

COMPOSTOS CURCUMONOIDES COMO POTENCIAIS AGENTES INTERCALANTES DE DNA

EDUARDA BRAGA FERNANDES¹; BRUNO NUNES DA ROSA²; CLAUDIO
MARTIN PEREIRA DE PEREIRA²; JANICE LUEHRING GIONGO²; VÍTOR
PEREIRA KLEIN²; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER³

¹Universidade Federal de Pelotas – dudsbrg@outlook.com

² Universidade Federal de Pelotas – Claudiochemistry@gmail.com; brunondrosa@gmail.com;
janicegiongo@hotmail.com; vitorpereiraklein17@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A biologia molecular é à área da biologia que estuda os organismos em um ponto de vista molecular utilizando técnicas, como eletroforese, reação em cadeia polimerase e amplificação isotérmica mediada por laço (LAMP) para identificação, identificação e purificar fragmentos de ácidos nucleicos (O'NEIL, BEACH & GRUBER, 2018; GREEN & SAMBROOK, 2019).

A aplicação de compostos fluoróforos começou nos anos 1972, sendo o brometo de etídio a molécula mais utilizada principalmente pelo seu baixo custo (AAIJ & BORST, 1972). No entanto, ele possui propriedades mutagênicas e neurotóxicas (BULATHSINGHALA & SHAW, 2014). Por esse motivo, a busca por novos compostos fluorescentes com menos efeitos tóxicos e com baixo custo é de grande interesse (Li et al, 2020).

A *Cúrcuma Longa* Linn. é uma planta extremamente utilizada na culinária mundial como tempero (MARCHI et al, 2016). Na literatura, existem diversos estudos que mostram a sua atividade bioativa e que relacionam esses potenciais ao seu principal constituinte, a curcumina (SOLEIMAN, SAHEBKAR & HOSSEINZADEH, 2018).

O grupo de pesquisa BioForense, ao longo dos anos, vem estudando novas moléculas com o objetivo de desenvolver pós corantes para revelação de impressões digitais. Com estes estudos, análogos da curcumina foram desenvolvidos, e demonstraram-se promissores reveladores fluorescentes de impressões digitais pois permitiram a visualização de impressões digitais latentes (POLETTI et al, 2022).

Tendo em vista a fluorescência emitida pela curcumina e a procura por novas moléculas corantes de DNA seguras e de baixo custo, o presente estudo tem como objetivo avaliar a potencial interação entre DNA e moléculas curcuminoides.

2. METODOLOGIA

2.1. COMPOSTOS CURCUMINOIDES

Os compostos curcuminoides (1E, 4E) -1,5-bis(4-(dimetilamina) fenil) penta-1,4-dien-3-ona (BN49), (2E,5E) -2,5-bis(4(dimetilamina)benzilideno) ciclopentanona (BN50) e (2E,6E) -2,6-bis([4-(dimetilamino) fenil] metileno) ciclohexan-1-ona (BN51) (Figura 1) foram cedidos em parceria com o LLipBio.

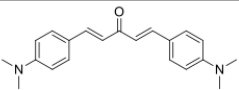
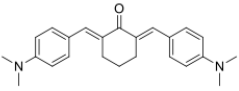
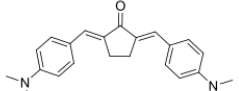
Código	Estrutura
BN49	
BN51	
BN50	

Figura 1: Estrutura química dos compostos curcuminoides.

2.2. ELETROFORESE

A eletroforese foi realizada segundo Barut e colaboradores (2017) com modificações. Primeiramente, foi preparado um gel de agarose 1% diluindo 0,35g de agarose em 35mL de Tris/Borato/EDTA 1x (TBE). Antes de solidificar, 2µL de agente intercalante (BN49, BN50 ou BN51) foi adicionado ao gel. Posteriormente, 4µL de marcador de peso molecular foi homogeneizados com 2µL de tampão de corrida (4g de sacarose, 0,025g de azul de bromotimol e água qsp para 6 mL).

O homogenato foi transferido aos respectivos poços do gel submerso de tampão de corrida TBE 1x e logo submetidos a uma corrente elétrica de 75V por 35 minutos. A leitura foi realizada em um transiluminador L-Pix Touch 20x20 (Loccus, São Paulo, Brasil). Após, os géis foram submetidos a banho de brometo por 30 minutos e realizado nova leitura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tal como acontece com a eletroforese utilizando brometo de etídio, a eletroforese foi realizada adicionando os compostos curcuminóides ao gel (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). As Figuras 2, 3 e 4 mostram géis contendo os compostos BN49, BN50 e BN51, respectivamente. Os resultados dos géis de agarose mostraram que não foi possível visualizar as bandas correspondentes ao marcador de peso molecular ao se utilizar os compostos curcuminóides tanto diluídos na composição do gel quanto homogeneizados às amostras previamente à transferência para o poço (Figuras 2A, 3A e 4A). No entanto, a visualização das bandas passou a ser possível ao submeter-se os géis a banho de brometo por 30 minutos (Figuras 2B, 3B e 4B).

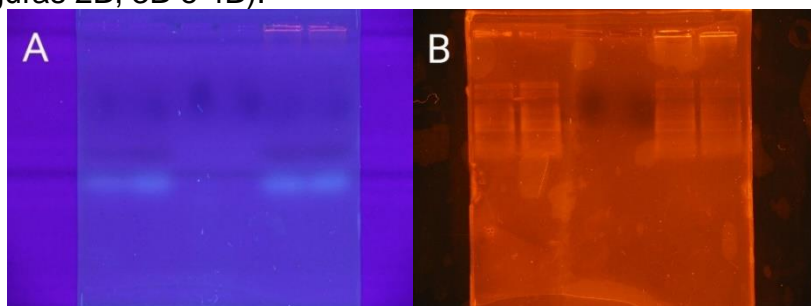


Figura 2: Gel de agarose contendo BN 49 (A) e Gel de agarose contendo BN49 após banho de brometo (B)

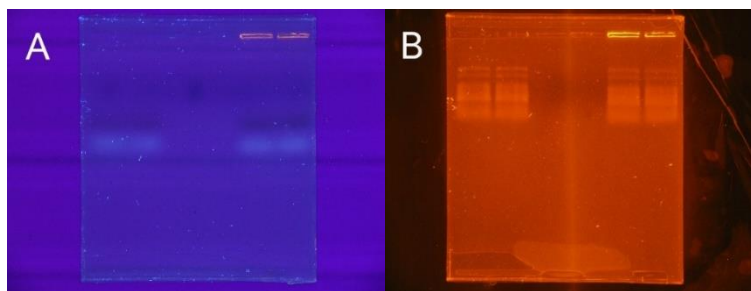


Figura 3: Gel de agarose contendo BN 50 (A) e Gel de agarose contendo BN50 após banho de brometo (B)

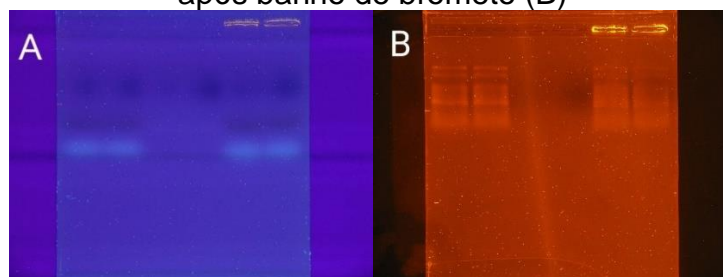


Figura 4: Gel de agarose contendo BN 51 (A) e Gel de agarose contendo BN51 após banho de brometo (B)

Os resultados da eletroforese mostram que com a utilização dos compostos curcuminoides no gel e nos poços não foi possível a visualização das bandas do marcador de peso molecular.

Os resultados negativos podem ser explicados com base na composição dos compostos curcuminoides. A presença de polos positivos é característica de moléculas corantes comerciais e tem grande relação com a intercalação de moléculas com o DNA eletronegativo (XUE et al., 2022). As iminas presentes na estrutura do brometo de etídio, por exemplo, são grandes alvos para interação com DNA em virtude das cargas positivas parciais presentes nos átomos de nitrogênio (EL-SHISHTAWY et al., 2007). A nuvem eletrônica presente no nitrogênio das moléculas dos corantes confere a elas a possibilidade de doar elétrons para o hidrogênio do grupamento fosfato do DNA auxiliando a intercalação (YU & PLETKA & IWAHARA, 2020).

O nitrogênio é presente na estrutura dos compostos curcuminoides na posição 4 dos anéis aromáticos, dando a ele potencial como agente intercalante. Porém, a estabilidade da molécula pela ausência de carga positiva nesses átomos não contribui para a ligação com o material genético, desfavorecendo essa intercalação.

4. CONCLUSÕES

Diante do exposto, podemos afirmar que os compostos curcuminoides BN49, BN50 e BN51 não podem ser utilizados como corantes para a visualização de ácidos nucleicos em técnicas de biologia molecular. Como projeto futuro, o aperfeiçoamento das moléculas com a inserção de outros grupos funcionais que permitam uma carga eletrostática maior e/ou uma melhor ligação com o DNA é de grande interesse.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAIJ, Cees; BORST, Piet. The gel electrophoresis of DNA. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis**, v. 269, n. 2, p. 192-200, 1972.

BARUT, Burak; DEMIRBAS, Ümit; ÖZEL, Arzu; KANTEKIN, Halit. Novel water soluble morpholine substituted Zn (II) phthalocyanine: Synthesis, characterization, DNA/BSA binding, DNA photocleavage and topoisomerase I

inhibition. **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 499-508, 2017.

EL-SHISHTAWY, Reda M.; SANTOS, Cecilia. R.; GONÇALVES, Isabel; MARCELINO, Helena; ALMEIDA, Paulo. New amino and acetamido monomethine cyanine dyes for the detection of DNA in agarose gels. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 16, p. 5537-5542, 2007.

GREEN, Michael R.; SAMBROOK, Joseph. Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2019, n. 1, 2019.

LI, Zhaohui; CHANG, Po-Hsiang; JIANG, Wei-The; LIU, Yujuan. Enhanced removal of ethidium bromide (EtBr) from aqueous solution using rectorite. **Journal of hazardous materials**, v. 384, p. 121254, 2020.

MARCHI, Juliana Pelissari; TEDESCO, Luana; MELO, Ailton da Cruz; FRASSON, Andressa Caroline; FRANÇA, Vivian Francielle; SATO, Samantha Wietzikoski; WIETZIKOSKI, Evelyn Claudia. Curcuma longa L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 20, n. 3, 2016.

POLETTI, Tais; BERNEIRA, Lucas M.; BUENO, Danielle T.; DA SILVA, Caroline C.; DA SILVA, Robson; PEREIRA, Claudio M.P. Chemical evaluation and application of cinnamaldehyde-derived curcumins as potential fingerprint development agents. **Talanta Open**, v. 6, p. 100133, 2022.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. **The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.

SOLEIMANI, Vahid; SAHEBKAR, Amirhossein; HOSSEINZADEH, Hossein. Turmeric (Curcuma longa) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 6, p. 985-995, 2018.

XUE, Jingjing; WANG, Peng; LI, Xinpeng; TAN, Rongri; ZONG, Wenjun. Transformation characteristics of A-DNA in salt solution revealed through molecular dynamics simulations. **Biophysical Chemistry**, v. 288, p. 106845, 2022.

YU, Binhan; PLETKA, Channing C.; IWAHARA, Junji. NMR observation of intermolecular hydrogen bonds between protein tyrosine side-chain OH and DNA phosphate groups. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 6, p. 1065-1070, 2020.

O'NEIL, Casey S.; BEACH, Jacie L.; GRUBER, Todd D. Thiazole orange as an everyday replacement for ethidium bromide and costly DNA dyes for electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 39, n. 12, p. 1474-1477, 2018.

BULATHSINGHALA, A. T.; SHAW, I. C. The toxic chemistry of methyl bromide. **Human & experimental toxicology**, v. 33, n. 1, p. 81-91, 2014.