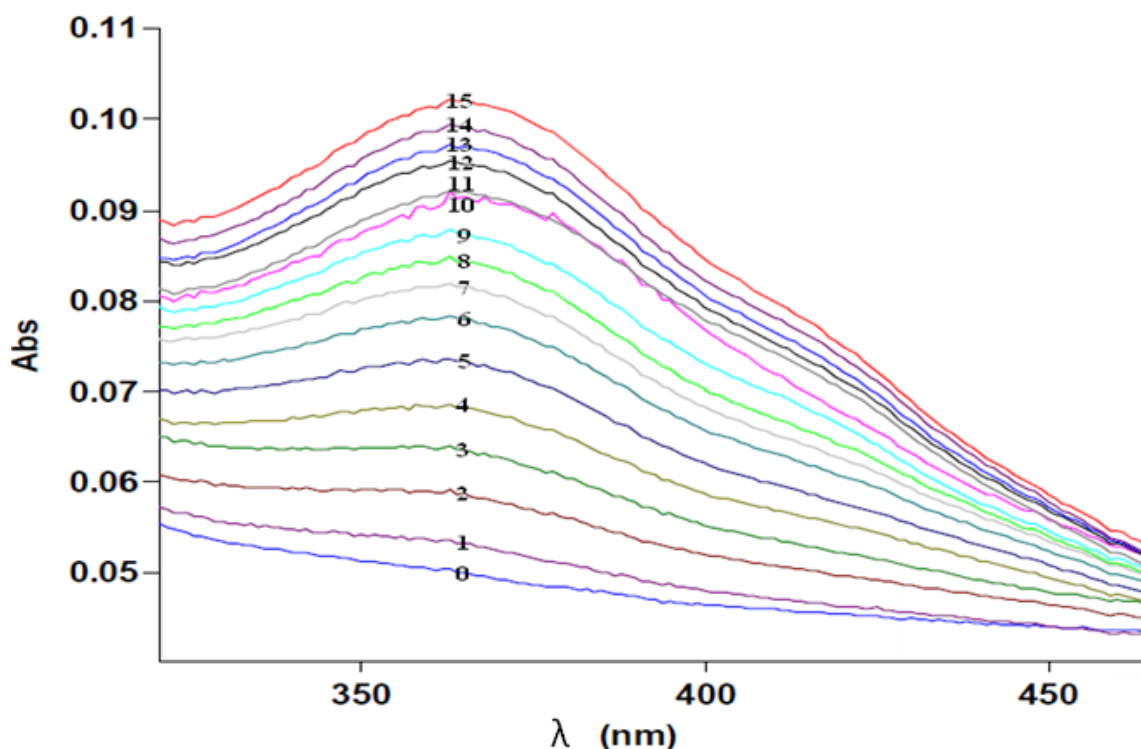


FIG. 5.12 – Espectro de absorção no UV/Vis da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (Absorbância *versus* comprimento de onda em nm) para cada alíquota (numerada) de 2 μ L deste ligante (1,67 mM) adicionada em 1005 μ L do tampão fosfato de sódio contendo 3,98 nmols do DDD - Processo de titulação do DDD. A análise do espectro revela comprimento de onda de absorção máxima da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona, constantemente, em torno de 365 nm, durante o processo de titulação.

A análise do espectro de UV/Vis da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona no processo de titulação do DDD (3,96 μ M) com alíquotas de 2 μ L deste ligante (1,67 mM), revelou o próprio comprimento de onda de absorção máxima deste ligante, ou seja, em torno de 365 nm, durante o processo de titulação.

Excetuando uma interação fraca, quando uma pequena molécula interage com outra molécula ocorre um aumento no número de cromóforos (grupo de átomos responsável por absorção da radiação na região UV/Vis) do sistema, ocasionando, assim, deslocamento batocrômico, ou seja, deslocamento para maiores comprimentos de onda. Entretanto, como observado na TAB. 5.6, não houve variação do comprimento de onda de absorção máxima para a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazonana na titulação do DDD, impossibilitando, por consequência, a construção da curva de titulação do DDD, a partir da qual poder-se-ia

proceder o cálculo da constante de associação/dissociação que estabelece a proporção estequiométrica entre macromolécula e seu respectivo ligante.

Devido à baixa solubilidade (fator limitante) apresentada pela 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em tampão fosfato de sódio, como abordado no item 5.2, foi estabelecida a proporção equimolar de 1:1 (DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona) e em concentrações de 6,47 mM – menor que a utilizada para análise do DDD por RMN (item 4.6) – para realizar o assinalamento das ressonâncias do complexo. Assim, ficou impossibilitado o trabalho com excessos maiores de ligante.

5.7 ASSINALAMENTO DAS RESSONÂNCIAS DO COMPLEXO: DDD/9,10-FENANTRENOQUINONA GUANIL-HIDRAZONA

5.7.1 ASSINALAMENTO POR RMN DO DDD NO COMPLEXO

O experimento para preparação equimolar do complexo (DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona) em concentração 6,47 mM em 340 µL do tampão fosfato de sódio indicou que a presença de DDD aumenta a solubilidade do ligante. Fato experimental que deve estar relacionado a interação entre o DDD e o ligante, já que o DDD é solúvel neste tampão.

Foram adquiridos os espectros bidimensionais NOESY e TOCSY do complexo DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona para observar os novos valores de deslocamentos químicos dos prótons do oligonucleotídeo (DDD).

O mecanismo de assinalamento do DDD no complexo DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona, foi realizado da mesma forma em que o DDD foi assinalado na ausência do ligante. Entretanto, para auxílio no assinalamento do DDD no complexo, seu espectro NOESY adquirido foi sobreposto com seu espectro NOESY previamente assinalado na ausência da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.

O resumo dos resultados do RMN bidimensional (NOESY) é apresentado na TAB 5.7.

TAB. 5.7 – Dados de RMN para o DDD na presença da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério: H = Prótons das bases nitrogenadas; H' = Prótons da pentose.

RMN BIDIOMENSIONAL (NOESY)					
Bases Nitrogenadas		δH (ppm)	Bases Nitrogenadas		δH (ppm)
1 CIT	H1'	5,77	7 TIM	H1'	5,90
	H2' H2''	1,98 / 2,41		H2' H2''	1,99 / 2,57
	H3'	4,70		H3'	**
	H4'	4,09		H4'	4,20
	H5' H5''	3,75 / **		H5' H5''	**
	H4a H4b	*		H3	13,64
	H5	5,92		H6	7,11
	H6	7,65		H7	1,29
2 GUA	H1'	5,89	8 TIM	H1'	6,09
	H2' H2''	2,66 / 2,72		H2' H2''	2,17 / 2,55
	H3'	4,98		H3'	4,89
	H4'	4,35		H4'	4,20
	H5' H5''	3,97 / 4,07		H5' H5''	4,13 / **
	H1	13,05		H3	13,76
	H2a H2b	*		H6	7,38
	H8	7,96		H7	1,53
3 CIT	H1'	5,62	9 CIT	H1'	5,65
	H2' H2''	1,86 / 2,28		H2' H2''	2,07 / 2,41
	H3'	4,82		H3'	4,87
	H4'	4,15		H4'	4,15
	H5' H5''	**		H5' H5''	**
	H4a H4b	6,43 / 8,39		H4a H4b	6,81 / 8,42
	H5	5,38		H5	5,64
	H6	7,27		H6	7,47
4 GUA	H1'	5,43	10 GUA	H1'	5,85
	H2' H2''	2,67 / 2,75		H2' H2''	2,65 / 2,70

5 ADE	H3'	5,00	11 CIT	H3'	4,98
	H4'	4,32		H4'	4,36
	H5' H5''	**		H5' H5''	4,00 / 4,10
	H1	12,71		H1	12,90
	H2a H2b	*		H2a H2b	*
	H8	7,86		H8	7,90
	H1'	5,99		H1'	5,76
	H2' H2''	2,70 / 2,92		H2' H2''	1,91 / 2,33
	H3'	5,07		H3'	4,82
	H4'	4,46		H4'	4,15
	H5' H5''	**		H5' H5''	**
	H2	7,62		H4a H4b	6,59 / 8,45
	H6a H6b	*		H5	5,44
	H8	8,12		H6	7,33
6 ADE	H1'	6,15	12 GUA	H1'	6,16
	H2' H2''	2,57 / 2,92		H2' H2''	2,39 / 2,60
	H3'	5,01		H3'	4,70
	H4'	4,46		H4'	4,19
	H5' H5''	**		H5' H5''	4,09 / 4,09
	H2	7,63		H1	*
	H6a H6b	*		H2	*
	H8	8,11		H8	7,95

* prótons das bases nitrogenadas cujos valores de deslocamento químico não puderam ser atribuídos devido a distância espacial superior a 5 Å de qualquer hidrogênio devidamente assinalado.

**prótons da desoxirribose cujos valores de deslocamento químico não puderam ser assinalados devido a sobreposição de sinais.

Para elucidar os possíveis sítios de interação do DDD no complexo DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona, foram analisadas as mudanças de deslocamentos químicos que os hidrogênios deste oligonucleotídeo apresentaram na presença deste ligante. Os resultados da variação dos deslocamentos químicos que os hidrogênios do DDD sofreram na presença do composto orgânico são apresentados na TAB 5.8.

TAB. 5.8 – Dados de RMN (NOESY, deslocamentos químicos) para o DDD na ausência e na presença do ligante em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério: H = Prótons das bases nitrogenadas; H' = Prótons da pentose. Obs. A média e desvio padrão da coluna contendo os valores de $\Delta\delta_{\text{DDD}}$ são de 0.011 e 0.021, respectivamente. Considera-se que $\Delta\delta_{\text{DDD}}$ acima de 0.042 ppm são significativas (variação maior que duas vezes o desvios padrão) (negrito).

	Bases Nitrogenadas	δ_{DDD} (ppm)	$\delta_{\text{DDD+ligante}}$ (ppm)	$\Delta\delta_{\text{DDD}}$ (ppm)	Bases Nitrogenadas	δ_{DDD} (ppm)	$\delta_{\text{DDD+ligante}}$ (ppm)	$\Delta\delta_{\text{DDD}}$ (ppm)		
1 CIT	H1'	5,70	5,77	0,07	7 TIM	H1'	5,89	5,90	0,01	
	H2'	1,93	1,98	0,05		H2'	1,97	1,99	0,02	
	H2''	2,38	2,41	0,03		H2''	2,56	2,57	0,01	
	H3'	4,68	4,70	0,02		H3'	4,83	**	**	
	H4'	4,05	4,09	0,04		H4'	4,19	4,20	0,01	
	H5'	3,72	3,75	-0,03		H5'	4,35	**	**	
	H5''	**	**	**		H5''	4,35	**	**	
	H4a	*	*	*		H3	13,68	13,64	-0,04	
	H4b	*	*	*			H6	7,11	7,11	0
	H5	5,83	5,92	0,09			H7	1,26	1,29	0,03
H6	7,59	7,65	0,06	8 TIM	H1'		6,09	6,09	0	
2 GUA	H1'	5,86	5,89		0,03	H2'	2,15	2,17	0,02	
	H2'	2,64	2,66		0,02	H2''	2,54	2,55	0,01	
	H2''	2,69	2,72		0,03	H3'	4,89	4,89	0	
	H3'	4,96	4,98		0,02	H4'	4,19	4,20	0,01	
	H4'	4,33	4,35		0,02	H5'	4,11	4,13	0,02	
	H5'	3,97	4,00	-0,03						

	H5''	4,07	**	**		H5''	**	**	**
	H1	13,06	13,05	-0,01		H3	13,80	13,76	-0,04
	H2a	*	*	*		H6	7,36	7,38	0,02
	H2b	*	*	*		H7	1,52	1,53	0,01
	H8	7,94	7,96	0,02		H1'	5,64	5,65	0,01
	H1'	5,57	5,62	0,05		H2'	2,06	2,07	0,01
	H2'	1,84	1,86	0,02		H2''	2,40	2,41	0,01
	H2''	2,26	2,28	0,02		H3'	4,87	4,87	0
	H3'	4,80	4,82	0,02		H4'	4,14	4,15	0,01
	H4'	4,12	4,15	0,03		H5'	4,03	**	**
3 CIT	H5'	**	**	**	9 CIT	H5''	4,03	**	**
	H5''	**	**	**		H4a	6,84	6,81	-0,03
	H4a	6,46	6,43	-0,03		H4b	8,42	8,42	0
	H4b	8,38	8,39	0,01		H5	5,61	5,64	0,03
	H5	5,36	5,38	0,02		H6	7,45	7,47	0,02
	H6	7,26	7,27	0,01		H1'	5,83	5,85	0,02
	H1'	5,41	5,43	0,02		H2'	2,64	2,65	0,01
	H2'	2,66	2,67	0,01		H2''	2,69	2,70	0,01
	H2''	2,74	2,75	0,01		H3'	4,99	4,98	-0,01
	H3'	4,99	5,00	0,01		H4'	4,36	4,36	0
	H4'	4,31	4,32	0,01		H5'	4,03	4,00	-0,03
4 GUA	H5'	3,98	**	**	10 GUA	H5''	4,12	4,10	-0,02
	H5''	4,09	**	**		H1	12,90	12,90	0
	H1	12,71	12,71	0		H2a	*	*	*
	H2a	*	*	*		H2b	*	*	*
	H2b	*	*	*		H8	7,91	7,90	-0,01
	H8	7,85	7,86	0,01		H1'	5,72	5,76	0,04
	H1'	5,99	5,99	0		H2'	1,89	1,91	0,02
	H2'	2,69	2,70	0,01		H2''	2,31	2,33	0,02
5 ADE	H2''	2,93	2,92	-0,01	11 CIT	H3'	4,81	4,82	0,01
	H3'	5,06	5,07	0,01		H4'	4,15	4,15	0
	H4'	4,46	4,46	0					

	H5'	4,15	**	**		H5'	**	**	**
	H5''	4,19	**	**		H5''	**	**	**
	H2	7,62	7,62	0		H4a	6,60	6,59	-0,01
	H6a	*	*	*		H4b	8,45	8,45	0
	H6b	*	*	*		H5	5,43	5,44	0,01
	H8	8,11	8,12	0,01		H6	7,31	7,33	0,02
	H1'	6,14	6,15	0,01		H1'	6,12	6,16	0,04
	H2'	2,56	2,57	0,01		H2'	2,37	2,39	0,02
	H2''	2,92	2,92	0		H2''	2,62	2,60	-0,02
	H3'	5,00	5,01	0,01		H3'	4,68	4,70	0,02
	H4'	4,46	4,46	0		H4'	4,17	4,19	0,02
6 ADE	H5'	4,32	**	**	12 GUA	H5'	4,06	4,09	0,03
	H5''	4,32	**	**		H5''	4,06	4,09	0,03
	H2	7,62	7,63	0,01		H1	*	*	*
	H6a	*	*	*			*	*	*
	H6b	*	*	*		H2	*	*	*
	H8	8,12	8,11	-0,01		H8	7,92	7,95	0,03

* prótons das bases nitrogenadas cujos valores de deslocamento químico não puderam ser atribuídos devido a distância espacial superior a 5 Å de qualquer hidrogênio devidamente assinalado.

**prótons da desoxirribose cujos valores de deslocamento químico não puderam ser assinalados devido a sobreposição de sinais.

Com base na análise da média e desvio padrão das variações dos deslocamentos químicos sofridos pelos hidrogênios do DDD na presença da 9,10-fenentrenoquinona guanilhidrazona, foi possível determinar os sítios de interação mais significativos do DDD com o ligante. Para isso foram considerados valores de $\Delta\delta_{\text{DDD}}$ acima de 0.042 ppm, valor esse referente a duas vezes o desvio padrão calculado. Como resultado, os sítios de interação mais significativos do DDD na presença do ligante são representados pelos prótons: H5, H6 (pertencentes citosina na posição 1), H1' e H2' (pertencentes à desoxirribose da citosina na posição 1) e H1' (pertencente à desoxirribose da citosina na posição 3) do DDD. Para esses hidrogênios, por

ordem de citação, foram determinadas as variações dos deslocamentos químicos de 0,09 ppm, 0,06 ppm, 0,07 ppm, 0,05 ppm e 0,05 ppm.

Nas figuras (FIG. 5.13, FIG. 5.14, FIG. 5.15 e FIG. 5.16) são apresentadas as variações dos deslocamentos químicos mais significativos que os hidrogênios deste oligonucleotídeo sofreram na presença da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.

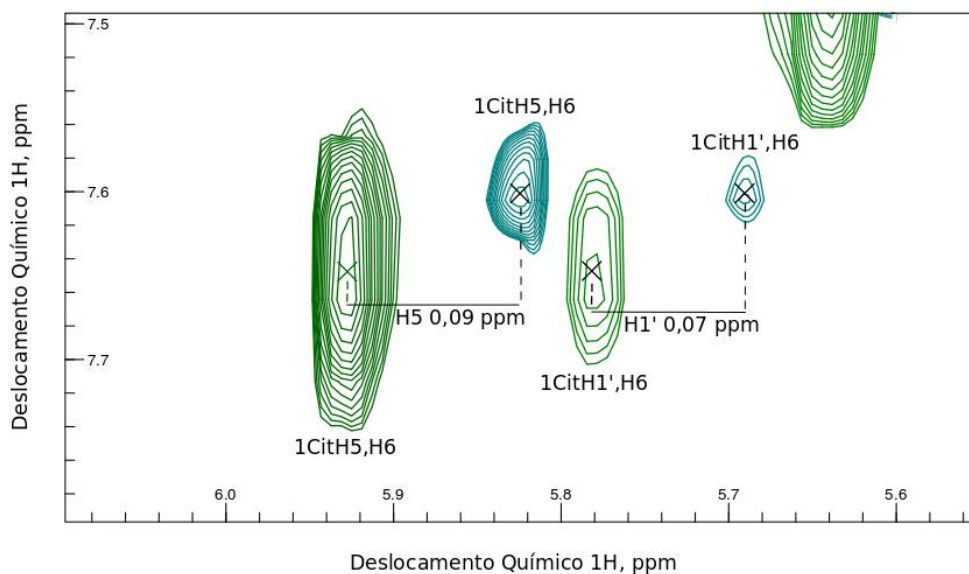


FIG. 5.13 – Sobreposição dos espectros de RMN de NOESY para o DDD na ausência e na presença do ligante (verde água e verde, respectivamente) em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério. Os espectros mostram as variações mais significativas para os deslocamentos químicos dos hidrogênios H5 e H1' da citosina em posição 1 (0,09 e 0,07 ppm respectivamente).

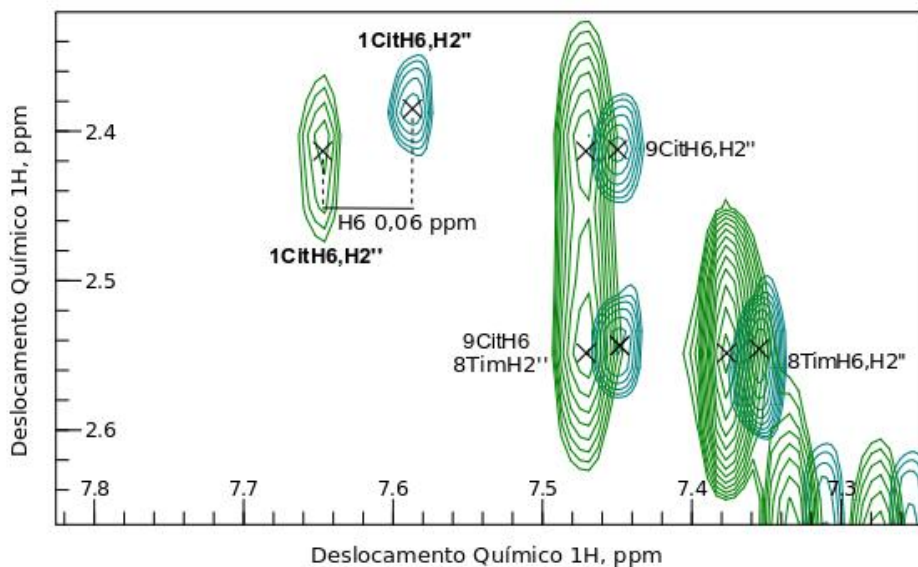


FIG. 5.14 – Sobreposição dos espectros de RMN de NOESY para o DDD na ausência e na presença do ligante (verde água e verde, respectivamente) em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério. Os espectros mostram a variação mais significativa do deslocamento químico para o hidrogênio H6 da citosina em posição 1 (negrito; 0,06 ppm).

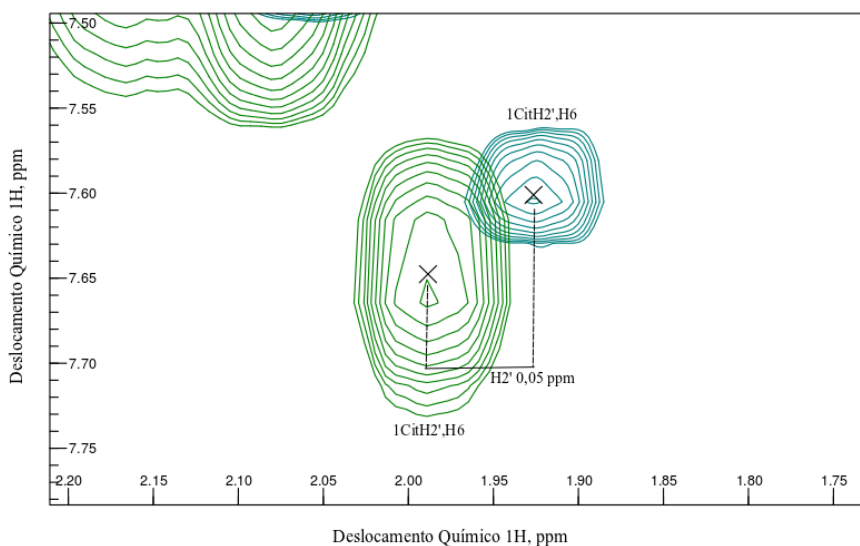


FIG. 5.15 – Sobreposição dos espectros de RMN de NOESY para o DDD na ausência e na presença do ligante (verde água e verde, respectivamente) em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério. Os espectros mostram a variação mais significativa do deslocamento químico para o hidrogênio H2' da citosina em posição 1 (0,05 ppm).

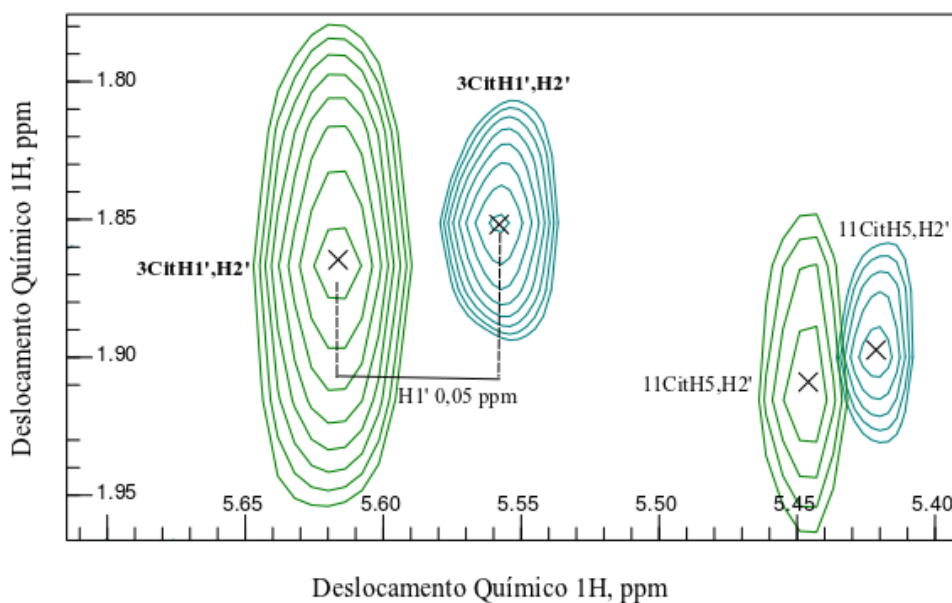


FIG. 5.16 – Sobreposição dos espectros de RMN de NOESY para o DDD na ausência e na presença do ligante (verde água e verde, respectivamente) em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério. Os espectros mostram a variação mais significativa do deslocamento químico para o hidrogênio H1' da citosina em posição 3 (negrito; 0,05 ppm).

Com base na análise da variação dos deslocamentos químicos mais significativos que os hidrogênios do DDD apresentaram foram consideradas as variações pertencentes a uma mesma região nucleotídica para a construção de um modelo hipotético de interação do complexo (DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona). Esta estratégia foi adotada para restringir o número de sítios de interação do DDD, a uma mesma região nucleotídica, de forma compatível ao número de sítios máximo possível para o composto orgânico. Dessa forma os prótons H5, H6 (pertencentes à citosina em posição 1) e H1', H2' (pertencentes à desoxirribose da citosina em posição 1) são, considerados, portanto, os sítios de interação mais significativos do DDD na presença do ligante para a construção de um modelo hipotético de interação do complexo.

Na TAB. 5.9 é apresentado o resumo das variações dos deslocamentos químicos mais significativos, por média e desvio padrão, que os hidrogênios deste oligonucleotídeo sofreram na presença da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona. Em negrito, os sítios de interação

mais significativos, restritos a uma mesma região nucleotídica, do DDD com o ligante para a construção de um modelo hipotético de interação do complexo.

TAB. 5.9 – Dados de RMN (NOESY, deslocamentos químicos) mais representativos para o DDD na ausência e na presença do ligante em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério: H = Prótons das bases nitrogenadas; H' = Prótons da pentose. Em negrito, sítios de interação mais significativos do DDD com o ligante para a construção de um modelo hipotético de interação do complexo (DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona).

Base Nitrogenada		δ_{DDD} (ppm)	$\delta_{\text{DDD+ligante}}$ (ppm)	$\Delta\delta_{\text{DDD}}$ (ppm)
1 CIT	H5	5,83	5,92	0,09
1 CIT	H1'	5,70	5,77	0,07
1 CIT	H6	7,59	7,65	0,06
1 CIT	H2'	1,93	1,98	0,05
3 CIT	H1'	5,57	5,62	0,05

Os resultados apresentados na TAB 5.9 são, portanto, os sítios de interação mais significativos do oligonucleotídeo na presença do ligante (FIG 5.17a). Em negrito, os sítios de interação mais significativos do DDD com o ligante que foram utilizados para a construção de um modelo hipotético de interação do complexo (FIG 5.17b).

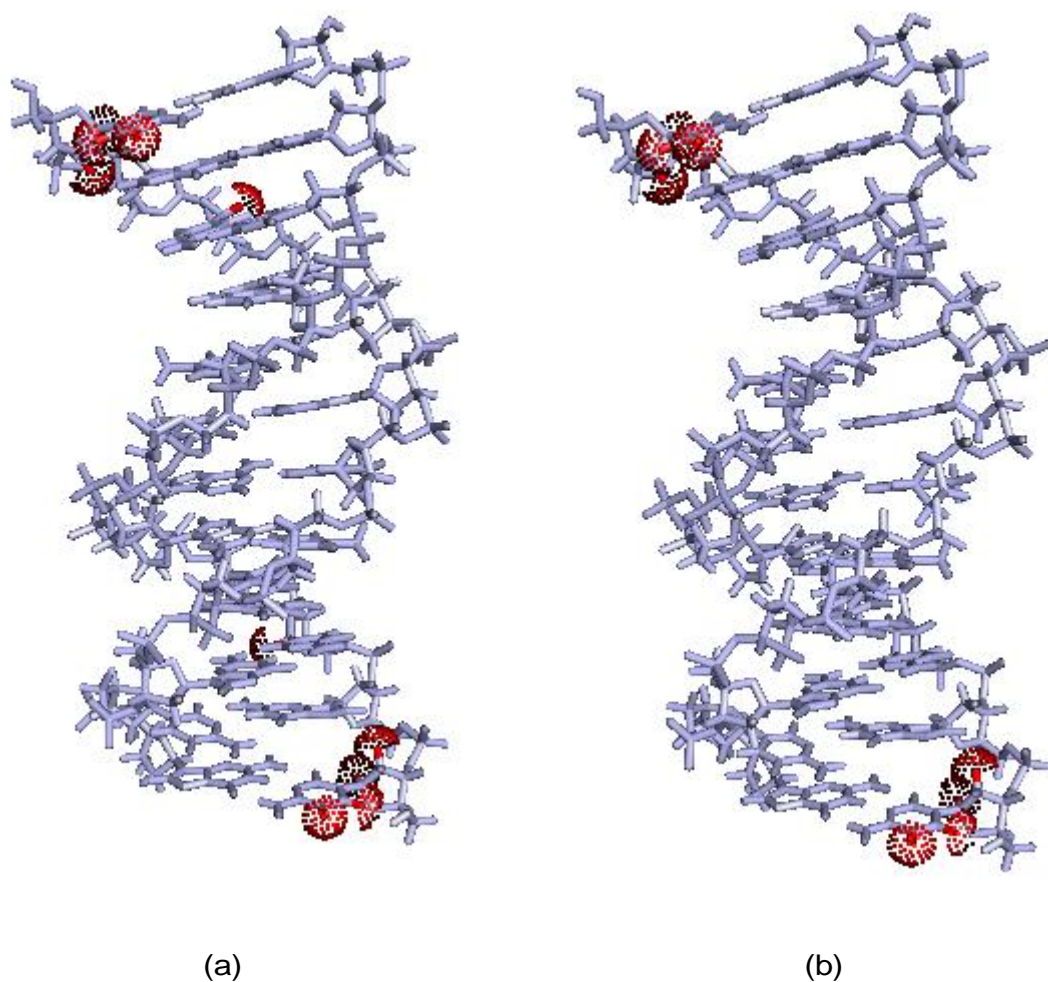


FIG. 5.17 – (a) Estrutura tridimensional do DDD elucidando os sítios de interação mais significativos do DDD (vermelho) na presença da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona; (b) Estrutura tridimensional do DDD ilustrando os sítios de interação mais significativos do DDD (vermelho) com o ligante para a construção de um modelo hipotético de interação do complexo (DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona) - usando PyMol.

5.7.2 ASSINALAMENTO POR RMN DA 9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA NO COMPLEXO

Com os experimentos bidimensionais NOESY e TOCSY do complexo DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona, foi iniciado o assinalamento do composto orgânico a partir dos novos valores de deslocamentos químicos de seus prótons. Para auxílio no assinalamento da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona no complexo, seu espectro NOESY adquirido foi sobreposto pelo seu espectro NOESY previamente assinalado na ausência do DDD.

Entretanto, os sinais dos prótons da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona desapareceram em ambos experimentos bidimensionais adquiridos do referido complexo, impossibilitando, assim, a análise experimental, por RMN, para elucidação dos possíveis sítios de interação do composto orgânico em presença do DDD. O desaparecimento dos sinais da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona é devido à constante de equilíbrio de associação e dissociação do ligante ser equivalente à frequência de ressonância do spin nuclear fora do complexo e no complexo com o DDD resultando, assim, em um regime de troca intermediária ou coalecente do sistema que torna o sinal tão largo a ponto de desaparecer do espectro (CAVANAGH *et al.* 2006).

Para realizar a hipótese de interação do complexo (DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona) é necessário tanto o conhecimento dos possíveis sítios de interação do DDD na presença do ligante, quanto o conhecimento dos possíveis sítios de interação da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona na presença do DDD.

Como não foi possível a análise experimental, por RMN, para elucidação dos possíveis sítios de interação deste composto orgânico em presença do DDD, foi traçada uma rota alternativa com intuito de obter estes sítios: uso dos resultados de tempos de relaxação nuclear (T_1 e T_2), mapeamento dos deslocamentos químicos e experimentos de *Saturation Transfer Difference* (STD) realizados, previamente pelo grupo de pesquisa, no estudo da interação deste composto orgânico na presença do DDD (SIMÕES, 2013).

Estes experimentos fornecem a informação sobre a variação que um determinado parâmetro do ligante pode sofrer na presença de uma macromolécula, permitindo, assim, a determinação dos possíveis sítios de interação do ligante. Em geral, a mudança no comportamento de um dado parâmetro está relacionada a possíveis interações moleculares.

Em síntese, os resultados apontaram para os hidrogênios 1, 2, 3, 8, 14 e 15 da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona como os ambientes químicos mais afetados na presença do DDD (SIMÕES, 2013). São, portanto, os sítios de interação mais representativos deste composto com o fragmento dímero de DDD (FIG 5.18).

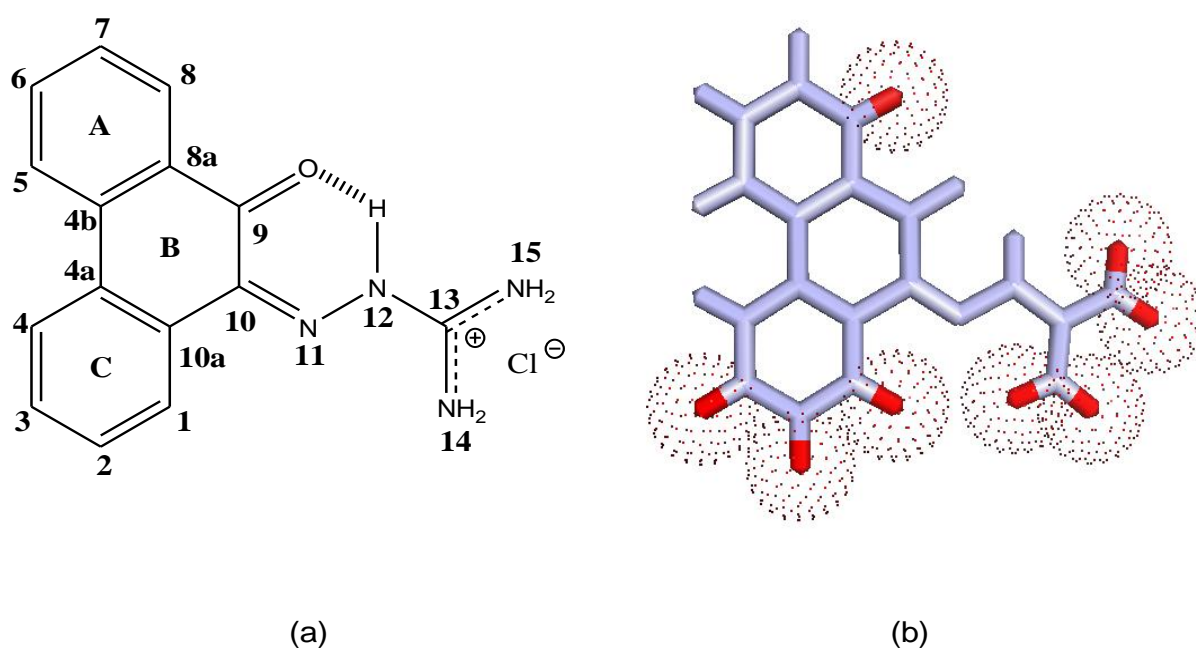


FIG. 5.18 – (a) Estrutura molecular numerada da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona; (b) Sítios de interação mais significativos por medidas de T1 e T2, variação de deslocamento químico e STD para a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (vermelho) na presença do DDD - usando PyMol.

Portanto, através do resultado experimental, por RMN, dos sítios de interação mais significativos do DDD na presença da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona juntamente com os resultados, prévios, dos experimentos T₁ e T₂, variação de deslocamento químico e STD para elucidação dos sítios de interação mais representativos deste mesmo composto orgânico na presença do DDD foi possível realizar a construção de um modelo hipotético de interação do complexo (DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona).

5.8 MODELO HIPOTÉTICO DA INTERAÇÃO DO COMPLEXO: DDD/9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA

Como não foi possível observar os sítios de interação exatos do DDD na presença do ligante – provavelmente devido à competição pelo ligante do grupo fosfato do tampão utilizado e dos grupos fosfato do oligonucleotídeo –, a construção do modelo hipotético de interação do complexo (DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona) foi realizada manualmente. Para tanto, estrategicamente considerou-se o posicionamento do ligante na região nucleotídica de maior número de sítios determinados. Considerou-se ainda a interação do grupo aminoguanidina do ligante com o grupo fosfato do esqueleto do DDD (grupos de maior força intermolecular).

Assim, os resultados obtidos em 5.7.1 e 5.7.2 foram utilizados na construção do modelo hipotético de interação do complexo (DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona) (FIG. 5.19)

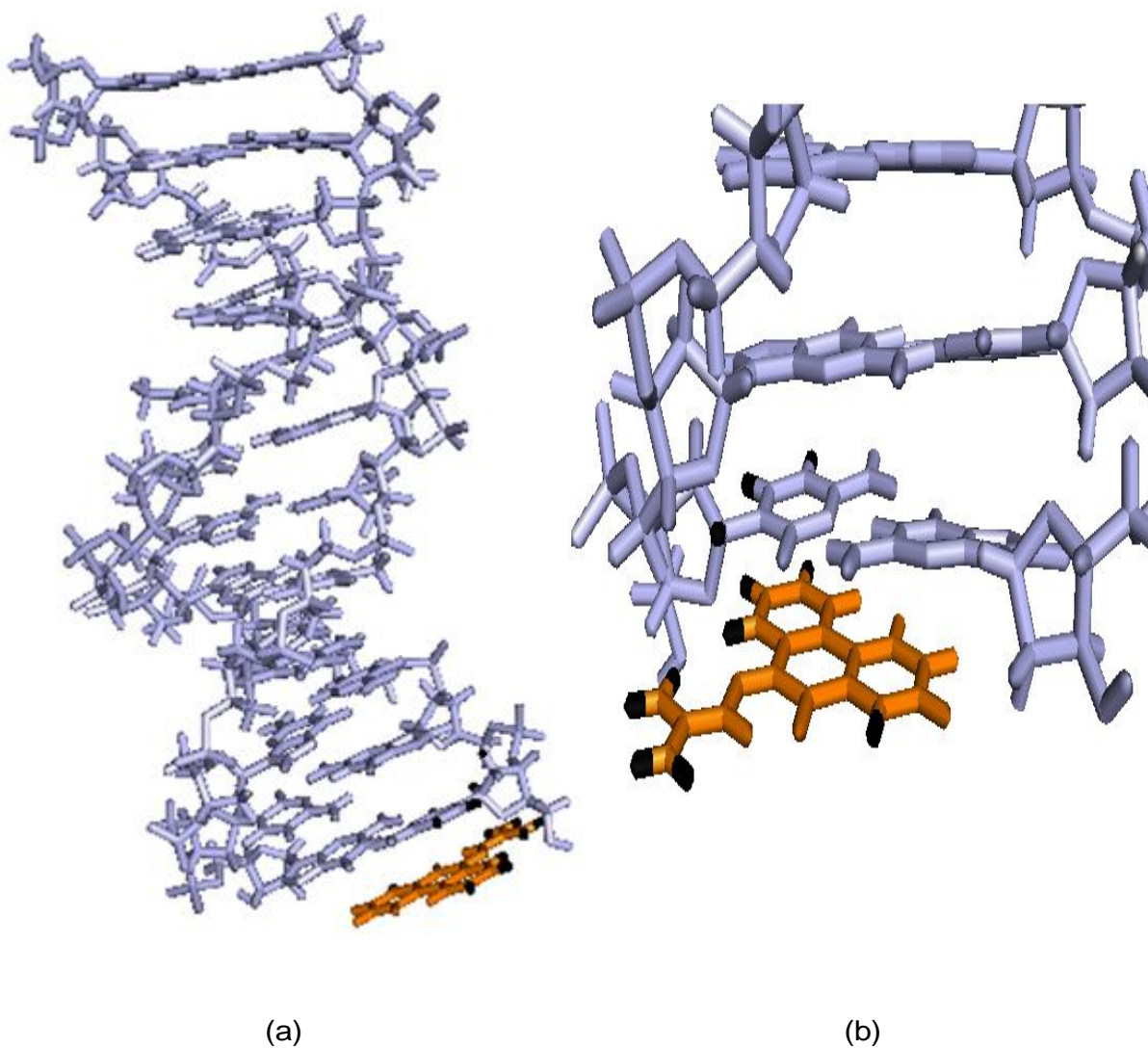


FIG. 5.19 – (a) Modelo hipotético de interação do complexo: DDD (azul)/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (laranja) - usando PyMol; (b) Ampliação da região de interação do DDD (azul) com 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona (laranja). Em preto, os sítios de interação mais significativos tanto do oligonucleotídeo quanto do ligante no complexo.

Para a construção do modelo hipotético de interação do complexo, a melhor posição de interação entre o DDD com a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona fundamentou-se, primeiramente, na aproximação dos grupos de maior força intermolecular (força iônica): grupos NH_2^+ (sítios 14 e 15) do ligante com o grupo fosfato (PO_4^-) do esqueleto do oligonucleotídeo.

Ao se estabelecer essa aproximação, o anel C do ligante é automaticamente direcionado abaixo da citosina 1, de maneira que seus sítios 2 e 3 fiquem, respectivamente, em posição paralela com os sítios H5 e H6 (1 Cit) do oligonucleotídeo. Por consequência, a concordância das interações entre os sítios é confirmada pela adequação de proximidade entre os sítios 1 do ligante com o H1' (1 Cit) do DDD. Dessa forma, é apresentada a hipótese de interação do complexo (DDD/9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona) caracterizada pela fraca interação do ligante com a extremidade 5' do fragmento de dupla fita do DNA

Por fim, o sítio 8 da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona é, por consequência, direcionado para próximo dos ambientes químicos H1 e H2 (12 Gua) do oligonucleotídeo, entretanto estes hidrogênios da guanina em posição 12 não puderam ser assinalados (devido à distância espacial superior a 5 Å de qualquer hidrogênio devidamente assinalado). Logo, apesar de toda lógica das interações entre os sítios do complexo não é possível afirmar, com toda certeza, que os ambientes químicos H1 e H2 (12 Gua) também pertencem aos sítios de interação mais significativos, obtidos por média e desvio padrão, do DDD, tendo correlação com o sítio 8 da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.

6. CONCLUSÕES

Em trabalho anterior do grupo de pesquisa do IME (SIMÕES, 2013) foi sugerida a intercalação com DNA como o principal mecanismo de radiosensibilização da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona. Neste trabalho foi medida por RMN a interação da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona com o DDD. O composto interagiu com baixa afinidade com o DDD na ponta 5' do oligonucleotídeo e não foi observada intercalação. Apesar dos resultados previamente obtidos pelo grupo de pesquisa do IME indicarem a quebra do DNA plasmidial, por uma dose de radiação reduzida, este efeito não pode ser restrito somente ao processo de intercalação, mas também devem ser considerados outros tipos de mecanismos de interação que convergem ao mesmo resultado. Assim, sugere-se a interação com DDD como principal mecanismo de radiosensibilização.

A baixa afinidade e a não-intercalação podem ser atribuídas a dois fatores: (i) forte competição de interação do grupo aminoguanidina pelo grupo fosfato do tampão e do DDD, comprovado experimentalmente pelo reaparecimento dos sinais dos hidrogênios 14 e 15 do ligante quando na presença de tampão fosfato. Como o tampão possui maior concentração que o oligonucleotídeo, o composto preferencialmente interage com o grupo fosfato do tampão, reduzindo, assim, sua interação com o DDD; (ii) a possibilidade do empilhamento π - π da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em tampão fosfato de sódio atribuída à diferença de deslocamento químico observado para as ressonâncias dos hidrogênios aromáticos. A formação de agregados do ligante por empilhamento π - π são desfavoráveis à intercalação, pois seu maior volume dificulta sua inserção, como uma lâmina, entre um par de bases nitrogenadas adjacentes do DNA. Caso comprovado experimentalmente, esse empilhamento poderia explicar a não intercalação.

O mapeamento do sítio de interação e formulação de uma hipótese de interação foi possível pela análise da perturbação do deslocamento químico da DDD quando na presença do ligante.

O DDD foi assinalado na ausência e na presença da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona através dos espectros NOESY e TOCSY. Isso permitiu a determinação dos sítios de interação pela análise das mudanças de deslocamentos químicos, mais significativas (obtidas por média e desvio padrão), que os hidrogênios do oligonucleotídeo apresentaram na

presença do ligante: 0,09 ppm (1 CIT- H5), 0,07 ppm (1 CIT- H1') e 0,06 ppm (1 CIT- H6), 0,05ppm (1 CIT- H2') e 0,05ppm (3 CIT- H1').

Os resultados mais significativos da variação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios do DDD, restritos a uma mesma região nucleotídica [(1 CIT- H5), 0,07 ppm (1 CIT- H1') e 0,06 ppm (1 CIT- H6) e 0,05ppm], na presença da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona juntamente com os resultados prévios de interações por RMN que esse composto orgânico apresentou na presença deste mesmo oligonucleotídeo obtiveram concordância entre seus sítios de ligação estudados. Tal concordância permitiu a realização da hipótese de interação do complexo para uma possível região de interação entre o DDD e a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona.

Este trabalho aprimora de maneira específica os estudos realizados por Simões (SIMÕES, 2013) e permite colocar uma perspectiva experimental aos resultados obtidos por *docking* e Dinâmica Molecular (DM) desenvolvidos pela autora. Dois pontos são importantes de serem ressaltados: (i) nos estudos por “*docking*”, a intercalação ocorreu por espaçamento forçado entre os pares de bases adjacentes do DDD. Para a intercalação ocorrer, espontaneamente, primeiramente, seria necessária a atração eletrostática entre a carga positiva do grupo aminoguanidina e a carga negativa do grupo fosfato do esqueleto do DDD (conforme ilustrado na Figura 2.9 a) e posteriormente a quebra desta interação eletrostática para alocação completa do sistema aromático entre par de bases adjacentes do DNA (conforme ilustrado na Figura 2.9 b e c). Experimentalmente, a intercalação não ocorreu provavelmente pela interação preferencial (de maior força) do grupo aminoguanidina com o grupo fosfato do esqueleto do DNA, favorecendo a uma interação em superfície do ligante com DNA. Analisando os compostos intercalantes (Figura 2.6), observamos a presença de cargas positivas, importantes, para atração eletrostática com a carga negativa do grupo fosfato do esqueleto do DNA. Todavia esses grupamentos carregados positivamente possuem menor afinidade ao grupo fosfato que o do ligante estudado neste trabalho, sugerindo, assim, interações mais lábeis com o grupo fosfato como uma condição ao processo de intercalação. (ii) nossos estudos não mostraram intercalação nas condições estudadas, mas não exclui por completo a possibilidade de intercalação em outras condições experimentais. A intercalação pode ocorrer na presença de outros segmentos de DNA ou ainda ocorrer com excesso de ligante ou em temperaturas maiores, entretanto seriam necessários mais estudos para testar estas possibilidades.

7. PERSPECTIVAS E SUGESTÕES

1 – Realização do experimento de interação do DDD com 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em outro tampão (Tris-HCl, por exemplo) para não ocorrer competição do ligante pelo grupo fosfato do tampão e pelo grupo fosfato do DDD.

2 – Desenvolvimento de futuros compostos análogos da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona que apresentem no lugar do grupo aminoguanidina outro grupo positivo, que apresente interações mais lábeis com grupos fosfatos, como grande parte dos agentes intercalantes apresentados neste trabalho.

3 – Estudo da interação da 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona com outros fragmentos maiores de DNA para investigar a possibilidade de intercalação desse composto com o DNA, uma vez que o composto reduz em cerca de 50% a dose de radiação quando utilizado no teste com o DNA plasmidial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. Del C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. L. **Câncer e Agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e não específicos que interagem como o DNA: Uma introdução.** *Química Nova*. Belo Horizonte. v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ANDERSSON, J. **Structural Requirements for Selective DNA Binding: Studies on Mono and Binuclear Ruthenium Complexes.** Tese (PhD). 2012. 58 p. Universidade de Tecnologia de Chalmers, Departamento de Engenharia Química e Biológica, Gothenburg, 2012.

ALVES, J. **Aplicação de técnicas de RMN em solução ao estudo de sistemas químicos biológicos.** 2010. 73 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Lisboa, 2010.

BEDREGAL, B.C. **λ -ALN: autômatos lineares não-determinísticos com λ -transições.** *Trends in Applied and Computational Mathematics*. São Carlos, v. 12, p. 171-182, 2011.

BRAUNSCHWEILER, L.; ERNST R.R. **Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy.** *Journal of Magnetic Resonance*. Suíça v.53, p. 521-528, 1983.

BLACKBURN, M.; GAIT, M.; LOAKES, D.; WILLIAMS, D. M.; **Nucleic Acids in Chemistry and Biology.** 3^{ed}. Cambridge: RSPublishing, 2006.

BONNER, J. A.; LAWRENCE, T. S.. **Doxorubicin Decreases the Repair of Radiation-induced DNA Damage.** *International Journal of Radiation Biology*. v. 57, p. 55-64, 1990.

CELDA, B.; MONTELIONE G.T. **Total Correlation Spectroscopy (TOCSY) of Proteins Using Coaddition of Spectra Recorded with Several Mixing Times.** *Journal of Magnetic Resonance Series B*. v. 101, p. 189-193, 1993.

CAVANAGH, J.; FAIRBROTHER, W. J.; PALMER, III, A. G.; RANCE, M.; SKELTON, N. J. **Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice.** 2^aed. EUA: Academic Press, 2006.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1ªed. Campinas: UNICAMP, 2006.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E.; **The Cell: A Molecular Approach**. 7ªed. Oxford: Oxford University Press, 2015.

CROTHERS, D. M. **Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers**. *Biopolymers*. v. 6, p. 575-584, 1968.

DARUWALLA, J.; GREISH, K.; WILSON, C. M.; MURALIDHARAN, V.; IYER, A.; MAEDA, H.; CHRISTOPHI. **Styrene Maleic Acid-Pirarubicin Disrupts Tumor Microcirculation and Enhances the Permeability of Colorectal Liver Metastases**. *Journal of Vascular Research*. v. 46, p. 218-228, 2009.

DAI, J.; PUNCHIHEWA, C.; MISTRY, P.; OOI, A. T.; YANG, D. **Novel DNA Bis-intercalation by MLN944, a Potent Clinical Bisphenazine Anticancer Drug**. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 279, p. 46096-46103, 2014.

DE LANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. DeLano Scientific, San Carlos, California, EUA, 2002.

DENNY, W. A.; ROBERTS, P. B.; ANDERSON, R. F.; BROWN, J. M.; PHIL, D.; WILSON, W. R. **NLA-1. : A 2-Nitroimidazole Radiosensitizer Targeted to DNA by Intercalation**. *International Journal of Radiation Oncology *Biology *Physics*. v.22, p. 553-556, 1992.

DE ROSE, E. F.; PERERA, L.; MURRAY, M. S.; KUNKEL, T. A.; LONDON, R. A.; **Solution Structure of the Dickerson DNA Dodecamer Containing a Single Ribonucleotide**. *Biochemistry*. v. 51 , p. 2407-24016, 2012.

DREW, H. R.; TAKANO, T.; BROKA, C.; TANAKA, S.; ITAKURA, K.; DICKERSON, R. E. **Structure of a B-DNA dodecamer: Conformation and dynamics**. *Proceedings of National Academy of Sciences*. EUA, v. 78, n. 4, p. 2179-2183, 1981.

GIRDHANI, S.; BHOSLE, S. M.; THULSIDAS, S. A.; KUMAR, A.; MISHRA, K. P. **Potential of radiosensitizing agents in cancer chemo-radiotherapy**. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. Munbai, v. 1, n. 14, p. 129-131, 2016.

- GOFTAR, M. K.; KOR, N. M.; KOR, Z. M. **DNA intercalators and using them as anticancer drugs.** *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research.* v. 2 p. 811-822, 2014.
- GORDON, I. K.; GRAVES, C.; KIL, W. J.; KRAMP, T.; TOFILON, P.; CAMPHAUSEN, K. **Radiosensitization by the Novel DNA Intercalating Agent Vosaroxin.** *Radiation Oncology.* 2012.
- GRAVES, D. E.; VELEA, L. M. **Intercalating binding of small molecules to nucleic acids.** *Current Organic Chemistry.* v. 4, p. 915–929, 2000.
- HARASAKI, Y.; WAZIRI, A. **Potential Usefulness of Radiosensitizers in Glioblastoma.** *Neurosurgery Clinics of North America.* Colorado, v. 23, n. 1, p. 429–437, 2005.
- HILLER, S.; IBRAGHIMOV, I.; WAGNER, G.; OREKHOV, V. Y. **Coupled decomposition of four-dimensional NOESY spectra.** *Journal of the American Chemical Society.* v. 131, p. 12970–12978, 2009.
- HOLLAND, J. F.; FREI, E.; KUFEL, D. W.; POLLOCK, R. E.; WEICHELBAUM, R. R.; BAST JUNIOR, R. C.; GANSLER, T. S. **Holland-Frei Cancer Medicine-6.** 6^a ed. USA: BC DECKER, 2003.
- HOLLINGSHEAD, L. H.; FAULDS, D. **A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in the Chemotherapy of Cancer.** v.42, p.690-719 , 1991.
- HONG, L.; SCHOTH, G. P.; MATTHEWS, H. R.; YAU, P.; BRADBURY, E. M. **Studies of DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 “tail” to DNA.** *The Journal of Biological Chemistry.* v.268. p. 206-314, 1993.
- HWANG, T. L.; SHAKA, A. J. **Water suppression that works—excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients.** *Journal of Magnetic Resonance.* v.112, p. 275–279, 1995.
- IUPAC–IBU. **Abbreviations and symbols for the description of the conformation of polynucleotide chains. Tentative rules (1969).** IUPAC–IBU Commission on Biochemical Nomenclature. *Biochemistry.* n. 9, p. 3471–3479, 1970.

- IUPAC–IBU. **Abbreviations and symbols for de description of the conformation af polynucleotide chains. Recommendation (1982).** IUPAC–IBU Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). *European Journal of Biochemistry*. n. 131, p. 9–15, 1983.
- JIA, Y. A.; WENG, Z.; WENG, C.; ZHU, M; LU, Y.; DING, L.; WANG, Y, CHENG, X.; LIN, Q.; WU, K. **Increased Chemosensitivity and Radiosensitivity of Human Breast Cancer Cell Lines Treated with Novel Functionalized Single-walled Carbon Nanotubes.** *Oncology Letters*. v. 13, p. 206–2014, 2017.
- JOHNSON, C. A.; HUDSON, G. A.; HARDEBACK, L. K. E.; JOLLEY, E. A.; YI REN; LEWIS, M.; ZONOSKO, B. M. **Effect of intercalator substituent and nucleotide sequence on the stability of DNA–and RNA–naphthalimide complexes.** *Bioinorganic & Medicinal Chemistry*. v. 23, p. 3586–3591, julho 2015.
- JOINER, M. C.; LAMBIN, P.; MARPLES, B. **Adaptive response and induced resistance.** *CR Acad Sci III*. p. 167–175, 1999.
- JUSTINA, L. A. D.; SOARES, M. A. M.; FERLA, M. R.; SANTOS, N. A.; **Proposição de modelo pedagógico de molécula de DNA.** *Arquivos do Mudi*. v. 12, p. 69-72, 2008.
- KATZ, D.; ILTO, E.; LIU, F. F. **On the Path to Seeking Novel Radiosensitizers.** *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. Toronto, v. 4, p. 988–996, 2009.
- KECK, M. B.; MANDERVILLE, R. A.; HECHT, S. M.; **Chemical and Structural Characterization of the interaction of Bleomycin A₂ with d(CGCGAATTCGCG)₂. Efficient, Double-Strand DNA Cleavage Accessible Without Structural Reorganization.** *Journal of the American Chemical Society*. v. 123, p. 8690–8700, 2001.
- KELLY, C. B.; HILL, H.; BARTOLLOTTI L.; VARADARAJAN, S. **Molecular dynamics of d(CGCGAATTCGCG)₂ complexed with netropsin and its minor groove methylating analog, Me-lex, using explicit and implicit water models.** *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. v. 894, p. 50-58, 2009.
- KLEVIT, R. E.; WEMMER, D. E.; REID, B. R.; **Proton NMR studies on the interaction between distamycin A and a symmetrical DNA dodecamer.** *Biochemistry*. v. 25, p 3296-3303, 1986.

- LAWRENCE, T. S.; BLACKSTOCK, A. W.; MCGINN, C. **The Mechanism of Action of Radiosensitization of Conventional Chemotherapeutic Agents.** *Seminars in Radiation Oncology.* v.13, p. 13-21, 2003.
- LERMAN, L. S. **Structural consideration on the interaction of DNA and acridines.** *Journal of Molecular Biology.* v.3, p. 18–30, 1961.
- LEVIN, C. H.; ALBERT, M. G.; ROUSCILLES, A.; FERRADINI, C. HICKEL, B. **Intramolecular Semiquinone Disproportionation in DNA. Pulse Radiolysis Study of the One-Electron Reduction of Daunorubicin Intercalated in DNA.** *Biochemistry.* v.30, p. 8216–8222, 1991.
- LIMA, L. C. A. **Respostas a danos no dna envolvidas na Recuperação do bloqueio da replicação e Transcrição em células humanas.** 2014. 150 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, 2014
- LIN, C.; MATHAD, R. I.; ZHANG, Z.; SIDELL, N.; YANG, D. **Solution structure of a 2:1 complex of anticancer drug XR5944 with TFF1 estrogen response element: insights into DNA recognition by a bis-intercalator.** *Nucleic Acids Research.* v. 42, p. 6012–6024, 2014.
- LODISH, H.; BERK A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology.** 4^a ed. New York: W. H. Freeman, 2000.
- LUÍS, D. V. A. **Caracterização do efeito anti-tumoral de complexos organometálicos contendo 1,10-fenantrolina-5,6-diona.** 2011. 81 p. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina) – Universidade Nova de Lisboa, 2011.
- MARCÓ, N.; SOUZA, A.A.; NOLIS, P.; GIL, R.R.; PARELLA, T. **Perfect ¹J_{CH}-resolved HSQC: Efficient measurement of one-bond proton-carbon coupling constants along the indirect dimension.** *Journal of Magnetic Resonance.* v. 276, 37-42, 2017.
- MCKEE, T.; MCKEE, J. R. **Biochemistry: The Molecular Basis of Life.** 3^a ed. The McGraw Hill Companies, 2004
- MCMURRY, J. **Química Orgânica.** 8^a ed. Belmont: Brooks/Cole, Cengage learning, 2012.

- NAGAYAMA, K.; KUMAR, A.; WÜTHRICH, K.; ERNEST, R. R. **Experimental techniques of two-dimensional correlated spectroscopy.** *Journal of Magnetic Resonance.* v. 40, p.3321-334, 1980.
- NEGRÓN, A. C. V.; NAJJAR, R.; ROGERO, S. O.; OLIVEIRA, E. **Complexos de ródio (II) como radiosensibilizadores de tumores.** In: 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2002, Poços de Caldas.
- NIELSEN, C. B.; PERTERSEN, M.; PETERSEN, E. B.; HANSEN, P. E.; CHRISTENSEN, U. B.; **NMR Structure Determination of a Modified DNA Oligonucleotide Containing a New Intercalating Nucleic Acid.** *Bioconjugate Chemistry.* v. 15, p. 260–269, 2014.
- NYGAARD, K.; HAGEN, S.; HANSEN, H. S.; HATLEVOLL, R.; HULTBORN, R.; JAKONSEN, A.; MÄNTYLÄ, M.; MODIG, H.; MUNCK-WIKLAND, E.; ROSENGREN, B.; TAUSJØ, J.; ELGEN, K. **Pre-operative radiotherapy prolongs survival in operable esophageal carcinoma: A randomized, multicenter study of pre-operative radiotherapy and chemotherapy. The second scandinavian trial in esophageal cancer.** *World Journal of Surgery.* v. 16, p. 1104–1109, 1992.
- PANICUCCI, R.; HEAL, R.; LADEROUTE, R.; COWAN, D.; MCCLELLAND, R. A.; RAUTH, A. T. **NLP-1. : A DNA Intercalating Hypoxic Cell Radiosensitizer and Cytotoxin 2-Nitroimidazole Radiosensitizer Targeted to DNA by Intercalation.** *International Journal of Radiation Oncology *Biology *Physics.* v.16, p. 1039-1043, 1989.
- PAVIA, D. P.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia.** 4ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.
- PILAT, M. J.; LORUSSO, P. M. **Vascular disrupting agents.** *Journal of Cellular Biochemistry.* v. 99, n. 4, p. 1021–1039, novembro 2006.
- PRADHAN, P.; TIRUMALA, S.; LIU, X.; SAYER, J. M.; JERINA, D. M.; YEH, H. J. **Solution Structure of a Trans-Opened (10S)-dA Adduct of (+)-(7S,8R,9S,10R)-7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in a Fully Complementary DNA Duplex: Evidence for a Major Syn Conformation.** *Biochemistry.* v.40, p. 5870-5881, 2011
- RALPH, A. C. L.; CALCAGNO, D. Q.; SOUZA, L. G. S.; LEMOS, T. L. G.; MONTENEGRO, R. C.; SMITH, M. A. C.; VASCONCELLOS, M. C. **Bioflorin induces cytotoxicity by DNA interaction in genetically different human melanoma cell lines.** *Toxicology in Vitro.* v. 34, p. 237–245, 2016.

- RANCE, M. **Improved techniques for homonuclear rotanting-frame and isotropic mixing experiments.** *Journal of Magnetic Resonance*. California, v. 74, p, 557-564, 1987
- RAVIRAJ, J.; BOKKASAM, V. K.; KUMAR, V. S.; REDDY, U. S. SUMAN, V. **Radiosensitizers, radioprotectors, and radiation mitigators.** *Indian Journal of Dental Research*. v. 25, p. 83-90, 2014.
- RESCIFINA, A.; CHIACCHIO, U.; V.; CORSARO, A.; PIPERNO, A.; ROMEO, R. **Isoxazolidinyl polycyclic aromatic hydrocarbons as DNA-intercalating antitumor agents.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. v.46, p. 129–136, 2011.
- RESCIFINA, A.; VARRICA, M.; J.; CARNOVALE, C.; ROMEO, G.; CHIACCHIO, U. **Novel isoxazole polycyclic aromatic hydrocarbons as DNA-intercalating agents.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 51, p. 163–173, 2012.
- RESCIFINA, A.; ZAGNI, C.; VARRICA, M. G.; PISTARÀ, V.; CORSARO, A. **Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity and modeling.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. Catania, v. 74, p. 95–115, 2014.
- RODWELL, V. W.; BENDER, D. D.; BOTAN, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, P. A. **Bioquímica Ilustrada de Harper.** 30ªed. Porto Alegre: AMGH, 2017
- ROOTS, R.; SMITH, K. C. **Effects of Actinomycin D on Cell Cycle Kinetics and the DNA of Chinese Hamster and Mouse Mammary Tumor Cells Cultivated *in Vitro*.** v. 36, p. 3654-3658, 1976.
- RUIZ-CHICA, J.; MEDINA, M. A.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.; RAMÍREZ, F. J. **Fourier Transform Raman Study of the Structural Specificities on the Interaction between DNA and Biogenic Polyamines.** *Biophysycal Journal*. Málaga, v. 80, p. 443-454, 2001
- SANGEETHA G. K. R., S.; MATHEW, B. B.; SUDHAMANI, C.; NAIK, H. B. **Mechanism of DNA Binding and Cleavage.** *Biomedicine and Biotechnology*. v. 2, p. 1–9, 2014.
- SAZGARNIA A.; MONTAZERABADI, A. R.; TOOSI, M. H. B.; AHMADI, A. **Photosensitizing and radiosensitizing effects of mitoxantrone: combined chemo-, photo-, and radiotherapy of DFW human melanoma cells.** *Lasers in Medical Science*. v. 13, p. 1533–1539, 2013.

SCOTTINI, A. **In: MINIDICIONÁRIO Escolar da Língua Portuguesa.** Blumenau: Todo Livro, 1998. p. 464.

SHAO, Y.; MOLNAR, L. F.; JUNG, Y.; KUSSMANN, J.; OCHSENFELD, C.; BROWN, S. T.; GILBERT, A. T. B.; SLIPCHENKO, L. V.; LEVCHENKO, S. V.; O'NEILL, D. P.; DISTASIO, J. R. A.; LOCHAN, R. C.; WANG, T.; BERAN, G. J. O.; BESLEY, N. A.; HERBERT, J. M.; LIN, C. Y.; VAN VOORHIS, T.; CHIEN, S. H.; SODT, A.; STEELE, R. P.; RASSOLOV, V. A.; MASLEN, P. E.; KORAMBATH, P. P.; ADAMSON, R. D.; AUSTIN, B.; BAKER, J.; BYRD, E. F. C.; DACHSEL, H.; DOERKSEN, R. J.; DREUW, A.; DUNIETZ, B. D.; DUTOI, A. D.; FURLANI, T. R.; GWALTNEY, S. R.; HEYDEN, A.; HIRATA, S.; HSU, C. P.; KEDZIORA, G.; KHALLIULIN, R. Z.; KLUNZINGER, P.; LEE, A. M.; LEE, M. S.; LIANG, W. Z.; LOTAN, I.; NAIR, N.; PETERS, B.; PROYNOV, E. I.; PIENIAZEK, P. A.; RHEE, Y. M.; RITCHIE, J.; ROSTA, E.; SHERRILL, C. D.; SIMMONETT, A. C.; SUBOTNIK, J. E.; WOODCOCK ZHANG, III, H. L. W.; BELL, A. T.; CHAKRABORTY, A. K. D. M.; CHIPMANKEIL, F. J.; WARSHEL, A.; HEHRE, W. J.; SCHAEFER, H. F.; KONG, J.; KRYLOV, A. I.; GILL, P. M. W.; EAD-GORDON, M. **Advances in methods and algorithms in a modern quantum chemistry program package.** *Physical Chemistry Chemical Physics.* v. 8, p. 3172–3191, 2016.

SHENOY, M. A.; SINGH, B. B.; **Chemical Radiosensitizer in Cancer Therapy.** *Cancer Investigation.* v. 10, p. 533-551, 2015.

SHIRLEY, L.. **Radiosensitizer and Radiochemotherapy in the Tratament of Cancer.** 1^a ed. Canadá: CRC Press, 2015.

SILVA, R. C. **Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo em estudos de petróleo.** 2009. 87 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

SIMÕES, C. **Estudo da interação de intercalantes radiosensibilizadores em DNA através da técnica RMN.** 2013. 178 p. Dissertação (Mestrado em Ressonância Magnética Nuclear) – Instituto Militar de Engenharia, 2013.

SIMÕES, C.; NASCIMENTO, C. J.; VILLAR, J. D. F. **NMR study of 9,10-phenanthrenequinone guanylhydrazone as DNA intercalator: New Potencial Anticancer Agent.** Artigo submetido em junho/2016.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 7^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

Sítio do Biological Magnetic Resonance Data Bank. Disponível em: <http://www.bmrb.wisc.edu/referenc/nomenclature/>. Acessado em: 8 de agosto de 2015.

Sítio do Instituto Nacional de Câncer: Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>. Acessado em: 11 de abril de 2017.

Sítio do Instituto Nacional de Câncer: Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. Acessado em: 25 de abril de 2017.

Sítio do Instituto Nacional de Câncer: Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101. Acessado em: 2 de maio de 2017.

Sítio do Protein Data Bank. Disponível em: <http://necat.chem.cornell.edu/Structures2/4PWM.html>. Acessado em: 1 de setembro de 2015.

Sítio do Protein Data Bank. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1JDG&bionumber=1>. Acessado em: 30 de abril de 2017.

Sítio do Protein Data Bank. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1BNA&bionumber=1>. Acessado em: 8 de abril de 2017.

Sítio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Disponível em: <http://www.ufrgs.br/biofisica/Bio10003/Metfoto.pdf>. Acessado em: 13 de março de 2016.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

STEVENS, M. C. G.; CARON, H. N. BIOND, A. **Cancer in Children. Clinical Management**. 6ª ed. Oxford: Oxford University Press, 2012.

VILLAR, J. D. F. **Fundamentos e aplicações da Ressonância Magnética Nuclear**. 3ª ed. Rio de Janeiro: AUREMN, 2009

- VILLAR, J. D. F.; TINOCO, L. W. **Spin-Lattice Relaxation in Drug Discovery and Design.** *Current Topics on Medical Chemistry.* n.9, p.811–823, 2009.
- ZHANG, H.; GAO, Y. G.; VAN DER MAREL, G. A.; VAN BOOM, J. Y.; WANG, A. W. **Simultaneous Incorporation of two Anticancer drugs into DNA. The structures of formaldehyde-cross-linked adducts of daunorubicin-d(CG(araC)GCG) and doxorubicin-d (CA(araC)GTC) complexes at high resolution.** *The Journal of Biological Chemistry.* EUA, v. 268, n. 14, p. 10095–10101,1993.
- YANG, J.; SILKS, L.; WU, R.; UNKEFER, C.; KENNEDY, M. A. **Improvements for Measuring¹H–¹H Coupling Constants in DNA via New Stripe-COSY and Superstripe-COSY Pulse Sequences Combined with a Novel Strategy of Selective Deuteration.** *Journal Magnetic Resonance.* v. 129, p. 212-218, 1997.
- YOUNG, M. A.; JAYARAM, B.; BEVERIDGE, D. L. **Intrusion of Counterions into the Spine of Hydration in the Minor Groove of B-DNA: Fractional Occupancy of Electronegative Pockets.** *Journal of the American Chemical Society.* v. 119, p. 59–69, 1997.
- WANG, E.; KOSHLAP, K. M.; GILLESPIE, P.; DERVAN, P. B.; FEIGON, J. **Solution Structure of a Pyrimidine·Purine·Pyrimidine Triplex Containing the Sequence-specific Intercalating Non-natural Base D3.** *Journal of Molecular Biology.* v. 257, p. 1052-1069, 1996.
- WARDMAN, P. **Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy.** *Clinical Oncology.* v. 19, p. 397 -417, 2007.
- WATSON, J. D. **A dupla hélice.** 2^a ed. Rio de Janeiro: Gradiva, 1994. p. 280. il. ISBN: 9789726620341
- WESTHEIMER, F. H.; **Why nature chose phosphates.** *Science.* v.235, p. 1173-1178, 1987.
- WILLIAMS, D. M. **Nucleic acids in Chemistry and Biology.** 3^a ed. RSC Publishing, 2006.
- WING, R. M; Pjura, P.; Drew, H. R.; Dickerson, R. E.; **The primary mode of binding of cisplatin to a B-DNA dodecamer: C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G.** *The EMBO Journal.* v. 3, p. 1201-1206, 1984.

WU, Y. **In Vitro Studies of a New Radiosensitizer for Radiotherapy of Breast C.** 2015.
74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Físicas) – University of Waterloo, 2015.

WÜTHRICH, K. **NMR of Proteins and Nucleic Acids.** 1^a ed. United States of America:
John Wiley Sons, Inc, 1986.

9. APÊNDICES

APÊNDICE 9.1

ESPECTROS DE RMN DA 9,10-FENANTRENOQUINONA GUANILHIDRAZONA

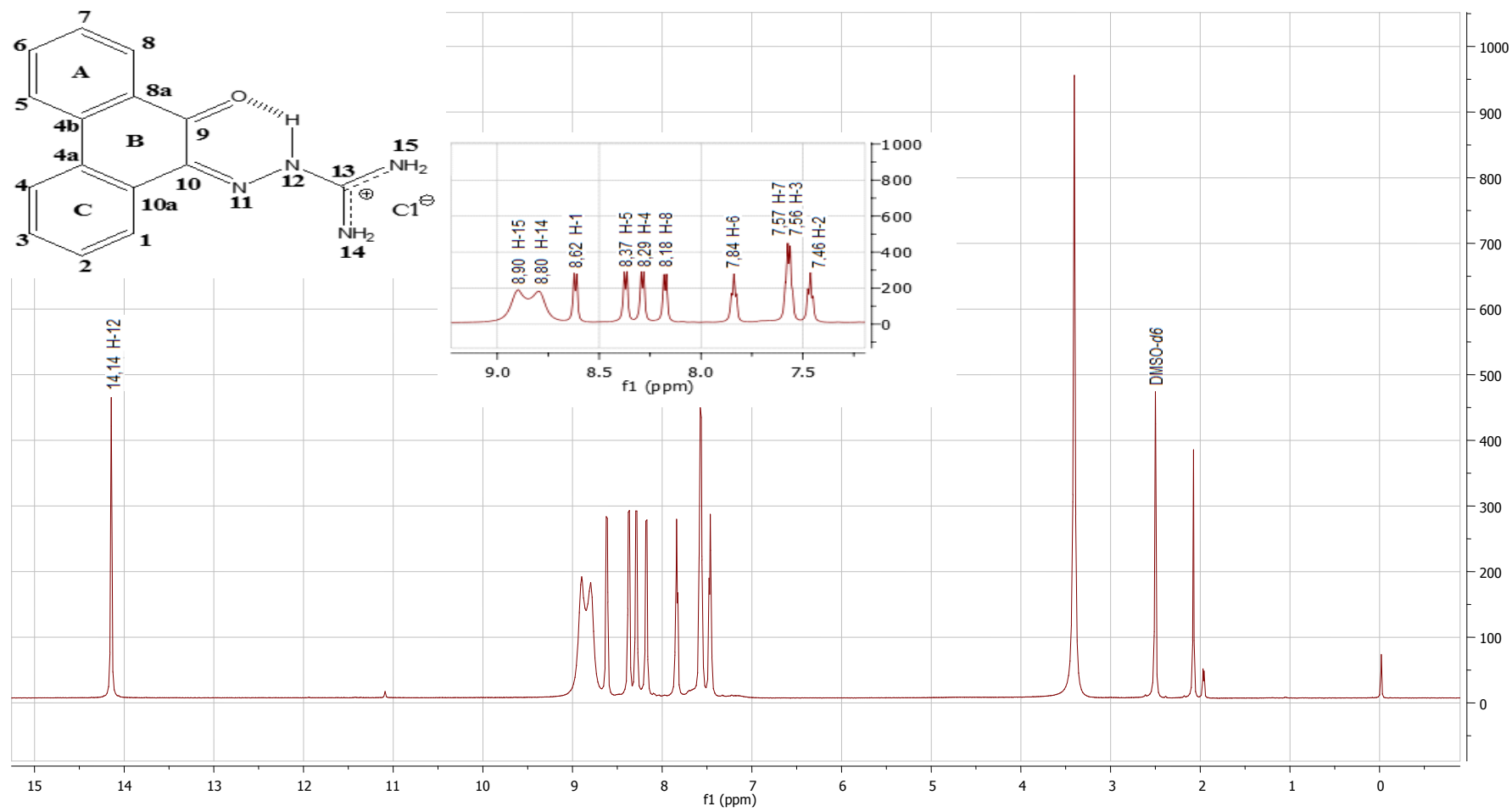


FIG. 9.1 - Espectro de RMN de ¹H para a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em DMSO-*d*₆.

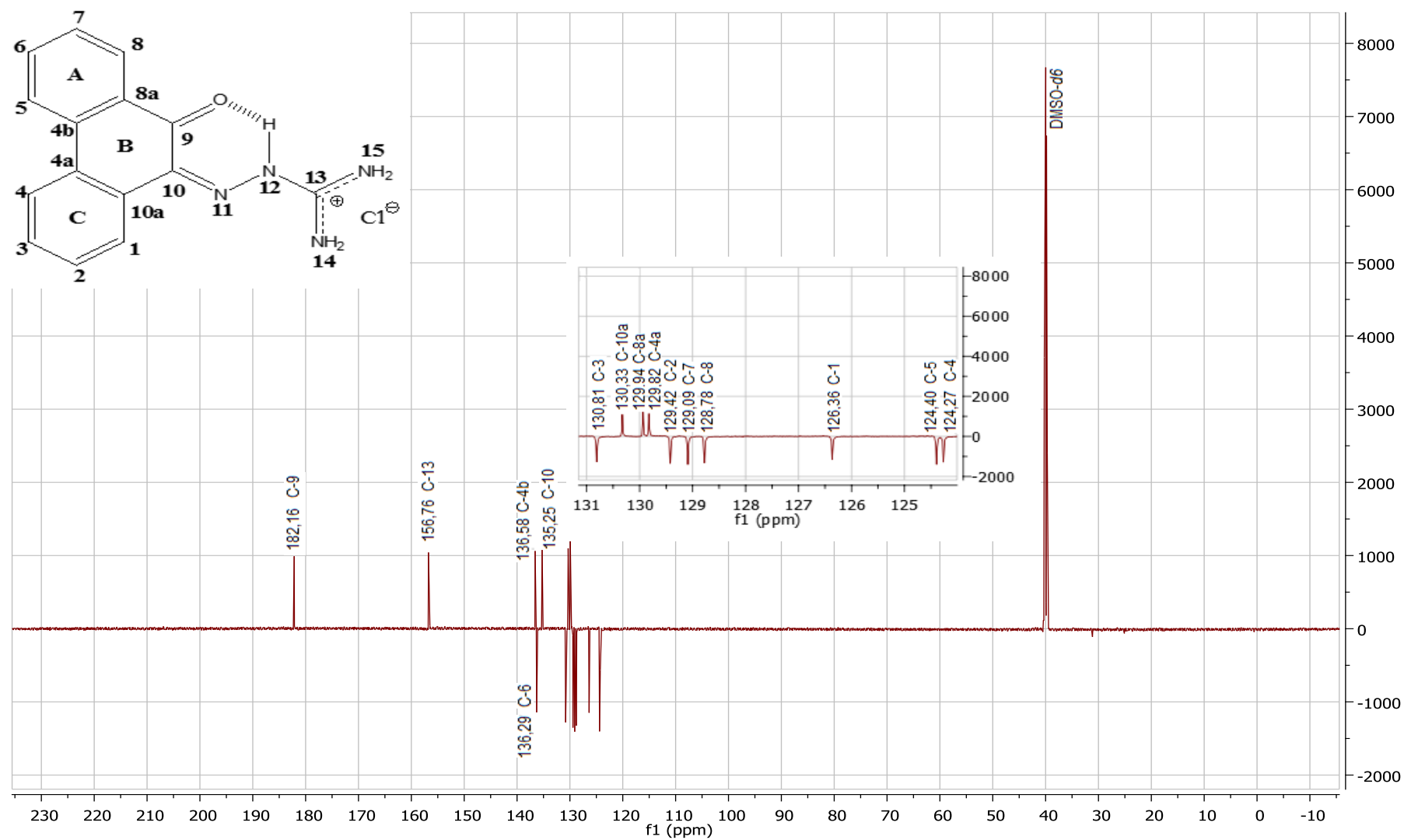


FIG. 9.2 - Espectro de RMN de ^{13}C (APT) para a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em DMSO- d_6 .

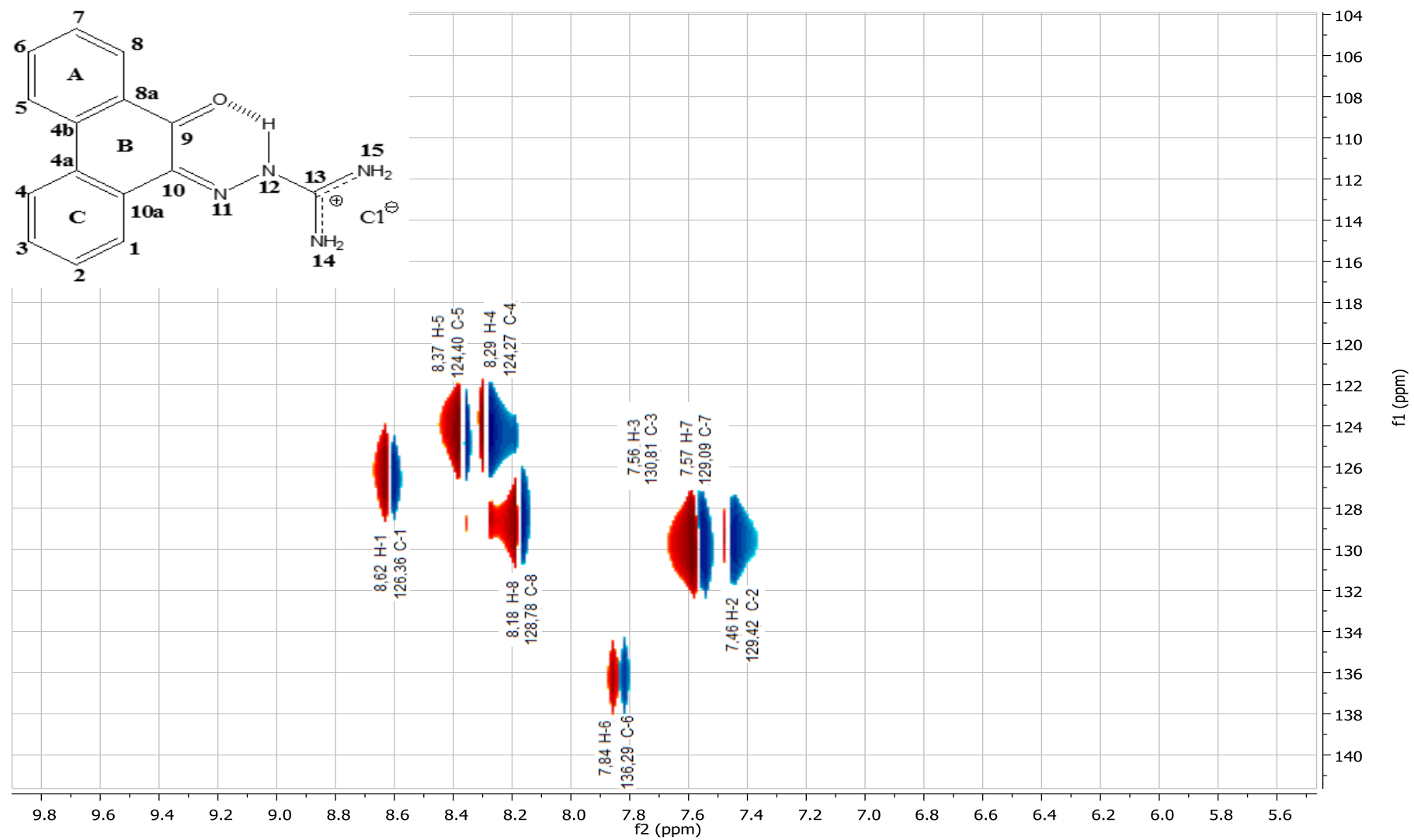


FIG. 9.3 - Espectro de RMN de HSQC para a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em DMSO-*d*₆.

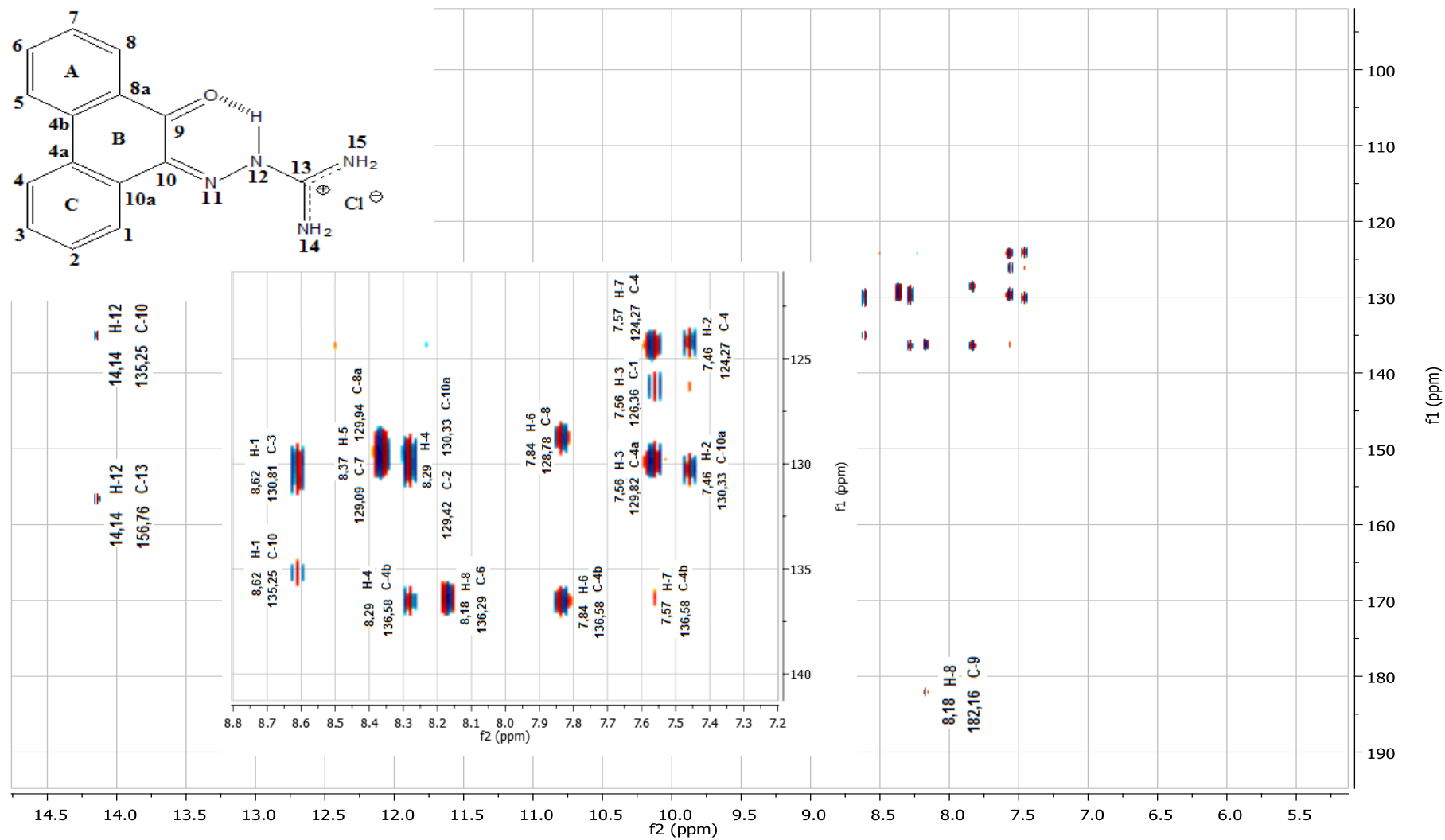


FIG. 9.4 - Espectro de RMN de HMBC para a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em DMSO-*d*₆.

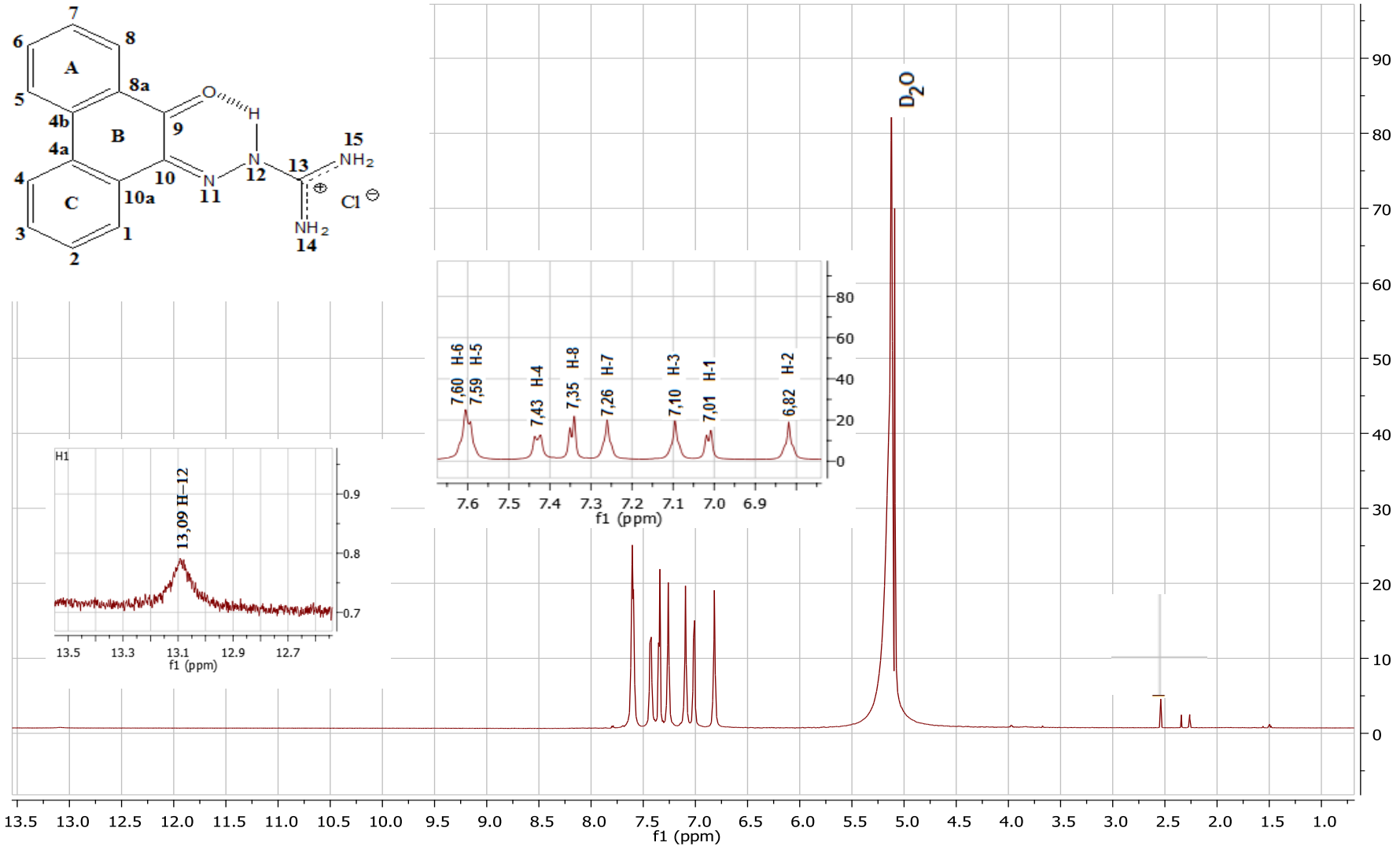


FIG. 9.5 - Espectro de RMN de ¹H para a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério.

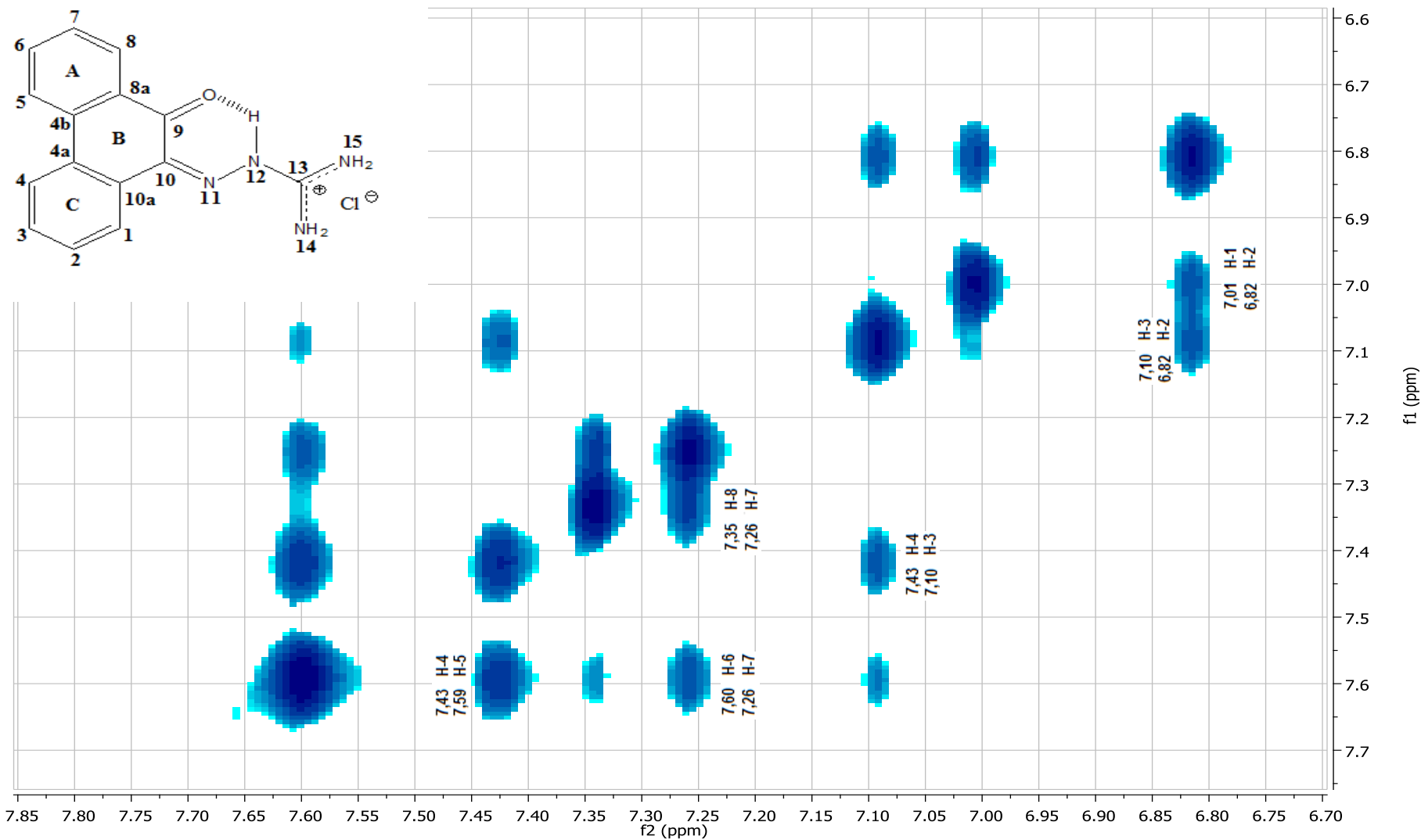


FIG. 9.6 - Espectro de RMN de NOESY para a 9,10-fenantrenoquinona guanilhidrazona em 90% tampão fosfato de sódio preparado com água (Milli-Q) e 10% Óxido de Deutério.