

COMPOSTOS CURCUMINOIDES COMO POTENCIAIS AGENTES INTERCALANTES DE DNA

LUANE PINHEIRO GARCIA¹; CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA²;
EDUARDA BRAGA FERNANDES³; JANICE LUEHRING GIONG⁴; VÍTOR
PEREIRA KLEIN⁵; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – luanegarcia25@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – Claudiochemistry@gmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas – dudsbrg@outlook.com;

⁴Universidade Federal de Pelotas - janicegiong@hotmail.com;

⁵Universidade Federal de Pelotas - vitorpereiraklein17@gmail.com;

⁶Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A *Cúrcuma longa* Lin é conhecida popularmente como cúrcuma ou açafrão é utilizada como tempero em alimentos e muito estudada por suas propriedades biológicas (WAN MOHD TAJUDDIN et al., 2019) sendo usada como medicamento natural. A sua molécula vem gerando grande interesse ao longo dos anos por conter na sua composição curcuminoides bioativos, como a curcumina, a desmetoxicurcumina e a bisdesmetoxicurcumina (GOPI et al., 2017). Acredita-se que a curcumina desempenhe um papel importante no combate a condições patológicas mediadas pelo estresse oxidativo (KALPANA et al., 2005).

Apesar do seu efeito farmacológico estar bem elucidado, vem sendo desenvolvidos, novas moléculas derivadas da curcumina com o principal objetivo de aumentar sua biodisponibilidade, pois a mesma tem baixa solubilidade em água dificultando absorção (SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Por esse motivo, a estrutura química da curcumina tem sofrido diversas modificações, sendo mais recorrentes nas posições 3 e 4 dos anéis aromáticos e na porção -1,6-heptadieno-3,5-diona da molécula (BAIRWA et al, 2014).

Os corantes fluorescentes desempenham um papel essencial na biologia molecular por possibilitarem a visualização de moléculas e estruturas celulares (GODAVARTHI et al., 2017). A intercalação desses corantes possibilita a identificação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, além de serem usadas em diversas técnicas como reação de cadeia polimerase (PCR), amplificação isotérmica mediada por laço (RT-LAMP) e eletroforese (MURO & ATILLA-GOKCUMEN & EGGERT, 2014; REAM & LEWIS & LEWIS, 2016; THOMPSON & LEI, 2020; ZHU et al., 2020).

Tendo em vista a fluorescência emitida pela curcumina e a procura por novas moléculas corantes de DNA seguras e de baixo custo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a potencial interação entre DNA e moléculas curcuminoides desenvolvidas pelo Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica (LLipBio).

2. METODOLOGIA

O DNA utilizado é proveniente de uma cepa de isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* coletada entre março e setembro de 2021 no Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas (HE). O isolado bacteriano foi obtido por cultivo em ágar MacConkey (MC) e incubado a 37°C por 24 horas. O inóculo bacteriano foi preparado na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC ml⁻¹, padrão de 0,5 na escala de McFarland.

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) foram cedidos em parceria com o LLipBio. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido da Alpatech (Santa Catarina, Brasil), o Platinum SYBR SuperMix, ROX Reference dye (ROX) e os primers foram adquiridos da Invitrogen (São Paulo, Brasil).

A extração de DNA dos isolados bacterianos foi realizada utilizando o método de extração por coluna PureLink (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA). A extração foi executada de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizado quantificação e determinação da pureza do DNA (razões 260/280 e 260/230) usando um espectrofotômetro UV NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

A reação de cadeia polimerase (qPCR) foi realizada seguindo o protocolo do Centro de Controle e prevenção de doenças (CDC) com o objetivo de amplificar o gene *bla_{kpc}* presente na amostra. Para a preparação do mix de qPCR foram utilizados os volumes de 5µL de Platinum SYBR SuperMix, 0,2µL de ROX, 3,3µL de água ultrapura, 0,25µL do primer F, 0,25µL do primers R e 1µL de *template*. O volume final da reação foi calculado para 10µL. Como controle negativo foi usado 1µL de água ultrapura. O resultado positivo é caracterizado pela amplificação entre os ciclos 10 e 30.

A reação de qPCR foi realizada nas seguintes condições: Ativação enzimática em 95°C por 3 minutos, desnaturação a 95°C por 5 segundos e o anelamento e extensão a 60°C por 30 segundos.

Para a amplificação da reação foram utilizados os primers KPC-F e KPC-R mostrados na tabela 1. Os primers foram diluídos a partir de uma solução estoque de 100µM para uma solução de trabalho de 20µM. A concentração final de cada primer na reação foi de 0,5µM.

Oligonucleotide	Sequência Nucleotídeo, 5' - 3'
KPC-F	GGC CGC CGT GCA ATA C
KPC-R	GCC GCC CAA CTC CTT CA

Tabela 1: Primers usados na reação de PCR.

Foi realizado teste de emissão e excitação de fluorescência para determinar o aumento de fluorescência dos compostos curcuminoides na presença de material genético.

O experimento foi executado segundo a metodologia de Jones e colaboradores (1998) com modificações. Foi realizado diluição dos compostos nas concentrações de 1mg/mL, 0,75 mg/mL e 0,50 mg/mL em DMSO. Então foi adicionado 40 µL de material genético, incubado por 30 minutos e feito a leitura no espectrofluorímetro modelo RF-5301PC da marca Shimadzu (Porto Alegre, Brasil). O teste foi realizado em duplicata.

A análise estatística foi realizada em GraphPad Prism® versão 8.0.1. Os testes realizados foram ANOVA de uma via seguido do teste de Kruskal-Wallis no, devido a distribuição não gaussiana dos dados obtidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizou-se a técnica qPCR para amplificação do gene *bla_{kpc}* previamente extraído com objetivo de obter material genético suficiente para a realização do teste de fluorescência. Após foi efetuado a quantificação do material genético presente nas amostras, verificando-se uma concentração de DNA de 500,45 ng/μL após a amplificação.

Para avaliar a variação na fluorescência emitida pelos compostos na presença ou ausência de material genético, foram adicionados 40 μL de DNA a 960 μL de BN49, BN50 e BN51, nas concentrações de 1, 0,75 e 0,5 mg/mL. Como controle, foram utilizados os compostos sem a adição de DNA e os resultados das medições no espectrofluorímetro são apresentados na Figura 1.

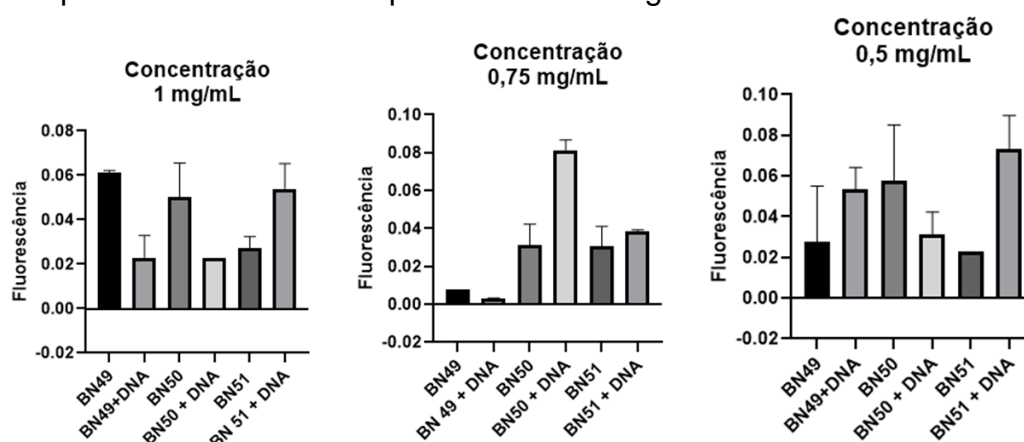


Figura 1: Gráficos de fluorescência dos compostos curcuminoides com ou sem presença de DNA na concentração de 1; 0,75 e 0,5 mg/mL.

Os dados apresentados na figura 1 revelam que em nenhuma das concentrações testadas houve diferença significativa entre as fluorescências emitidas pelos compostos na presença ou ausência de DNA. Esses resultados insatisfatórios podem ser explicados com base na composição dos compostos curcuminoides.

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 et al., 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 possuem capacidade de intercalação com DNA e não podem ser utilizados 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

- BAIRWA, Khemraj; GROVER, Jagdeep; KANI, Mihir; JACHAK, Sanjay M. Recent developments in chemistry and biology of curcumin analogues. **RSC advances**, v. 4, n. 27, p. 13946-13978, 2014.
- 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.
- GODAVARTHI, S.; KUMAR K. Mohan; VÉLEZ, E. Vázquez; ELIGIO, A. Hernandez; MAHENDHIRAN, M.; COMO, N. Hernández; ALEMAN, M.; GOMEZ, L. Martínez. Nitrogen doped carbon dots derived from Sargassum fluitans as fluorophore for DNA detection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 172, p. 36-41, 2017.
- GOPI, Sreeraj et al. Comparative oral absorption of curcumin in a natural turmeric matrix with two other curcumin formulations: An open-label parallel-arm study. **Phytotherapy research**, v. 31, n. 12, p. 1883-1891, 2017.
- JONES, Laurie J.; YUE, Stephen T.; CHEUNG, Ching-Ying; CANTORA Victoria L. RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. **Analytical biochemistry**, v. 265, n. 2, p. 368-374, 1998.
- KALPANA C.; RAJASEKHARAN K. N.; MENON V. P. Menon. Modulatory effects of curcumin and curcumin analog on circulatory lipid profiles during nicotine-induced toxicity in Wistar rats. *J Med Food* 8(2), 246–250 (2005).
- MURO, Eleonora; ATILLA-GOKCUMEN, G. Ekin; EGGERT, Ulrike S. Lipids in cell biology: how can we understand them better?. **Molecular biology of the cell**, v. 25, n. 12, p. 1819-1823, 2014.
- REAM, Jennifer A.; LEWIS, L. Kevin; LEWIS, Karen A. Rapid agarose gel electrophoretic mobility shift assay for quantitating protein: RNA interactions. **Analytical biochemistry**, v. 511, p. 36-41, 2016.
- SUETH-SANTIAGO, Vitor; SILVA, Gustavo Mendes; RICARDO, Débora Decoté; FREIRE, Marco Edilson de Lima. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, p. 538-552, 2015.
- THOMPSON, Dorian; LEI, Yu. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. **Sensors and Actuators Reports**, v. 2, n. 1, p. 100017, 2020.
- WAN MOHD TAJUDDIN, Wan Nur Baitty et al. Mechanistic understanding of curcumin's therapeutic effects in lung cancer. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 2989, 2019.
- 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.
- ZHU, Hanliang; ZHANG Hao Qing; XU Ying, LAŠŠÁKOVÁ Soňa; KORABECNÁ Marie; NEUZZIL Pavel. PCR past, present and future. **Biotechniques**, v. 69, n. 4, p. 317-325, 2020.