

**ETHE DE ARAÚJO COSTA**

**ESTUDO DO MODO DE INTERAÇÃO DO FÁRMACO CLOROQUINA  
COM O DNA E SEU EFEITO EM CÉLULAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Física para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Márcio Santos Rocha

Coorientadora: Anésia Aparecida dos Santos

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C837e  
2023 Costa, Ethe de Araújo, 1987-  
Estudo do modo de interação do fármaco cloroquina com o  
DNA e seu efeito em células / Ethe de Araújo Costa. – Viçosa,  
MG, 2023.

1 tese eletrônica (126 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Márcio Santos Rocha.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Física, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.288>

Modo de acesso: World Wide web.

1. Pinças ópticas. 2. Cloroquina. 3. Ligantes. I. Rocha,  
Márcio Santos, 1978-. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física.  
III. Título.

CDD 22. ed. 535.84

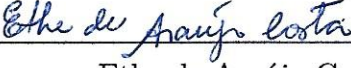
ETHE DE ARAÚJO COSTA

ESTUDO DO MODO DE INTERAÇÃO DO FÁRMACO CLOROQUINA  
COM O DNA E SEU EFEITO EM CÉLULAS

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Física para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2023.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Ethe de Araújo Costa  
Autora

  
\_\_\_\_\_  
Márcio Santos Rocha  
Orientador

Aos meus pais e à minha amada avó Maria Cícera (*in memoriam*).

# Agradecimentos

Ao maestro do universo.

A meus pais, Conceição Lira e Euzébio Filho, pelo apoio, incentivo, carinho, amor e dedicação durante minha jornada em busca do conhecimento. Ao meu irmão Alcebiades, por seu suporte e carinho. Ao meu esposo Lucas Portilho, por todo amor, carinho e incentivo.

Ao meu orientador, professor Márcio Rocha, por sua disposição em guiar meus passos, ouvir minhas ideias, compreender meus momentos difíceis e por todo suporte ao longo desses anos de doutorado. Ao Laboratório de Física Biológica e colegas de trabalho por todo acolhimento, momentos de discussões, risos e troca de experiências.

A professora Anésia dos Santos, por todos os momentos de discussão e por aceitar fazer parte deste trabalho. Ao Laboratório de Cultura de Células, em especial a Amanda Gonçalves por dividir comigo seu conhecimento, troca de experiências e disposição em esclarecer todas as minhas dúvidas.

Ao amigo que a vida me presenteou em Viçosa, José Carlos, meu querido Zezitos, que sempre esteve ao meu lado, dando apoio, suporte, incentivo e muita diversão. A Jean Kássio, Diogo Rodrigues, Isa Lorena, Jeyse Fernanda, Poliane Lima e Cecília Rodrigues por acreditarem na pessoa que sou e me acolherem em todos os momentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Física da UFV que sempre estiveram disponíveis e acessíveis.

Agradeço ao CNPq e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001, pela concessão da bolsa de estudos.

*Enquanto a crítica dá voltas ao redor do mundo,  
o elogio ainda está preparando as malas. Léo Lins*

# Resumo

COSTA, Ethe de Araújo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Estudo do modo de interação do fármaco cloroquina com o DNA e seu efeito em células.** Orientador: Márcio Santos Rocha. Coorientadora: Anésia Aparecida dos Santos.

O estudo das interações entre a molécula de DNA e fármacos tem sido de extrema relevância para se compreender as peculiaridades intrínsecas dessas interações. Apesar dos diversos avanços científicos e tecnológicos, os mecanismos de ação molecular de alguns fármacos permanecem desconhecidos, principalmente no que diz respeito às interações intrínsecas desses compostos com componentes celulares como proteínas e ácidos nucleicos. A cloroquina (CLQ) é um composto amplamente usado no tratamento contra a malária. No início de 2020, alguns estudos mostraram que esse agente antimalarial poderia ser uma alternativa no enfrentamento da pandemia da COVID-19. Contudo, muitos aspectos da interação entre a molécula de DNA e a cloroquina ainda são desconhecidos. Nesta tese o estudo do fármaco cloroquina foi realizado em dois diferentes níveis: (i) nível de molécula única usando a técnica de Pinça Óptica (OT) para analisar os modos de interação do complexo DNA-CLQ. Esse tipo de estudo é reconhecido como estado da arte para caracterizar as interações do DNA com ligantes como fármacos ou proteínas, e permite determinar os modos de ligação e os parâmetros físico-químicos das interações; (ii) nível celular através de ensaios de citotoxicidade da cloroquina em três tipos distintos de linhas celulares normais, HEK-293 (células renais humanas), melan-a (células epiteliais murina) e VERO (células renais de primata), que permite avaliar e comparar os efeitos do fármaco na viabilidade celular. A citotoxicidade é um dos indicadores mais importantes de avaliação biológica em estudos *in vitro*, sendo que a viabilidade celular é um dos aspectos mais relevantes para compreender os mecanismos de resposta das células após exposição a agentes tóxicos. Os resultados obtidos são intrigantes. Dos ensaios de pinçamento óptico observamos que a CLQ tem forte afinidade com a molécula de DNA, mas os detalhes intrínsecos dos mecanismos de interação dependem da força iônica do meio circundante, que pode alterar o modo de ligação entre as duas moléculas. Dos ensaios de citotoxicidade observamos que a CLQ possui alta toxicidade nas três linhagens celulares testadas, de maneira que a linhagem HEK-293 possui maior sensibilidade ao fármaco, apresentando dois valores de concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ). Esse comportamento apresentado pela linhagem HEK-293 é conhecido como efeito hormético, que é induzido pelo fármaco. Esses resultados contribuem para o melhor entendimento tanto a nível molecular quanto celular da ação da cloroquina e pode auxiliar estudos posteriores.

**Palavras-chave:** Cloroquina. Pinça óptica. Ligantes. Cultura de células.

# Abstract

COSTA, Ethe de Araújo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Study of the mode of interaction of the drug chloroquine with DNA and its effect on cells.** Adviser: Márcio Santos Rocha. Co-adviser: Anésia Aparecida dos Santos.

Understanding the details of the interactions between the DNA molecule and ligands is paramount. Despite the many breakthroughs in science and technology, the exact way in which ligands, particularly drugs, interact with cellular components such as proteins and nucleic acids, remains unknown. Chloroquine (CLQ) is an agent commonly used to treat malaria. In early 2020, some studies have shown that this antimalarial drug could be an alternative in the fight against the COVID-19 pandemic. Studying the interactions between the DNA molecule and ligands is extremely important to understand the specifics of these interactions. However, many aspects of the interaction between the DNA molecule and chloroquine are still unknown. In this work, the study of the drug chloroquine was performed at two different levels: (i) The single molecule level using the Optical Tweezers (OT) technique to analyze the interaction modes of the DNA-CLQ complex. This type of study is considered state-of-the-art for the characterization of DNA interactions with ligands such as drugs or proteins and allows the determination of binding modes and physicochemical parameters of the interactions; (ii) cellular level by chloroquine cytotoxicity assays in three different types of cell lines, HEK-293 (human kidney cells), melan-a (mouse epithelial cells) and VERO (primate kidney cells), which allow the evaluation and comparison of the effects of the drug on cell viability. Cytotoxicity is one of the most important indicators for biological evaluation in in vitro studies, and cell viability is one of the most important aspects to understand cell response mechanisms after exposure to toxic substances. The results obtained in the optical tweezers assays, we found that CLQ has a strong affinity for the DNA molecule, but the details of the interaction mechanisms depend on the ionic strength of the surrounding medium, which may alter the binding mode between the two molecules. In the cytotoxicity assays, we found that CLQ exhibited high toxicity in the three cell lines tested, with the HEK-293 cell line being more sensitive to the drug with two  $IC_{50}$  values. This behavior of the HEK-293 strain is known to be a hormetic effect induced by the drug. These results contribute to a better understanding of the effect of chloroquine at both the molecular and cellular levels and could be useful for further studies.

**Keywords:** Chloroquine. Optical tweezers. Ligands. Cell culture.

# Sumário

<b>I</b>	<b>Introdução</b>	<b>11</b>
<b>II</b>	<b>Cloroquina</b>	<b>15</b>
2.1	Pandemia COVID-19	15
2.2	Breve relato histórico sobre o fármaco Cloroquina	17
2.3	Características físico-químicas	18
2.4	Cloroquina <i>vs</i> malária	20
2.5	Hidroxicloroquina	21
<b>III</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>	<b>23</b>
3.1	O quebra-cabeças: a descoberta de Miescher	23
3.2	Estrutura e conformação da molécula	24
3.2.1	Estrutura química do DNA	25
3.2.2	Ligações de Hidrogênio e Interações de empilhamento	26
3.2.3	Estrutura física do DNA	27
3.3	Lambda-DNA	29
<b>IV</b>	<b>Mecânica dos Polímeros semiflexíveis</b>	<b>30</b>
4.1	Cadeia livremente articulada (FJC)	30
4.1.1	Analogia entre os modelos de passeio aleatório e FJC	32
4.2	Modelo Kratky-Porod	34
4.3	Modelo Worm-like chain (WLC)	36
<b>V</b>	<b>Interação DNA - ligantes</b>	<b>41</b>
5.1	Equilíbrio químico nas interações DNA-ligantes	41
5.2	Modelo de Scatchard	42
5.3	Modelo de Hill	42
5.4	Modelo de McGhee – von Hippel	44
5.5	Interação DNA - Cloroquina	47
<b>VI</b>	<b>Pinça óptica</b>	<b>49</b>
6.1	Um breve histórico sobre a manipulação óptica	49
6.2	Fundamentos do pinçamento óptico	50
6.2.1	Teoria Rayleigh	50
6.2.2	Teoria de óptica geométrica (OG)	51
6.3	Procedimento experimental	54
6.3.1	Construção e protocolo de tratamento da lamínula	54
6.3.2	Solução Lambda-DNA e microesferas	56
6.3.3	Sistema DNA-lamínula	56
6.3.4	Preparo das soluções de cloroquina	57
6.3.5	Estrutura experimental	58

6.3.6	Experimento pinça óptica . . . . .	59
<b>VII</b>	<b>Eletroforese em gel . . . . .</b>	<b>62</b>
7.1	Procedimento experimental . . . . .	64
7.1.1	Preparo matriz de agarose, solução eletrolítica e amostras DNA-CLQ . . . . .	64
7.1.2	Corrida eletroforética . . . . .	66
<b>VIII</b>	<b>Cultura de células . . . . .</b>	<b>67</b>
8.1	Linhas celulares . . . . .	67
8.1.1	Melan-a . . . . .	67
8.1.2	VERO . . . . .	68
8.1.3	HEK-293 . . . . .	68
8.2	Ensaio de citotoxicidade . . . . .	68
8.3	Procedimento experimental . . . . .	70
8.3.1	Linhagens celulares . . . . .	70
8.3.2	Condições de cultivo . . . . .	71
8.3.3	Ensaio de viabilidade celular . . . . .	71
8.3.4	Cálculo da viabilidade celular e análise estatística . . . . .	71
<b>IX</b>	<b>Resultados e discussões . . . . .</b>	<b>73</b>
9.1	Resultados - Pinça óptica . . . . .	73
9.1.1	A espectroscopia de força revela as peculiaridades da interação DNA-CLQ . . . . .	73
9.1.1.1	Curvas de força <i>vs</i> extensão (FEC) . . . . .	73
9.1.1.2	Propriedades mecânicas dos complexos DNA-CLQ . . . . .	74
9.1.1.3	A físico-química da interação DNA-CLQ . . . . .	77
9.2	Resultados - Eletroforese em gel . . . . .	80
9.3	Comparação crítica entre a cloroquina e hidroxicloroquina . . . . .	82
9.4	Discussões dos resultados de Pinça óptica e Eletroforese em gel . . . . .	83
9.5	Avaliação da viabilidade celular . . . . .	86
9.5.1	Ensaio de MTT . . . . .	86
9.5.2	Determinação da viabilidade celular e concentração inibitória - CLQ . . . . .	86
9.5.3	Determinação da viabilidade celular e concentração inibitória - HCLQ . . . . .	88
9.6	Discussões dos resultados de Viabilidade celular . . . . .	90
<b>X</b>	<b>Conclusões . . . . .</b>	<b>94</b>
<b>Referências . . . . .</b>		<b>96</b>
<b>APÊNDICE A</b>	<b>Passeio aleatório . . . . .</b>	<b>118</b>
1.1	O passeio aleatório em uma dimensão . . . . .	118
1.2	O passeio aleatório em mais dimensões . . . . .	120
<b>APÊNDICE B</b>	<b>Relação entre a função de partição e função de correlação do modelo Kratky-Porod . . . . .</b>	<b>122</b>

<b>ANEXO A Publicação</b> . . . . .	<b>126</b>
-------------------------------------	------------

# I Introdução

Ao longo da história mundial surtos intermitentes de doenças infecciosas exterminaram populações inteiras, determinaram o desfecho de guerras, e paradoxalmente, abriram caminhos para inovações e avanços científicos. Diversos aspectos dos avanços da ciência são relatados separadamente. Contudo, ao analisar de modo geral a história da humanidade é possível observar que o desenvolvimento de instrumentos científicos, fármacos, vacinas, etc., aconteceu concomitantemente a grandes fatos históricos como guerras e pandemias. Estes fatos moldaram de maneira significativa aspectos econômicos, políticos e sociais da civilização humana [1].

Nesse contexto, em dezembro de 2019, ocorrências de uma pneumonia de etiologia desconhecida foram relatadas em Wuhan, na China. Estudos genéticos comprovaram que tratava-se de um novo coronavírus vinculado ao vírus causador da SARS<sup>1</sup>. O vírus espalhou-se rapidamente por diversos países e devido ao crescente número de infectados e óbitos, em março de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS ou WHO, em inglês) caracterizou como pandemia da Doença do Coronavírus-19 (COVID-19), sendo a primeira pandemia causada por um coronavírus [2]. Em abril de 2020, somavam-se 6 milhões de infectados e 370 mil óbitos [3]. Várias instruções como isolamento social, uso de máscaras, higienização frequente das mãos e adaptações foram recomendadas [4].

Por já existir o SARS-CoV-1, o vírus foi denominado SARS-CoV-2<sup>2</sup> e pertence a família *Coronaviridae*. Há inúmeras pesquisas sobre os vírus oriundos desta família, principalmente em decorrência das epidemias causadas pelo SARS-CoV-1 e MERS-CoV<sup>3</sup> [5, 3]. Estudos realizados com o fármaco cloroquina (CLQ) para reduzir infecções causadas pelo SARS-CoV-1 e MERS-CoV [6, 7, 8] foram usados para embasar e aprimorar novas pesquisas para combater o SARS-CoV-2 [9, 10, 11]. Pesquisas preliminares *in vitro* mostraram-se promissoras, a CLQ reduzia de maneira significativa a replicação do SARS-CoV-2 em células infectadas [9, 12]. Em um dos primeiros ensaios clínicos em pacientes chineses infectados com COVID-19, a CLQ teve um efeito relevante, tanto em termos de resultados clínicos quanto de depuração viral quando comparado ao grupo controle [13].

Com a rápida disseminação do vírus, o uso em caráter *off-label*<sup>4</sup> da CLQ foi autorizado na China pela Comissão de Saúde da Província de Guandong [15]. A Food and Drug Administration (FDA) autorizou o uso emergencial nos EUA [16], por fim, a OMS recomendou o uso do fármaco nos demais países [17]. Contudo, estudos mais robustos descartaram o uso da CLQ no combate ao SARS-CoV-2. Uma vez que não havia comprovação concreta de sua eficiência contra COVID-19 [18, 19], a OMS e diversas agências

<sup>1</sup> Severe Acute Respiratory Syndrome, em tradução livre, Síndrome respiratória aguda grave.

<sup>2</sup> Em tradução livre, Síndrome respiratória aguda grave - coronavírus 2.

<sup>3</sup> Em tradução livre, Síndrome Respiratória do Oriente Médio - Coronavírus 1.

<sup>4</sup> Uso divergente do aprovado em bula ou produto sem registro no órgão de vigilância sanitária [14].

de saúde suspenderam a orientação de uso do fármaco [20, 21].

No Brasil, o primeiro caso de paciente infectado com o SARS-CoV-2 foi confirmado pelo Ministério da Saúde no dia 26 de fevereiro de 2020 [22]. Em maio, estimava-se mais de 300 mil casos registrados, com 18 mil óbitos [23]. A fim de direcionar a comunidade médica, o Ministério da Saúde publicou uma nota informativa<sup>5</sup> em maio de 2020 contendo orientações para manuseio medicamentoso precoce da CLQ em pacientes infectados com COVID-19 [25]. Devido a nota informativa de Nº 9/2020, a Sociedade Brasileira de Medicina de Família e Comunidade moveu uma ação judicial<sup>6</sup> contra a Advocacia Geral da União para invalidar e anular a nota em vigor [26].

Apesar da suspensão e não recomendação de uso da CLQ em pacientes com COVID-19 pela OMS, no Brasil a produção e distribuição da CLQ foi intensificada, tornando-se um medicamento controlado devido ao uso indiscriminado e sem orientação médica especializada [27, 28]. Embora houvesse uma ação judicial para anular as notas informativas divulgadas pelo Ministério da Saúde e diversas orientações relacionadas ao uso indevido do fármaco por entidades brasileiras de saúde [29, 30], a procura e uso do medicamento tornou-se cada vez maior.

Por que o Brasil se tornou o país da cloroquina?

De acordo com o Instituto Humanitas, o Governo Federal e as Forças Armadas distribuíram 2,8 milhões de comprimidos de cloroquina para todos os estados da Federação. O Laboratório Químico e Farmacêutico do Exército (LQFEx) e o Laboratório Farmacêutico da Marinha (LFM) fabricaram 3,2 milhões de comprimidos de cloroquina entre os meses de março e junho de 2020 sem qualquer tipo de licitação, ao passo que a produção antes da pandemia era de 250 mil comprimidos a cada dois anos para combater a malária. Parte do medicamento era distribuído via Ministério da Saúde para as secretarias de saúde de estados e municípios. As regiões que mais receberam a CLQ foram as regiões Norte e Sul, totalizando mais de 1,2 milhão de comprimidos, ao passo que as outras regiões receberam 1,1 milhão de comprimidos [31].

Mas o que é de fato a cloroquina?

A cloroquina é um medicamento de primeira linha para prevenção e tratamento da malária, também é indicada para controle de doenças autoimunes como artrite reumatóide e lúpus eritematoso, tornando-se um dos medicamentos mais usados no mundo [32, 33, 34]. Desde o final da década de 1960, o papel antiviral *in vitro* da CLQ foi observado [35], sendo objeto de estudo em diversas pesquisas que apontam sua eficácia *in vitro* contra vírus como HIV, Ébola, Influenza, Dengue, além de infecções fúngicas, infecções bacterianas e neoplasias malignas [6, 36, 37]. Apesar de ser um fármaco indicado para o tratamento da malária e controle de doenças autoimunes reumatológicas há décadas, inúmeras peculiari-

<sup>5</sup> A primeira nota informativa foi publicada em março de 2020 (Nº 5/2020 - DAF/SCTIE/MS), nota substitutiva em 20 de maio de 2020 (Nº 9/2020 - SE/GAB/SE/MS) [24].

<sup>6</sup> De acordo com a Justiça Federal do Rio de Janeiro, a Ação Civil Pública de nº 5030353-65.2020.4.02.5101/RJ deu-se início em 22 de maio de 2020 [26].

dades relativas aos mecanismos de ação moleculares da CLQ permanecem desconhecidas, especialmente no que diz respeito às interações intrínsecas do fármaco com biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos [38, 39, 40].

Embora muito se conheça sobre como a maquinaria celular preserva e transmite as informações genéticas, e como são regulados esses processos, ainda existem lacunas na literatura acerca das interações entre os componentes responsáveis por esses processos. Com isso, o estudo das interações de fármacos e proteínas com a molécula de DNA é de grande relevância científica, pois detalha mecanismos celulares básicos como a replicação, transcrição do DNA e tradução de RNA mensageiro em proteínas, até a própria compactação da molécula de DNA no interior do núcleo celular [41, 42]. O ácido desoxirribonucleico é um biopolímero semiflexível responsável por armazenar toda informação genética dos seres vivos. Devido à sua natureza polimérica, as propriedades mecânicas como comprimento de contorno ( $L$ ) e comprimento de persistência ( $A$ ) podem variar dependendo das características do meio ou composto a que estiver exposto. Alguns fármacos são considerados ligantes, ou seja, interagem com a molécula de DNA através de um ou mais modos de ligação [41].

O estudo das propriedades mecânicas do DNA pode ser feito através das técnicas de molécula única. Tais técnicas são conhecidas como o estado da arte no estudo das interações DNA-ligantes, pois analisa e detalha de maneira individual o comportamento das propriedades mecânicas do DNA ao interagir com compostos como fármacos, marcadores fluorescentes, proteínas etc. Ao passo que, o estudo do equilíbrio químico da molécula de DNA e o ligante em solução é de vital importância para compreensão das particularidades da interação, sobretudo as características físico-químicas [41]. Neste trabalho, a técnica usada para análise das interações DNA-ligante foi a pinça óptica. Desenvolvida por Arthur Ashkin, a pinça óptica tinha como objetivo manipular partículas nanométricas [43]. Na década de 80, a técnica passou a ser usada na área das ciências biológicas, possibilitando caracterizar as propriedades mecânicas do DNA [44, 45]. Em 2018, Ashkin foi laureado com o Prêmio Nobel por sua dedicação em desenvolver a pinça óptica e aplicação da técnica em sistemas biológicos [46].

Diante do exposto, a motivação inicial para realização deste trabalho é compreender o comportamento das propriedades mecânicas do DNA ao interagir com o fármaco cloroquina, assim como analisar a citotoxicidade em diferentes linhagens celulares.

Este trabalho foi dividido em duas partes: (i) análise do mecanismo de ação do fármaco cloroquina a nível molecular com uso da técnica de pinça óptica. Serão analisadas as alterações nos parâmetros mecânicos, comprimento de contorno e comprimento de persistência da molécula de DNA ao interagir com variadas concentrações de cloroquina; (ii) estudo da ação da cloroquina a nível celular através do ensaio de MTT. Serão realizados ensaios de citotoxicidade em três diferentes linhagens celulares Melan-a, HEK-293 e Vero, para analisar o grau de toxicidade do fármaco.

A organização dos capítulos foi feita com o intuito de facilitar a leitura e compreensão dos conteúdos aqui abordados. É importante salientar que o trabalho não é relacionado à pandemia da COVID-19, mas sobre a interação do fármaco cloroquina com a molécula de DNA. Contudo, o impulso inicial para realizar este estudo foi o uso indevido da cloroquina como método profilático e no tratamento de pacientes infectados com o SARS-CoV-2, mesmo sem comprovação de sua eficácia para este fim.

De maneira que os capítulos a seguir descrevem o objeto de estudo que é a formação do complexo DNA-Cloroquina, a fundamentação teórica da técnica de pinça óptica e o modelo Worm-Like chain (WLC) usado para ajustar os dados experimentais obtidos. São descritos os procedimentos experimentais dos ensaios de pinçamento óptico, redução de MTT para análise da concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ) e eletroforese em gel de agarose. Por fim, são apresentados os resultados obtidos em cada técnica, além da comparação entre os resultados experimentais com os fármacos cloroquina e hidroxicloroquina usando as técnicas anteriormente citadas.

Os apêndices reúnem informações sobre os desenvolvimentos matemáticos realizados para embasar algumas passagens que fundamentam as metodologias de análise, assim como o artigo publicado referente a este trabalho.

## II Cloroquina

### 2.1 Pandemia COVID-19

Na historiografia mundial é possível encontrar diversas vezes em que a humanidade sofreu com doenças causadoras de centenas e/ou milhares de mortes. Peste Bubônica [47], Gripe Espanhola, considerada a mãe das pandemias e que levou a óbito entre 50 e 100 milhões de pessoas aproximadamente [48], e Cólera [49] são alguns exemplos que podemos encontrar na literatura.

Atualmente a sociedade enfrenta uma pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2<sup>1</sup>. A primeira notificação de infecção humana por esse patógeno ocorreu na cidade de Wuhan, localizada na Província de Hubei – China, em 5 dias havia mais de 70 mil infectados e 800 óbitos totalizados, de acordo com a OMS [51]. O vírus espalhou-se rapidamente por diversos países, e em março de 2020 a OMS declarou a pandemia da COVID-19 [52]. Em abril do mesmo ano, totalizavam-se 6 milhões de infectados e 370 mil óbitos [3]. Em dezembro de 2022, somam-se mais de 640 milhões de casos confirmados e 6,6 milhões de mortes [53].

Para compreendermos mais sobre o agente causador da COVID-19<sup>2</sup>, faremos um breve resumo sobre o SARS-CoV-2 e suas origens. Os Coronavírus são membros da família *Coronaviridae*, da ordem *Nidovirales*, onde quatro gêneros são conhecidos, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, *Deltacoronavirus*. Os *Alpha* e *Betacoronavirus* são classificados como HCoVs<sup>3</sup>, devido a propensão de infectar seres humanos, os outros dois gêneros infectam animais [54, 55, 50]. Esses vírus podem provocar doenças respiratórias ou entéricas e, em alguns casos, doenças neurológicas ou hepáticas. As infecções são transmitidas principalmente por via respiratória e vias fecal-oral [56].

Diante do exposto, o que as pandemias têm em comum, fora causar o óbito de parte das populações? Ao analisarmos, o ponto em comum entre as pandemias é a busca por um tratamento eficaz, que seja capaz de frear o crescente número de vítimas. Diante dessa problemática, a comunidade científica empenhou-se em buscar um tratamento para diminuir o elevado número de infectados e óbitos causado pelo vírus SARS-CoV-2.

Diversos estudos utilizando testes de fármacos em diferentes linhagens celulares de vírus da família Coronavírus, em específico o SARS-CoV-1 e MERS-CoV causadores de epidemias, em específico o SARS-CoV-1 e MERS-CoV, apontaram quatro medicamentos promissores contra o SARS-CoV-1 e MERS-CoV, sendo um destes a cloroquina

<sup>1</sup> Inicialmente denominado 2019-nCoV e renomeado pelo Comitê de Taxonomia de Vírus como Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus-2 (SARS-CoV-2) [50].

<sup>2</sup> Coronavirus Disease - 19, em tradução livre, Doença do coronavírus-19.

<sup>3</sup> Human Coronavirus, em tradução livre, Coronavírus humano.

(CLQ)[57]. Baseando-se em dados já obtidos e em novos estudos, Gautret e colaboradores [58] observaram que havia benefícios ao associar cloroquina e o antibiótico azitromicina no tratamento de pacientes infectados com COVID-19. Com isso, a cloroquina ficou em evidência devido a possibilidade de ser utilizada como meio de profilaxia e terapia contra a COVID-19 [9].

Diante dos estudos já realizados, a Health Commission of Guangdong Province (China) e a Food and Drug Administration (EUA) recomendaram o uso da CLQ numa dosagem de 500 mg duas vezes ao dia por aproximadamente 10 dias [18, 59, 60]. Porém, as pesquisas que embasaram o uso do difosfato de cloroquina eram frágeis, haja vista que o número de pacientes tratados era demasiadamente baixo (aproximadamente 20 pacientes), além da ausência de grupo controle, randomização etc. Diversos estudos foram realizados com o propósito de obter respostas relacionadas a eficiência da CLQ para o tratamento da COVID-19, dentre eles, estudos da Solidarity Trial Consortium, uma iniciativa da OMS, onde mais de 12 mil pacientes em diversos países foram tratados com a CLQ. O resultado apontou que o fármaco não tem eficácia contra o SARS-CoV-2, além de apresentar efeitos colaterais severos aos pacientes [61, 62].

Diante dos resultados das pesquisas científicas e da avaliação do Grupo de Desenvolvimento de Diretrizes, que é composto por cientistas, médicos, especialistas e pacientes, a Organização Mundial da Saúde publicou uma orientação dinâmica de Manejo Clínico da COVID-19, recomendando suspensão da cloroquina e de outros fármacos como tratamento ou profilaxia para COVID-19, além de apresentar alertas sobre o uso destes [18, 19].

Para contribuir com as pesquisas em prol de um tratamento eficiente, no Brasil [63] um estudo para analisar a possível eficiência da cloroquina foi realizado no Hospital e Pronto-Socorro Delphina Rinaldi Abdel Aziz, localizado na cidade de Manaus e dedicado para tratar pacientes com a COVID-19. Dividido em dois grupos, 81 pacientes infectados foram submetidos ao tratamento com a CLQ, sendo

- Grupo 1: altas dosagens, administrou-se 600 miligramas de cloroquina durante 10 dias, um total de 12 gramas;
- Grupo 2: baixas dosagens, administrou-se 450 miligramas de cloroquina (2x) no primeiro dia e 450 miligramas uma vez ao dia por mais 4 dias, um total de 2,7 gramas.

O cronograma para realização do estudo era de 28 dias, entretanto, foi interrompido no 13º dia devido ao índice de letalidade nos dois grupos, que foi 63,6% do grupo 1 e 36,4% do grupo 2, reforçando os resultados sobre a ineficácia do fármaco.

Apesar das recomendações da OMS em não utilizar a cloroquina devido a sua ineficiência contra COVID-19, no Brasil foi intensificada a produção e distribuição do fármaco. Como consequência, tornou-se um medicamento de uso controlado, haja vista que, o uso indiscriminado sem orientação ou prescrição médica fez esgotar os estoques em

vários locais, prejudicando pacientes que faziam uso para controle de doenças autoimunes [27, 28].

O uso indevido do fármaco gerou um alerta e associações médicas brasileiras emitiram diversas notas esclarecendo a utilização da CLQ e a não recomendação para tratar COVID-19. A Sociedade Brasileira de Cardiologia [30] e a de Imunologia [29] não recomendam o uso da CLQ por não haver evidências científicas de sua eficácia. A Sociedade de Infectologia recomenda de maneira urgente a suspensão do uso da CLQ e sustenta que o dinheiro público não seja usado para financiar um tratamento sem eficácia.

No Brasil, até junho de 2022, dados apontam que 32 milhões de pessoas foram infectadas e mais de 600 mil mortes foram confirmadas desde o início da pandemia em 2020. Vale ressaltar que, devido ao apagão de dados no site do Ministério da Saúde, o número real de infectados, óbitos e vacinados foi afetado [64].

## 2.2 Breve relato histórico sobre o fármaco Cloroquina

A busca por fármacos que possam prevenir ou tratar uma infecção causada por algum agente etiológico desconhecido é descrita ao longo da história. Diversos relatos podem ser encontrados em livros e artigos; um deles é sobre a febre intermitente e a busca por um tratamento eficaz. De acordo com pesquisadores, várias pessoas foram acometidas pela febre intermitente com sintomas como calafrios, diarreia, cefaleia e mialgia que causaram muitas vítimas durante décadas. O extrato de uma planta com fins medicinais era retirado da casca<sup>4</sup> e utilizada pelos índios Quechua dos Andes para tratar os sintomas causados pela febre [66, 67]. A febre intermitente hoje é conhecida como malária, uma doença febril infecciosa transmitida pelos protozoários do gênero *Plasmodium* [68].

Um dos gatilhos iniciais para o estudo da casca peruana foi a disseminação de sua eficácia contra a febre intermitente na Europa, realizada pela condessa de Chinchón, Francisca Henriquez de Kibera. A planta recebeu o nome de *Cinchona* em homenagem à condessa [48]. Outro fator visto como causador da propagação da *Cinchona* pela Europa foi a expansão da colonização Espanhola no Peru. Os extratos da *Cinchona* eram utilizados como medicamento fitoterápico na Europa [67].

Por ser um medicamento de origem natural, era necessário acelerar a produção dos extratos da *Cinchona* devido ao crescente número de infectados. Ao longo dos anos, cientistas buscaram meios de aprimorar a extração e até mesmo sintetizar as moléculas que compunham o extrato da casca dos Jesuítas. Em 1820 os químicos Pierre Pelletier e Jean Caventour detectaram a presença de dois alcaloides distintos nas cascas das *Cinchonas verde, vermelha e amarela*, e nomearam de cinchonina e quinina [66].

A malária disseminou-se por todos os continentes devido a vários fatores, dentre eles, as guerras, Primeira e Segunda Guerras Mundial. Uma das principais razões

<sup>4</sup> A casca foi denominada casca dos Jesuítas [65].

pelas quais vários cientistas tentavam sintetizar um fármaco antimalárico eficiente, foi a contaminação e óbito de centenas de soldados durante as guerras, com isso, inúmeros investimentos públicos e privados foram feitos [67, 68].

Após diversas tentativas, em 1934, o cientista Hans Andersag, químico da indústria Bayer sintetizou um antimalárico incolor, o Resochin. Porém, o fármaco foi considerado pelos pesquisadores alemães extremamente tóxico aos seres humanos e seu uso foi interrompido. Contudo, cientistas norte americanos retomaram as pesquisas para uso do fármaco através de diversos ensaios clínicos, constatando-se sua eficácia e segurança, sendo reintroduzido como medicamento antimalárico em 1947. Posteriormente, o Resochin foi nomeado de Cloroquina (CLQ) pelo programa antimalárico dos Estados Unidos [69].

## 2.3 Características físico-químicas

A rota de sintetização da cloroquina foi baseada na estrutura molecular da *Cinchona*, tido como um agente antimalárico natural e o azul de metileno, primeiro medicamento sintético usado para tratar pacientes com malária. Ao modificar a estrutura molecular da quinacrina, substituindo os anéis aromáticos de acridina por anéis de quinina, sintetizou-se o primeiro protótipo da cloroquina (Fig. 2.1), e a partir desse protótipo, Hans Andersag patenteou o grupo 4-aminoquinolina. Todos os fármacos desse grupo são usados no tratamento de pacientes com malária [70, 71].

A nomenclatura oficial de acordo com a IUPAC é 4-N-(7-chloroquinolin-4-yl)-1-N,1-N-diethylpentane-1,4-diamine (Número CAS: 54-05-7), com fórmula molecular  $C_{18}H_{26}ClN_3$  e peso molecular de 319,9 g/mol [72]. Apresenta-se como um cristal incolor, inodoro, com sabor amargo [73]. De acordo com O’Niel [74], a cloroquina é livremente solúvel em água, pouco solúvel em meios com pH neutro ou alcalino e estável ao calor em soluções com pH entre 4,0 e 6,5. É uma base diprótica fraca em pH fisiológico ( $\sim 7,4$ ), pode ser encontrada nas formas não-protonada (CLQ), mono-protonada (CLQ<sup>+</sup>) e di-protonada (CLQ<sup>++</sup>) [75]. Sendo uma droga anfífila catiônica (CAD<sup>5</sup>), liga-se a biomembranas, acumula-se em estruturas subcelulares ácidas e induz a fosfolipidose generalizada<sup>6</sup> [76].

A CLQ pode ser dividida em três partes: anéis aromáticos A e B (anéis de quinina) e cadeia lateral flexível. A molécula de cloro está presente na posição 7, enquanto o grupo amino está localizado na posição 4 do anel aromático B, como pode ser visto na Fig. (2.1) [78, 79].

<sup>5</sup> do inglês, Cationic amphiphilic drugs [76].

<sup>6</sup> Disfunção no armazenamento de lisossomos e tem como característica principal o acúmulo exacerbado de fosfolípidos em tecidos renais, hepáticos e pulmonares [77].

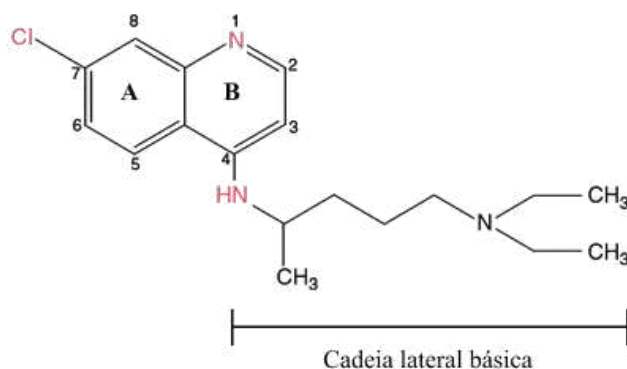


Figura 2.1 – Estrutura molecular da CLQ contendo a posição de cada átomo dos anéis aromáticos e a cadeia lateral básica formada pelo grupo amino. Imagem extraída de [79].

O fármaco é comercialmente disponível na forma comprimidos de difosfato de cloroquina ( $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$ ), com peso molecular de 515,85 g/mol. Sendo uma mistura racêmica, contendo 50% de cada enantiômero *R*-cloroquina e *S*-cloroquina [80]. Estes enantiômeros (Fig. 2.2) possuem diferentes propriedades farmacocinéticas e efeitos terapêuticos distintos tanto *in vivo* [81, 82] quanto *in vitro* [83].

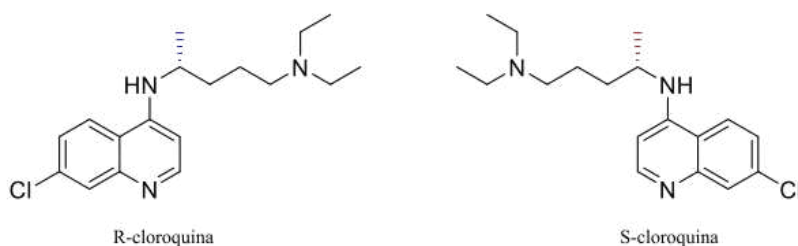


Figura 2.2 – Enantiômeros da cloroquina. Imagem adaptada [84].

Como citado na seção (2.1), a CLQ não apresentou eficácia *in vivo*, apesar de reduzir drasticamente a replicação do SARS-CoV-2 *in vitro* [9]. Surge então uma questão: por qual motivo a CLQ não apresentou eficácia *in vivo*? De acordo com Suhail [85], a principal razão é a forma enantiomérica da CLQ, haja vista que, cada enantiômero apresenta sua própria atividade biológica com mecanismos diferentes, de maneira que, o mecanismo de ação da CLQ para bloquear o SARS-CoV-2 em humanos tornou-se indefinido.

Um estudo recente indica a possibilidade do uso dos enantiômeros como alternativa para tratar pacientes com COVID-19, sendo o isômero *S*-cloroquina mais eficiente para tratar infecções virais [84]. Diante das implicações clínicas favoráveis que os enantiômeros da CLQ podem ter, pesquisadores apontam que interruptores quirais<sup>7</sup> devem ser desenvolvidos para melhor aproveitamento dos isômeros [87].

<sup>7</sup> Fármaco quiral aprovado e comercializado como mistura racêmica, mas foram redesenvolvidos como um único enantiômero [86].

## 2.4 Cloroquina vs malária

Os protozoários são parasitas que estão entre os patógenos mais comuns do mundo, são reconhecidos como agentes causadores de várias doenças tropicais em humanos e animais [88]. Malária, amebíase, toxoplasmose, leishmaniose são algumas doenças causadas por estes parasitas, dentre estas, a mais letal em algumas partes do mundo é a malária. Diferentes espécies de parasitas como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie* são os maiores vetores de transmissão da malária, destes, dois parasitas (*P. falciparum* e *P. vivax*) são os mais comuns e letais do mundo, com regiões endêmicas causadas pelo *P. falciparum* em 88 países, enquanto o *P. vivax* causa endemias em 58 países, e, adicionalmente, 47 países possuem regiões endêmicas para ambos os parasitas [89].

A cloroquina é um esquizotocida sanguíneo, concentra-se principalmente nos vacúolos do parasito. Por ser um fármaco com base diprótica fraca, não possui carga elétrica em pH neutro, desse modo, distribui-se livremente para o lisossomo do protozoário. Os lisossomos são organelas com pH ácido (entre 4,8 e 5,4), e em meios ácidos, a molécula de CLQ torna-se protonada, impermeável à membrana, provocando assim, uma reação ácido-base que aumenta o pH dentro dessa organela, reduzindo a fagocitose [78, 90]. A principal ação antimalárica da CLQ é proveniente da inibição da enzima heme-polimerase<sup>8</sup> [92].

Os antimaláricos são específicos para cada ciclo<sup>9</sup> de vida do *Plasmodium*, [32]. Recomendada para quimioprofilaxia e tratamento da infecção causada pelos protozoários *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. malarie*, a CLQ age rapidamente após o contágio, controla os sintomas clínicos e o número de parasitas no sangue. Grande parte dos pacientes não apresenta febre entre as 24 e 48 horas após a administração das doses terapêuticas. As doses terapêuticas são indicadas por 3 dias consecutivos, devendo ser observada a faixa etária e massa corporal do paciente, e assim, garantir a eficácia e baixa toxicidade durante o tratamento. Vale ressaltar que o fármaco não evita recidivas da infecção causada pelo *P. vivax* [93, 94].

Com a disseminação da malária por todos os continentes, a OMS adotou o Programa de Erradicação da Malária entre os anos de 1955 e 1969 [95]. Apesar das campanhas, o objetivo não foi inteiramente alcançado, haja vista que, em alguns países, como o Brasil, não ocorreu a eliminação total da doença [96]. Estima-se que mais de 400 mil pessoas em regiões endêmicas morrem por ano em decorrência da malária, destes, crianças

<sup>8</sup> Nos eritrócitos, o parasita deteriora 70% das hemoglobinas, por consequência libera globina (fonte de alimento do protozoário) e o heme (complexo ferro-porfirina). O complexo oriundo das hemoglobinas é nocivo para o parasita, de modo que, ao polimerizar o heme, com auxílio da enzima heme-polimerase, transforma-o em pigmento malarial (hemozoína) [91].

<sup>9</sup> A cloroquina tem atividade esquizotocida para todas as espécies de *Plasmodium* e gametocida para as espécies *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale*, sendo eficiente contra as formas eritrocíticas das três últimas espécies, respectivamente [93].

abaixo dos 5 anos de idade é o grupo mais vulnerável, somando 96% de óbitos [97].

Além da malária, a CLQ é amplamente empregada para o tratamento de condições inflamatórias de etiologia autoimune como artrite reumatoide, lúpus eritematoso cutâneo, lúpus eritematoso sistêmico [83], sarcoidose, porfria cutânea tarda, entre outras doenças [54, 78]. Entretanto, em pacientes que fazem controle de doenças autoimunes, como lúpus, por exemplo, o uso do medicamento é feito por um período mais prolongado, a depender da dose-reposta de cada paciente, sob orientação e acompanhamento de um médico especialista [98].

Por sua relevância no tratamento contra malária, estudos com o objetivo de analisar as atividades antivirais, bacterianas, antifúngicas da CLQ são realizados, visto que muitas infecções causadas por esses agentes patogênicos necessitam de meio ácido para que haja uma infecção bem-sucedida [99, 78].

Várias pesquisas contra patógenos virais podem ser encontradas, como HIV<sup>10</sup>, Dengue, Influenza, Ebola, Sars-CoV, Mers-CoV, Zika, Chikungunya [6, 101, 36]; infecções causadas pelos fungos *Aspergillus fumigatus*, *A. Nidulans* e *Paracoccidioides brasiliensis*, e outras patologias como estomatite ulcerativa crônica, erupção polimórfica de luz, hepatite autoimune, e neoplasias malignas [78].

## 2.5 Hidroxicloroquina

Em 1946, os químicos Alexander Surrey e Henry Hammer sintetizaram a hidroxicloroquina (HCLQ) (2.3) ao inserir um grupamento hidroxila na estrutura molecular da CLQ, com o objetivo de reduzir seus níveis de toxicidade da mesma [102, 103]. Um estudo publicado em 1947 comprovou a redução em 40% da toxicidade, porém, a HCLQ só foi introduzida como fármaco de uso antimalárico em 1955, sendo uma alternativa segura e menos tóxica em modelos animais [33, 79].

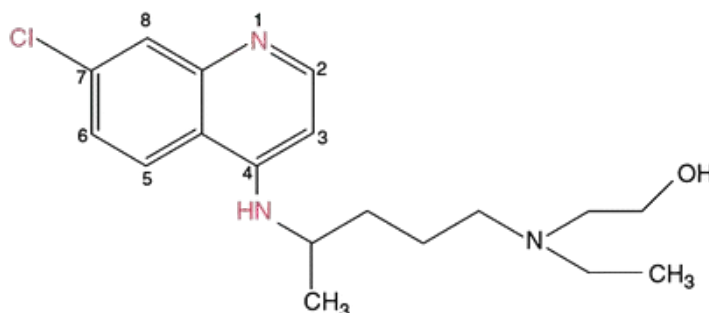


Figura 2.3 – Estrutura molecular da hidroxicloroquina [79].

Os efeitos fisiológicos, a farmacocinética e a metabolização da cloroquina e da hidroxicloroquina são semelhantes [104]. Sua nomenclatura oficial de acordo com a IUPAC

<sup>10</sup> Vírus da imunodeficiência humana (Human Immunodeficiency Virus) [100].

é 2-[4-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]pentyl-ethylamino]ethanol (Número CAS:118-42-3), com fórmula molecular  $C_{18}H_{26}ClN_3O$  e peso molecular de 335.9 g/mol. É comercialmente disponível na forma de comprimidos de sulfato de hidroxicloroquina ( $C_{18}H_{28}ClN_3O_5S$ ), com peso molecular de 434 g/mol [105].

Assim como a cloroquina, a hidroxicloroquina é amplamente empregada no tratamento de doenças autoimunes e há também diversas pesquisas relacionadas a seu uso no combate a infecções virais [106, 79].

# III Ácido desoxirribonucleico

## 3.1 O quebra-cabeças: a descoberta de Miescher

Em 1868 Friedrich Miescher-His notou o precipitado de uma substância desconhecida durante experimentos para analisar a composição química dos leucócitos. As propriedades dessa substância durante o processo de isolamento e resistência à digestão de proteases indicavam que não era uma proteína ou lipídio. Após examinar sua composição elementar, observou que diferente das proteínas, a substância continha grandes quantidades de fósforo. Por ter isolado do núcleo celular, Miescher nomeou de nucleína, que consistia em uma combinação salina com uma base nitrogenada, além de ser fortemente ácida [107].

Miescher descartou a possibilidade da nucleína ser a responsável pelo transporte das informações hereditárias. Apesar de admitir diferenças na estrutura química das nucleínas após analisar os ovos e espermatozoides de vários animais, Miescher acreditava ser improvável a mesma substância dar origem a diferentes espécies animais, pois haveria uma limitação da diversidade [108].

Para obter mais informações referentes a nucleína, como sua composição e funções, diversas pesquisas relevantes foram realizadas. Richard Altmann nomeou a substância encontrada por Miescher de ácido nucleico, Albrecht Kossel identificou os blocos responsáveis pela construção da nucleína – as bases purinas e pirimidinas, um açúcar e ácido fosfórico, o então, ácido desoxirribonucleico (DNA [108]. Erwin Chargaff descobriu que a composição das bases nitrogenadas do DNA variavam entre as espécies, porém, dentro de cada espécie, as bases estão presentes em proporções fixas, a mesma razão de adenina e timina ( $A \cdot T$ ), assim como, a mesma razão de citosina e guanina ( $C \cdot G$  [109].

Em 1952 [110], Alfred Hershey e Martha Casey após experimentos com o bacteriófago T2, comprovaram que o DNA é um material genético. Reafirmando que o ácido desoxirribonucleico é de fato o portador das informações hereditárias. Após 75 anos da descoberta de Miescher, análises dos experimentos de difração de raios-X realizadas por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins contribuíram com a elucidação da estrutura do DNA feita por Francis Crick e James Watson [111] (Fig. 3.1).

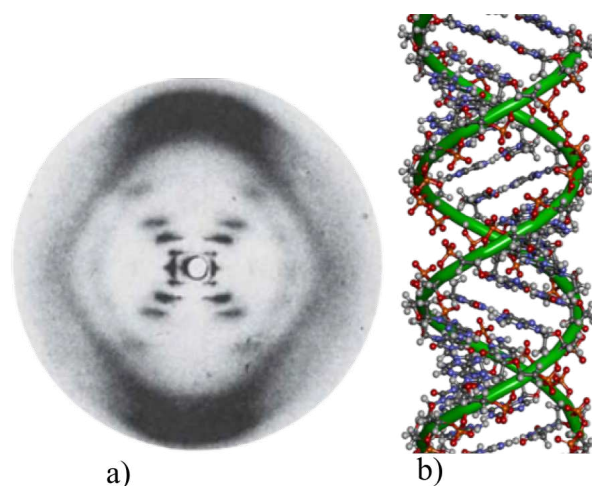


Figura 3.1 – a) Imagem de raios-X que permitiu a elucidação da estrutura do DNA, confirmando assim a forma de hélice pelo padrão dos reflexos dos raios-X no centro da fotografia. b) Modelo de preenchimento da dupla hélice, as bases projetam-se para o lado interno e na parte externa está o esqueleto de açúcar-fosfato [112].

A elucidação da estrutura do ácido desoxirribonucleico e seu mecanismo de funcionamento foi a chave para que pesquisadores pudessem sequenciar e manipular o DNA, pois muitos questionamentos ainda estavam sem respostas. Na busca por explicações, em 1990 deu-se início ao Projeto Genoma Humano, tendo com objetivo principal identificar todos os genes humanos. Em 2003 o projeto foi encerrado e teve como resultado o sequenciamento dos genomas de diferentes grupos étnicos constituindo assim um genoma-referência [113]. Além disso, mostrou que a sequência do genoma humano é 99,9% semelhante em todos os seres humanos, fato que Miescher havia questionado durante suas pesquisas com várias espécies de animais [114].

## 3.2 Estrutura e conformação da molécula

Uma das descobertas científicas mais importantes do século XX foi a elucidação da estrutura do DNA por Watson e Crick. O modelo proposto é formado por uma estrutura com duas cadeias/ou fitas polinucleotídicas antiparalelas enroladas ao redor do mesmo eixo na forma de uma dupla-hélice. Essas cadeias estão interligadas através de bases púricas e pirimídicas [115]. Os planos das bases nitrogenadas são perpendiculares ao eixo da fibra, eles estão conectados em pares, onde, uma única base de uma cadeia está interligada a base da outra cadeia através de ligações de hidrogênio, de modo que ficam lado a lado [111]. Além de respeitar as propriedades físicas e químicas do DNA, revelou também como esta molécula pode cumprir funções biológicas [116].

### 3.2.1 Estrutura química do DNA

O ácido desoxirribonucleico é um biopolímero longo, semelhante a um fio, composto por uma matriz linear de monômeros (meros – unidades de repetição) denominados nucleotídeos. O nucleotídeo é formado por três elementos característicos: uma base heterocíclica nitrogenada, uma pentose (açúcar 2-desoxirribose), um ou mais fosfatos ( $PO_4^-$ ) (Fig. 3.2) [116, 112].

As bases são grupos planares, consistindo em um ou dois anéis aromáticos, de difícil dissolução em água. Existem quatro tipos de bases diferentes, Adenina (A) e Guanina (G) são púricas, Timina (T) e Citosina (C) são pirimídicas (Fig. 3.2.a). Todos os quatro tipos tem caráter químico de uma base, ou seja, são aceptores de prótons [117].

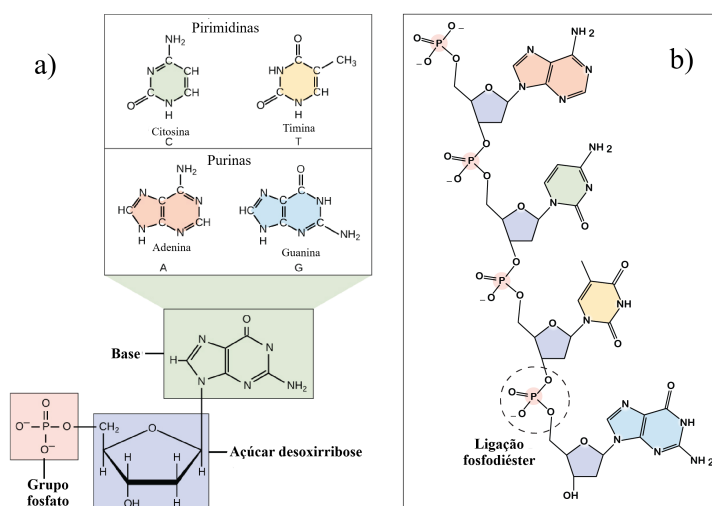


Figura 3.2 – Estrutura química dos nucleotídeos. a) Um único nucleotídeo é constituído por: grupo fosfato ( $PO_4^-$ ), açúcar desoxirribose e um par de bases nitrogenadas, sendo as bases formadas por pirimidinas que são Timina (T) e Citosina (C) e as purinas que são Adeninas (A) e Guaninas (G). b) As pentoses (açúcar desoxirribose) são ligadas entre si através de dos grupos fosfatos e são denominadas ligações fosfodiéster. As figuras foram adaptadas do livro Biology disponível em [OpenStax](https://openstax.org).

De acordo com o modelo de Watson e Crick, os pares de bases são formados a partir da combinação de adenina e timina ( $A \cdot T$ ) ligadas por uma dupla ligação de hidrogênio e, guanina e citosina ( $G \cdot C$ ) ligadas por uma tripla ligação de hidrogênio (Fig. 3.3.a) [117]. As cadeias de açúcar-fosfato têm uma direcionalidade: começam com uma desoxirribose (com hidroxila livre) na extremidade 3' e com um fosfato livre na extremidade 5' (Fig. 3.3.b) [118].

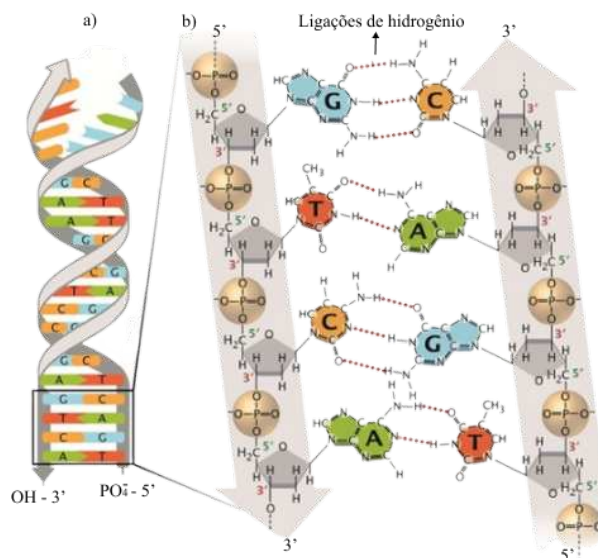


Figura 3.3 – a) Estrutura helicoidal do DNA. b) Os pares de bases são interligados através de ligações de hidrogênio, sendo adenina e timina ligadas por uma dupla ligação de hidrogênio, guanina e citosina por uma tripla ligação de hidrogênio. O esqueleto açúcar-fosfato tem uma direcionalidade, na extremidade 5' possui um grupo fosfato e na extremidade 3' possui uma hidroxila [119].

### 3.2.2 Ligações de Hidrogênio e Interações de empilhamento

Ligações de hidrogênio são interações eletrostáticas fracas que se formam entre um átomo eletronegativo (aceptor de hidrogênio) e um átomo de hidrogênio associado a um átomo eletronegativo (doador de hidrogênio) em uma mesma molécula [112]. Possui enorme importância em processos biológicos e químicos, pois permite a construção de proteínas complexas, ácidos nucleicos, além de ser uma característica essencial da dupla-hélice, visto que contribui com o pareamento entre as bases e a estabilidade termodinâmica das moléculas. Outra característica importante das ligações de hidrogênio (Fig. 3.3) é sua alta direcionalidade, uma vez que, o átomo de hidrogênio aponta diretamente para o átomo aceitor e conseqüentemente, favorece a especificidade do pareamento entre as bases [118].

Outra característica relevante relacionada à estrutura química do DNA são as interações de empilhamento  $\pi$  (Fig. 3.4). Elas controlam diversos fenômenos como interações de fármacos entre os pares de bases, o empacotamento de moléculas em cristais, estrutura terciária das proteínas, sistemas host-guest etc [120]. Em sistemas biológicos, os resíduos aromáticos tendem a ter interações energeticamente favoráveis. No caso da estrutura química do ácido desoxirribonucleico, o empilhamento dos pares de base determina suas propriedades, realiza o reconhecimento de proteínas reguladoras, além de contribuir diretamente para a estabilidade da dupla-hélice e tornar o meio mais hidrofóbico [121].

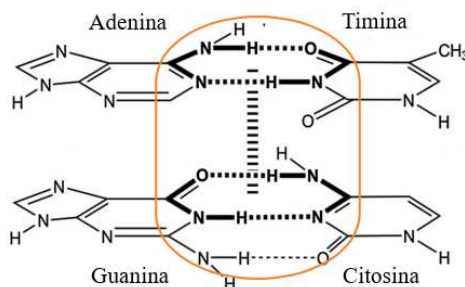


Figura 3.4 – Interação de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  entre os pares de base demarcado em laranja [122].

### 3.2.3 Estrutura física do DNA

A estrutura física do DNA pode ser dividida em duas partes, de maneira que: o esqueleto – é hidrofílico e a outra parte do DNA – as bases – são hidrofóbicas (Fig. 3.5) [117]. Este caráter anfifílico e a flexibilidade do esqueleto de açúcar-fosfato formam a estrutura da dupla hélice, onde, as bases nitrogenadas estão localizadas na parte interna da molécula, enquanto o esqueleto açúcar-fosfato na parte externa [123].

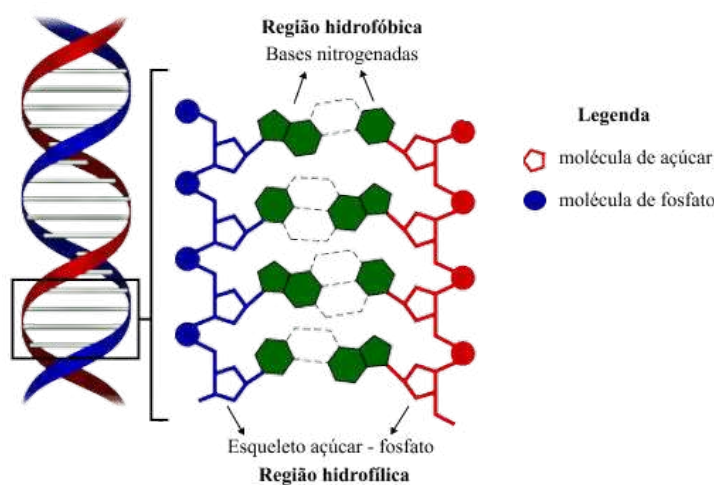


Figura 3.5 – Estrutura física do DNA [124].

O esqueleto de açúcar-fosfato possui duas características físicas importantes: alta solubilidade e flexibilidade. A alta solubilidade é consequência da dissociação dos grupos fosfatos na água em níveis de acidez fisiológica e de possuir carga negativa devido as ligações fosfodiéster. A flexibilidade é consequência da rotação livre das moléculas de fósforo e oxigênio ( $P - O$ ) em torno do tetraedro ( $PO_4^-$ ), e rotação dos anéis de desoxirribose ao longo do esqueleto em torno do seu eixo de junção. Dessa maneira, o DNA pode ser descrito como uma cadeia livremente articulada [117].

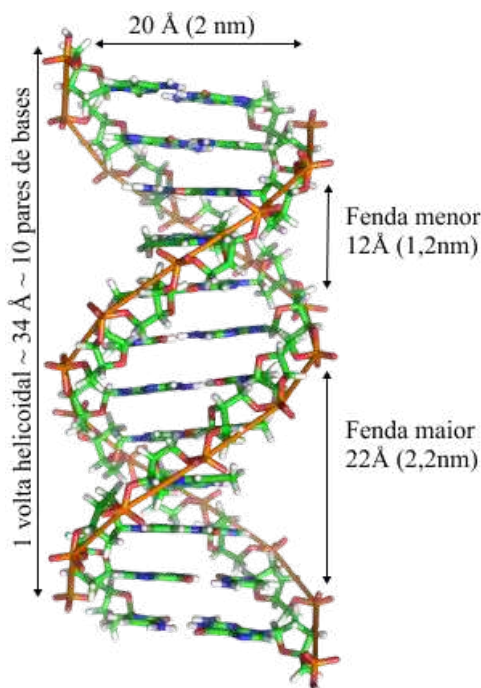


Figura 3.6 – O diâmetro da hélice é de 20 Å, as bases adjacentes estão separadas por 3,4 Å no eixo e rotacionadas 36° uma em relação a outra. Dessa maneira, cada volta helicoidal possui 10 nucleotídeos, o que corresponde a um comprimento de 34 Å [118].

Por ter uma estrutura helicoidal, ao estirar a molécula de DNA é possível observar duas fendas, nomeadas de fenda maior e fenda menor, e, como o próprio nome diz, diferem entre si devido ao tamanho e profundidade (Fig. 3.6). As duas fendas são consequências da geometria helicoidal devido ao pareamento entre as bases [118].

Os parâmetros aqui descritos sobre a dupla hélice não são constantes, eles dependem da umidade relativa do ambiente, das espécies de íons presentes e da concentração de cloreto de sódio no meio. Dessa maneira, existem vários tipos/ou formas estruturais possíveis da dupla hélice (Fig. 3.7). Essas estruturas são classificadas em três principais famílias: Famílias A, B e Z [125].

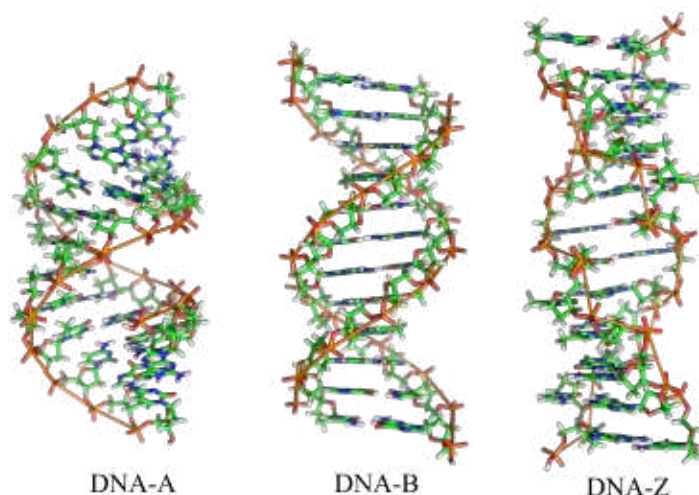


Figura 3.7 – Formas do DNA [125].

Tabela 3.1 – Características estruturais das formas A, B e Z do DNA

Formas	Forma A	Forma B	Forma Z
Diâmetro	$\sim 26 \text{ \AA}$	$\sim 20 \text{ \AA}$	$\sim 18 \text{ \AA}$
pb por volta helicoidal	11.6	10.5	11.6
Tamanho da hélice por pb	$2.6 \text{ \AA}$	$3.4 \text{ \AA}$	$3.7 \text{ \AA}$
Densidade de carga	$0.77e^-/\text{\AA}$	$0.59e^-/\text{\AA}$	$0.54e^-/\text{\AA}$
Sentido helicoidal	Direita	Direita	Esquerda

A família B, com pares de bases quase perpendiculares ao eixo da hélice, uma fenda maior e uma menor, possui a estrutura mais estável em condições fisiológicas [125]. A Família A, possui fenda maior e menor, e os pares de base não são perpendiculares ao eixo da hélice. Por último, a família Z, tem a hélice rotacionada para a esquerda, diferente das outras famílias, que são rotacionadas para a direita, como pode ser visto na Fig. (3.7). As formas do DNA possuem características estruturais distintas como pode ser observado na Tabela (3.1) [123, 125].

### 3.3 Lambda-DNA

O DNA utilizado neste trabalho é proveniente do bacteriófago  $\lambda$ , um tipo vírus que infecta a bactéria *Escherichia coli* [118]. Com cerca de 48 mil pares de base, comprimento de contorno ( $L$ ) em torno de 16,4 micrometros e comprimento de persistência ( $A$ ) próximo de 50 nanômetros [45, 126]. Por ter esses aspectos, ele é adequado para ser usado nos experimentos de pinça óptica. Vale ressaltar que, os parâmetros mecânicos aqui citados, serão explicados nas próximas seções.

## IV Mecânica dos Polímeros semiflexíveis

Por definição, polímeros são macromoléculas constituídas por muitas (centenas) unidades de repetição (meros)/monômeros, interligadas por ligações covalentes. As cadeias poliméricas podem ser caracterizadas como flexível, semiflexível e rígida. Um tipo de polímero semiflexível importante é a molécula de DNA. O ácido desoxirribonucleico é uma macromolécula biopolimérica e suas unidades monoméricas são os nucleotídeos [127], especificamente, é um copolímero randômico, ou seja, é formado por mais de um tipo de monômero [41].

Como citado na subseção (3.2.3), o DNA possui propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas, na qual a região hidrofóbica é consequência do empilhamento  $\pi$  e da estrutura planar dos anéis aromáticos das bases nitrogenadas, o que torna a parte interna da molécula mais rígida [116]. E a região hidrofílica é resultante da estrutura do esqueleto de açúcar-fosfato e confere a molécula uma característica externa mais flexível. Devido a esses seus aspectos, o DNA é considerado um polímero semiflexível [117, 125, 128].

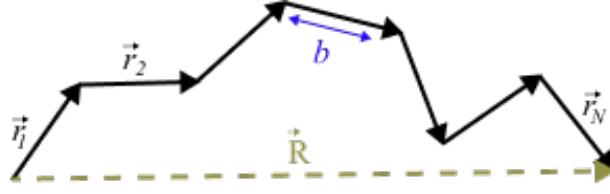
O estudo das propriedades mecânicas de polímeros semiflexíveis tem grande importância, pois viabiliza a conexão com propriedades físico-químicas que são fundamentais para compreensão de processos intracelulares, como replicação, transcrição etc. Esses processos são conduzidos por proteínas reguladoras capazes de expressar ou silenciar um gene, e mediados pela interação DNA-ligantes que potencialmente modifica as propriedades mecânicas da molécula [116].

Nas seções seguintes serão apresentados modelos usados para o estudo de polímeros semiflexíveis.

### 4.1 Cadeia livremente articulada (FJC)

Diversos modelos descrevem o comportamento de cadeias ideais, onde assume-se que não há interação entre os monômeros a longas distâncias. Um dos modelos que podemos citar é o *freely jointed chain* (FJC)<sup>1</sup> [129]. A configuração de um polímero no modelo FJC pode ser representada como um encadeamento linear de  $N$  segmentos, separados por um comprimento fixo  $b$  [130].

<sup>1</sup> Em tradução livre, Cadeia livremente articulada.

Figura 4.1 – Cadeia ideal, com  $N$  segmentos.

Seguimos com uma análise físico-estatística de um polímero FJC em equilíbrio termodinâmico com um meio altamente viscoso (de forma que podemos negligenciar sua energia cinética) [128]. Se uma força  $\vec{f} = (0, 0, f)$ , atuando no eixo  $z$ , exerce trabalho  $W = \vec{f} \cdot \vec{R}$  sobre a cadeia polimérica, levando-a a uma conformação  $\vec{R} = b \sum_{i=1}^N \hat{t}_i$ , o polímero possuirá energia potencial:

$$\begin{aligned} E_p(f, \{\theta_i\}) &= -\vec{f} \cdot \vec{R} \\ &= -bf \sum_{i=1}^N \cos(\theta_i). \end{aligned} \quad (4.1)$$

Para obtermos as propriedades termodinâmicas do polímero, calculamos a função de partição  $Z$  no ensemble canônico [131]. Usando-se coordenadas esféricas, podemos somar as contribuições de todas as configurações possíveis à função de partição a partir da Eq. (4.1) como segue:

$$\begin{aligned} Z &= \prod_{i=1}^N \int_0^{2\pi} d\phi_i \int_0^\pi d\theta_i \sin(\theta_i) e^{-\frac{E_p(f, \{\theta_j\})}{k_B T}} \\ &= \prod_{i=1}^N \int_0^{2\pi} d\phi_i \int_0^\pi d\theta_i \sin(\theta_i) e^{\frac{bf}{k_B T} \sum_{j=1}^N \cos(\theta_j)} \\ &= \left( \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^\pi d\theta \sin(\theta) e^{\frac{bf}{k_B T} \cos(\theta)} \right)^N, \end{aligned} \quad (4.2)$$

onde usamos a Eq. (4.1) e o fato de cada par de integrais em  $\phi$  e  $\theta$  ser independente dos demais. A integral em  $\phi$  é simplesmente  $2\pi$ . Por outro lado, a integral em  $\theta$  pode ser facilmente resolvida se considerarmos a substituição:

$$\omega = \frac{bf}{k_B T} \cos(\theta), \quad (4.3)$$

resultando em:

$$Z = \left( \frac{4\pi k_B T}{bf} \sinh\left(\frac{bf}{k_B T}\right) \right)^N. \quad (4.4)$$

Agora, temos que:

$$\begin{aligned}
\langle R_z \rangle &= \int d^N \Omega R_z \frac{e^{-\frac{E_p(f, \{\theta_i\})}{k_B T}}}{Z} \\
&= k_B T \frac{\partial}{\partial f} \ln(Z),
\end{aligned} \tag{4.5}$$

onde  $d^N \Omega$  é um elemento infinitesimal de ângulo sólido, dado por  $d^N \Omega = \prod_{i=1}^N d\phi_i d\text{sen}(\theta_i)$ . Usando-se a definição dada pela Eq. (4.5), junto com a expressão da função de partição representada pela Eq. (4.4), temos:

$$\langle R_z \rangle = Nb \left( \text{cotgh} \left( \frac{bf}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{bf} \right), \tag{4.6}$$

que é a Equação de Langevin [131, 128], relacionando a força aplicada à ponta livre da cadeia polimérica e seu estiramento médio.

Na Eq. (4.6), podemos fazer previsões para casos extremos, como o limite de baixas e altas forças. No limite de baixas forças, consideremos que  $f$  seja tal que  $\frac{bf}{k_B T} \ll 1$ . Considerando-se a expansão  $\text{cotgh}(x) = \frac{1}{x} + \frac{x}{3} + \dots \approx \frac{1}{x} + \frac{x}{3}$ , com  $x \equiv \frac{bf}{k_B T}$ , resulta que a força aplicada e o estiramento médio obedecem à equação:

$$\begin{aligned}
f &= \frac{3k_B T}{Nb^2} \langle R_z \rangle \\
&= \frac{3k_B T}{\langle R^2 \rangle} \langle R_z \rangle,
\end{aligned} \tag{4.7}$$

que é consistente com a Eq. (4.13), que será obtida na seção (4.1.1), com  $\langle R^2 \rangle = Nb^2$ .

No limite de altas forças,  $\frac{bf}{k_B T} \gg 1$ , temos  $\text{cotgh} \left( \frac{bf}{k_B T} \right) \approx 1$ , resultando em:

$$\begin{aligned}
\langle R_z \rangle &= Nb - N \frac{k_B T}{f} \\
&= L - N \frac{k_B T}{f},
\end{aligned} \tag{4.8}$$

em que  $L$  é o comprimento de contorno da cadeia polimérica, representando uma saturação da distância de ponta a ponta, o que é consistente com o fato de as ligações possuírem comprimento constante. Em suma, **comprimento de contorno** ( $L$ ) é a distância de ponta a ponta da cadeia polimérica quando esta encontra-se na conformação retilínea.

#### 4.1.1 Analogia entre os modelos de passeio aleatório e FJC

Nesta subseção, devemos obter a expressão da força de estiramento  $\vec{f}$  de um polímero no modelo FJC em analogia com o modelo de passeio aleatório, sob a condição

de que a distância de ponta a ponta seja muito menor que o comprimento de contorno,  $|\vec{R}| \ll L$ . Conforme demonstrado no Apêndice (1.2), a probabilidade de que uma configuração possua deslocamento de ponta a ponta  $\vec{R}$  dado pela Eq. (1.20), quando o número de dimensões espaciais for  $n_D = 3$ :

$$P_3(N, \vec{R}) = \sqrt{\frac{3}{2\pi\langle\vec{R}^2\rangle}} e^{-\frac{3\vec{R}^2}{2\langle\vec{R}^2\rangle}}. \quad (4.9)$$

Podemos fazer uma conexão entre a probabilidade  $P_N(\vec{R})$  e a entropia de Boltzmann  $S$ , se observarmos que  $P_N(\vec{R})$  é proporcional ao número de configurações  $\Omega(N, \vec{R})$  como segue [130]:

$$P_N(\vec{R}) = \frac{\Omega(N, \vec{R})}{\int d^3\vec{R}\Omega(N, \vec{R})}. \quad (4.10)$$

Introduzindo-se  $\Omega(N, \vec{R})$  na definição da entropia  $S$ , temos:

$$S(N, \vec{R}) = k_B \ln(\Omega(N, \vec{R})) = k_B \ln\left(P_N(\vec{R}) \int d^3\vec{R}\Omega(N, \vec{R})\right). \quad (4.11)$$

Com o uso da Eq. (4.9), temos:

$$S(N, \vec{R}) = -\frac{3}{2}k_B \frac{\vec{R}^2}{\langle\vec{R}^2\rangle} + S(N, \vec{0}), \quad (4.12)$$

onde  $S(N, \vec{0})$  engloba termos sem dependência explícita em  $\vec{R}$ . Aplicando a transformação de Legendre, obtemos a energia livre de Helmholtz  $F(N, \vec{R}) = U(N) - TS(N, \vec{R})$ , onde levamos em conta explicitamente o fato da energia interna ser  $U \equiv U(N)$ , devido à ausência de interações entre monômeros vizinhos [130].

Assim obtemos a equação,

$$\begin{aligned} \langle\vec{f}\rangle &= \sum_{i=1}^3 \frac{\partial}{\partial R_i} F(N, \vec{R}) \hat{R}_i = -T \sum_{i=1}^3 \frac{\partial}{\partial R_i} S(N, \vec{R}) \hat{R}_i \\ &= \frac{3k_B T}{\langle\vec{R}^2\rangle} \langle\vec{R}\rangle \end{aligned} \quad (4.13)$$

A Eq. (4.13) expressa a força média necessária para manter-se a distância de ponta a ponta média  $\langle\vec{R}\rangle$  de uma cadeia polimérica no modelo FJC para baixas forças, como na Eq. (4.7). Comparando-se o modelo de passeio aleatório com o FJC, a distância de ponta a ponta média representa o deslocamento médio de uma partícula em movimento aleatório.

## 4.2 Modelo Kratky-Porod

Os modelos de cadeias poliméricas discutidos nas seções (4.1) e (4.1.1) desconsideraram a energia de curvatura necessária para vencer a rigidez intrínseca dos polímeros, em específico dos polímeros biológicos [41]. Nesta subseção iremos discutir o Modelo de Kratky-Porod, este modelo leva em consideração a energia requerida para realizar uma pequena deformação em cadeia polimérica.

Imaginemos uma cadeia polimérica com  $N$  monômeros de comprimento  $b$ , fixo, cujas posições sejam:

$$\vec{r}_0, \vec{r}_1, \dots, \vec{r}_i, \dots, \vec{r}_{N-1}, \vec{r}_N \quad (4.14)$$

e distâncias entre primeiros vizinhos:

$$\vec{t}_1 = \vec{r}_1 - \vec{r}_0, \dots, \vec{t}_i = \vec{r}_i - \vec{r}_{i-1}, \dots, \vec{t}_N = \vec{r}_N - \vec{r}_{N-1} \quad (4.15)$$

Agora, imaginemos que, sob ação de uma força  $\vec{F}$  na direção  $\vec{x}$  (Fig. 4.2) e com seus monômeros interagindo elasticamente com seus primeiros vizinhos apenas, a cadeia polimérica possua energia dada por:

$$E\{\vec{t}\} = \sum_{i=1}^3 \frac{\kappa_0}{2} |\hat{t}_i - \hat{t}_{i-1}|^2 - \vec{F} \sum_{i=1}^N \vec{t}_i \quad (4.16)$$

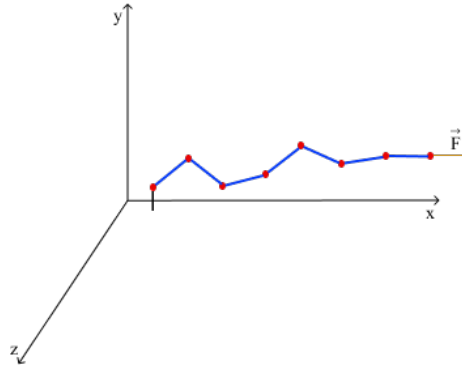


Figura 4.2 – Força aplicada em uma cadeia polimérica.

A interpretação do primeiro termo da Eq. (4.16) é a de que vetores vizinhos paralelos possuem custo energético nulo nessa conformação, enquanto vetores antiparalelos possuem custo energético máximo  $2\kappa_0$ .

Lembrando-se que  $\vec{t} = b\hat{t}$ , temos:

$$E\{\vec{t}\} = \sum_{i=1}^3 \frac{\kappa_0}{2} |\hat{t}_i - \hat{t}_{i-1}|^2 - \vec{F} \sum_{i=1}^N \hat{t}_i b \quad (4.17)$$

Se escrevermos a função de partição para a Eq. (4.17) com  $\|\vec{F}\| = 0$ , temos:

$$Z = \prod_{i=1}^{N-1} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \exp \{ \beta \kappa_0 \cos \gamma_i \} \text{sen}(\gamma_i) d\gamma_i d\phi_i, \quad (4.18)$$

onde identificamos  $\gamma_i = \theta_{i+1} - \theta_i$  e  $\cos(\gamma_i) = \hat{t}_{i+1} \cdot \hat{t}_i$ .

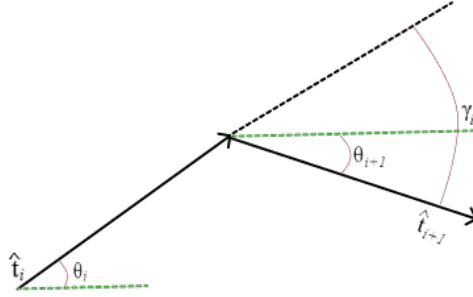


Figura 4.3 – Ângulos entre os segmentos da cadeia polimérica.

Assim,

$$\begin{aligned} Z &= (2\pi)^{N-1} \left[ \int d\gamma \text{sen} \gamma \exp(\beta \kappa_0 \cos \gamma) \right]^{N-1} \\ &= \left( \frac{4\pi}{\beta \kappa_0} \text{senh}(\beta \kappa_0) \right)^{N-1} \end{aligned} \quad (4.19)$$

Onde podemos identificar

$$Z_\gamma = \frac{4\pi}{\beta \kappa_0} \text{senh}(\beta \kappa_0). \quad (4.20)$$

Da Eq. (4.18) vemos que os ângulos  $\gamma$  são distribuídos de forma independente.

Uma grandeza importante é a função de correlação  $\langle \hat{t}_i \cdot \hat{t}_{i+s} \rangle$ , a qual, visto que os ângulos são estatisticamente independentes, é dada por  $\langle \cos \gamma \rangle^s$ , vide Eq. (2.5) no Apêndice B. Da função de partição dada pela Eq. (4.20), temos  $\langle \cos \gamma \rangle = \frac{\partial}{\partial \beta \kappa_0} Z_\gamma$ . De maneira que,

$$\begin{aligned} \langle \hat{t}_i \cdot \hat{t}_{i+s} \rangle &= \left( \text{cotgh}(\beta \kappa_0) - \frac{1}{\beta \kappa_0} \right)^s \\ &= \exp \left( \frac{-bs}{A} \right), \end{aligned} \quad (4.21)$$

em que

$$A = \frac{b}{\left| \ln \left( \text{cotgh}(\beta \kappa_0) - \frac{1}{\beta \kappa_0} \right) \right|} \quad (4.22)$$

No limite de  $\beta \kappa_0 \gg 1$ ,  $A \approx b\beta \kappa_0$ , mostrando que o comprimento de persistência ( $A$ ) é proporcional ao parâmetro associado à rigidez flexural da cadeia polimérica. O

comprimento de persistência é o principal resultado do modelo de Kratky-Porod. Vale ressaltar que o comprimento característico  $A$  define uma escala ao longo do qual os vetores  $\hat{t}$  se encontram alinhados em elevado grau com a cadeia no modelo WLC (vide seção 4.3) comportando-se como uma cadeia rígida. Além dessa escala, a correlação entre as direções dos vetores  $\hat{t}$  decai exponencialmente e, para vetores  $\hat{t}$  separados por uma distância muito maior que  $A$ , espera-se que a cadeia se comporte como cadeia flexível.

### 4.3 Modelo Worm-like chain (WLC)

Imaginemos uma cadeia vermiforme em 2 dimensões e comprimento  $L$ . A um ponto arbitrário da cadeia, situado a uma distância  $s \leq L$ , podemos identificar um vetor tangente  $\hat{t}(s)$  e formando um ângulo  $\theta(s)$  com o eixo  $x$ .

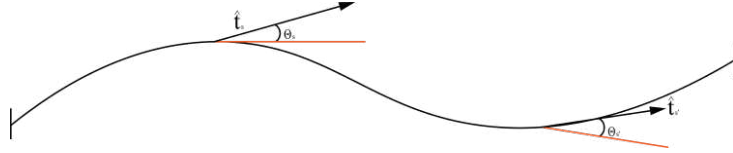


Figura 4.4 – Ilustramos dois vetores  $\hat{t}_s$  e  $\hat{t}_{s'}$  tangentes à cadeia e os respectivos ângulos  $\theta_s$  e  $\theta_{s'}$ .

Diferentemente do modelo de cadeia livremente articulada, estudado na seção (4.1), o modelo de cadeia vermiforme (WLC) representa o limite contínuo, i.e., idealiza-se que o número de segmentos  $N \rightarrow \infty$  e o comprimento de um segmento  $b \rightarrow 0$ , permanecendo o comprimento de contorno  $L = Nb$  constante, temos que o primeiro termo da Eq.(4.17) será:

$$\lim_{b \rightarrow 0, N \rightarrow \infty} \sum_i \kappa_0 b \left( \frac{\hat{t}_i - \hat{t}_{i-1}}{b} \right)^2 b = \kappa \int_0^L \left( \frac{d\hat{t}}{ds} \right)^2 ds \quad (4.23)$$

onde identificamos

$$ib = s_i, \kappa = \lim_{b \rightarrow 0} \kappa_0 b \text{ e } \frac{d\hat{t}}{ds} = \lim_{b \rightarrow 0} \frac{\hat{t}_i - \hat{t}_{i-1}}{b}$$

De maneira que o segundo termo da Eq. (4.17) passa ser representado por:

$$\int_0^L \vec{F} \cdot \hat{t}(s) ds \quad (4.24)$$

Assim, obtemos a equação:

$$E\{\hat{t}\} = \kappa \int_0^L \left( \frac{d\hat{t}}{ds} \right)^2 ds - \int_0^L \vec{F} \cdot \hat{t}(s) ds \quad (4.25)$$

Além disso, o modelo leva em conta o custo energético em se flexionar localmente a cadeia [132, 133], com a energia conformacional originando-se das contribuições da

curvatura local de cada seção do polímero, dada por  $|\frac{d\hat{t}}{ds}|$ . Se fixarmos uma de suas pontas e aplicarmos uma força  $\vec{F} = F\hat{x}$  à outra ponta, podemos escrever a energia associada a uma configuração  $\{\hat{t}(s)\}$  como:

$$E\{\hat{t}\} = \int_0^L ds \left( \frac{\kappa_b}{2} \left( \frac{d\hat{t}}{ds} \right)^2 - F\hat{x} \cdot \hat{t} \right), \quad (4.26)$$

sendo que  $\kappa_b$  representa a rigidez do polímero em ser flexionado, o que nos permite obter os casos extremos de polímeros flexíveis ( $\kappa_b \rightarrow 0$  - vide seção 4.1), rígidos ( $\kappa_b \gg 1$ ) e casos intermediários [133].

Com isto, uma cadeia em equilíbrio termodinâmico será encontrada em uma conformação  $\{\hat{t}(s)\}$  com probabilidade:

$$P\{\hat{t}(s)\} = \frac{e^{-\frac{E\{\hat{t}(s)\}}{k_B T}}}{Z}, \quad (4.27)$$

onde  $Z$  é a função de partição no ensemble canônico. Diferentemente da função de partição usual, aqui lidamos com uma versão representada por um funcional, visto que  $E$  é um funcional das configurações  $\theta(s)$ , sendo  $Z$  usualmente calculada por meio de integrais de caminho [133].

Apesar das dificuldades inerentes ao cálculo da função de partição associada à energia dada na forma da Eq. (4.26), podemos introduzir importante simplificação ao examinar os limites extremos das forças aplicadas. No limite de forças suficientemente elevadas, podemos inferir um estiramento quase que total do polímero. Disto decorre que  $|\hat{t}_z| \approx 1$  e, expandindo-se a expressão:

$$|\hat{t}_z| = \sqrt{1 - |\hat{t}_\perp|^2} \quad (4.28)$$

em série de Taylor até segunda ordem, obtemos:

$$|\hat{t}_z| \approx 1 - \frac{1}{2}|\hat{t}_\perp|^2. \quad (4.29)$$

Com este resultado e:

$$\left( \frac{d\hat{t}}{ds} \right)^2 \approx \left( \frac{dt_\perp}{ds} \right)^2, \quad (4.30)$$

obtemos a aproximação gaussiana da energia [133]:

$$E\{\hat{t}\} = \int_0^L ds \left( \frac{\kappa_b}{2} \left( \frac{dt_\perp}{ds} \right)^2 + \frac{1}{2}Ft_\perp^2 \right) - FL, \quad (4.31)$$

cujo termo  $FL$  pode ser ignorado, se usado como valor de referência e não desempenha papel importante no cálculo do fator de Boltzmann, na Eq. (4.27).

Em analogia com situação típica encontrada na subseção (6.3.6), em que o polímero

se encontra com as duas extremidades fixas, vamos expandir  $\theta(s)$  em série de Fourier e estabelecer o vínculo  $\vec{R}_\perp = \int_0^L \vec{t}_\perp ds = \vec{0}$ , temos que:

$$\vec{t}_\perp = \sum_{n=1}^{\infty} \vec{a}_n \cos\left(\frac{n\pi s}{L}\right). \quad (4.32)$$

Por meio da transformação dada na Eq. (4.32), podemos obter a Eq. (4.31). Computando-se a integral do módulo quadrado dos lados esquerdo e direito da Eq. (4.32) e levando-se em conta que  $\int_0^L \cos\left(\frac{m\pi s}{L}\right)\cos\left(\frac{n\pi s}{L}\right)ds = \frac{L}{2}\delta_{m,n}$ , obtemos:

$$\int_0^L ds |t_\perp|^2 = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{L}{2} |\vec{a}_n|^2 \quad (4.33)$$

Procedendo-se de maneira semelhante com  $\left(\frac{dt_\perp}{ds}\right)^2$ , obtemos:

$$\int_0^L \left(\frac{dt_\perp}{ds}\right)^2 ds = \frac{\pi^2}{2L} \sum_{n=1}^{\infty} |a_n|^2 n^2. \quad (4.34)$$

Assim, a energia dada pela Eq. (4.31) pode ser representada como:

$$E\{t_\perp\} = \frac{1}{4} \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{\kappa_b}{L} \pi^2 n^2 + FL\right) |a_n|^2. \quad (4.35)$$

Agora, chama-nos a atenção da Eq. (4.35) sua forma quadrática nos coeficientes de Fourier [133, 131]. Do Teorema de Equipartição, decorre se considerarmos uma cadeia polimérica em equilíbrio termodinâmico, que o valor médio da energia por modo  $\langle E_n \rangle$  é igual a  $D \frac{k_B T}{2}$ , onde  $D$  é o número de graus de liberdade por modo, neste caso, igual a 2. Em outras palavras, temos:

$$\frac{\langle |a_n|^2 \rangle}{4} \left(\frac{\kappa_b n^2 \pi^2}{L} + FL\right) = k_B T, \quad (4.36)$$

resultando em:

$$\langle |a_n|^2 \rangle = \frac{4k_B T}{\left(\frac{\kappa_b n^2 \pi^2}{L} + FL\right)}. \quad (4.37)$$

Agora, da Eq. (4.29) resulta que:

$$\begin{aligned} \langle \vec{R} \rangle &= \int_0^L \langle \hat{t} \cdot \hat{x} \rangle ds = \int_0^L \langle t_\parallel \rangle ds \\ &\approx L - \frac{1}{2} \int_0^L ds \langle |t_\perp|^2 \rangle \\ &= L - \frac{L}{4} \sum_{n=1}^{\infty} \langle |a_n|^2 \rangle \end{aligned} \quad (4.38)$$

Inserindo-se a Eq. (4.37) na Eq. (4.38), nós terminamos com a expressão:

$$\langle \vec{R} \rangle = L - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{k_B T}{\left( \kappa_b \frac{n^2 \pi^2}{L^2} + F \right)} \quad (4.39)$$

Se identificarmos  $q \equiv \frac{n\pi}{L}$  e  $\Delta q = \frac{\pi}{L}$ , com  $L \gg 1$ , podemos aproximar a soma na Eq. (4.39) por uma integral:

$$\langle \vec{R} \rangle = L - \frac{L}{\pi} \int_0^L \frac{k_B T}{(\kappa_b q^2 + F)} dq. \quad (4.40)$$

Redefinindo-se  $\tilde{q} = \sqrt{\frac{\kappa_b}{F}} q$ , temos:

$$\langle \vec{R} \rangle \approx L - \frac{L}{\pi} k_B T \sqrt{\frac{1}{F \kappa_b}} \int_0^{\infty} \frac{1}{(\tilde{q}^2 + 1)} d\tilde{q}, \quad (4.41)$$

que, após uma simples substituição trigonométrica, resulta em [134]:

$$\langle \vec{R} \rangle \approx L - \frac{L}{2} k_B T \sqrt{\frac{1}{F \kappa_b}}. \quad (4.42)$$

No limite de baixas forças e  $L \gg A$ , o modelo WLC resulta em uma cadeia flexível [41, 133, 129] como no modelo FJC, visto na seção (4.1). Isto resulta em uma força em função da extensão dada por:

$$F = \frac{3k_B T}{2AL} \langle R_z \rangle, \quad (4.43)$$

que é semelhante a Eq. (4.7).

As expressões (4.43) e (4.42) (resolvidas para  $F$ ) podem ser abrangidas por uma expressão mais geral que interpole os valores intermediários. Este resultado foi obtido por John Marko e Eric Siggia em 1995 [132], conhecida como equação de Marko e Siggia para o modelo WLC. Ela consiste em adicionar um termo de correção à expressão para altas forças que a torne válida também no regime de baixas forças. Para isto, devemos expandir a Eq. (4.42) até primeira ordem em  $\frac{R}{L}$ .

$$F' = \frac{k_B T}{A} \left( \frac{1}{4} + \frac{\langle R_z \rangle}{2L} \right) + B, \quad (4.44)$$

onde  $B$  é o termo de correção que buscamos.

A Eq. (4.44) deve ser idêntica à Eq. (4.43) no limite de baixas forças, resultando em:

$$B = \frac{k_B T}{A} \left( \frac{\langle R_z \rangle}{L} - \frac{1}{4} \right) \quad (4.45)$$

Agora, somando esta correção à Eq. (4.42) (resolvida para  $F$ ), temos:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left( \frac{1}{\left(1 - \frac{\langle \vec{R} \rangle}{L}\right)^2} + \frac{\langle R_z \rangle}{L} - \frac{1}{4} \right) \quad (4.46)$$

A equação de Marko e Siggia é válida para estiramentos arbitrários.

## V Interação DNA - ligantes

É considerado ligante qualquer substância que possui capacidade de interagir com a molécula de DNA em solução. Essas substâncias variam entre potentes compostos antitumorais a antibióticos de considerável importância para a medicina, e agentes como o brometo de etídio, amplamente usado como marcador molecular. O estudo dos complexos DNA-ligantes é de vital importância, pois é a partir dele que se compreende as propriedades espectroscópicas, especificidade de ligação e características dinâmicas da interação [135].

Em virtude da conformação, composição e estrutura do DNA, há várias maneiras de um ligante<sup>1</sup> interagir com a biomolécula em solução. Essa interação dependerá da estrutura química do ligante e das condições do meio aquoso onde as moléculas estão<sup>2</sup>.

Para melhor compreensão da reação de equilíbrio químico relacionado à interação DNA - ligantes, três modelos são de suma importância para análise das reações, o modelo de Scatchard, modelo de Hill e o modelo de McGhee-von Hippel.

### 5.1 Equilíbrio químico nas interações DNA-ligantes

A associação entre duas moléculas distintas (A) e (B) produz um complexo (C), e pode ser descrita por uma expressão de equilíbrio simples



Essa reação pode ser caracterizada por constantes intrínsecas de equilíbrio químico de associação e dissociação,

$$K_i = \frac{[C]}{[A][B]} \quad (5.2)$$

e

$$K_d = \frac{[A][B]}{[C]} \quad (5.3)$$

onde a constante  $K_i$  representa a reação de associação e  $K_d$  representa a reação de dissociação.

<sup>1</sup> Enzimas, proteínas, fármacos, marcadores fluorescentes, etc [135].

<sup>2</sup> Força iônica, temperatura, pH, etc [41].

## 5.2 Modelo de Scatchard

O processo de interação pode ser resumido através da Eq. (5.1), apenas redefinindo sua notação. Dessa maneira,  $[A] \equiv C_f$ , é a concentração de ligantes livres em solução,  $[B] \equiv C_{bp} - C_b$ , onde  $C_{bp}$  é a concentração de pares de base da molécula de DNA e  $[C] \equiv C_b$ , concentração de ligantes ligados ao DNA. Com isso, a redefinição da Eq. (5.1) será:



A constante intrínseca de associação será dada pela equação:

$$K_i = \frac{C_b}{C_f(C_{bp} - C_b)} \quad (5.5)$$

E reescrita como:

$$\frac{r}{C_f} = K_i(1 - r) \quad (5.6)$$

onde

$$r = \frac{C_b}{C_{bp}} \quad (5.7)$$

é a fração de sítios ligados, ou seja, a razão entre a concentração de ligantes ligados e a concentração dos pares de base da molécula de DNA [136].

A Eq. (5.6) é conhecida como isoterma de ligação de Scatchard, desenvolvida por George Scatchard [137].

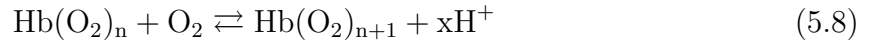
Há dois fatores relevantes sobre este modelo:

- É válido apenas para ligantes considerados pequenos, que ocupam apenas um par de base na molécula de DNA;
- Pressupõe que a constante intrínseca de ligação  $K_i$ , seja de fato uma constante; ou seja, a primeira associação DNA-ligante terá a mesma afinidade química que todas as posteriores.

Embora o modelo forneça uma constante intrínseca de associação entre os reagentes, ele desconsidera os efeitos de cooperatividade nas interações posteriores [138].

## 5.3 Modelo de Hill

Um dos primeiros estudos da interação entre a molécula de oxigênio ( $O_2$ ) com a hemoglobina (Hb) foi realizado por Christian Bohr. A Hb ao se ligar com o  $O_2$  em pH fisiológico, sofre uma mudança em sua conformação, tornando-se um ácido levemente mais forte, liberando íons  $H^+$ :



onde  $n = 0, 1, 2$  ou  $3$  e  $x \approx 0,6$  em condições fisiológicas. Essa reação é conhecida como efeito Bohr, e também é observada quando a hemoglobina interage com outros ligantes [139]. De acordo com Bohr, uma molécula receptora exibe ligação cooperativa se a interação com o ligante aumenta de forma não linear com a concentração do ligante [140].

A fração ocupante ou fração de sítios ligados  $\bar{Y}$  de um receptor com um ligante é definido por,

$$\bar{Y} = \frac{[\text{n}^\circ \text{ de sítios ligados}]}{[\text{n}^\circ \text{ de sítios ligados}] + [\text{n}^\circ \text{ de sítios livres}]} = \frac{[\text{n}^\circ \text{ de sítios ligados}]}{[\text{total de sítios}]} \quad (5.9)$$

Se  $\bar{Y} = 0$ , haverá somente sítios livres, e se  $\bar{Y} = 1$ , a quantidade de sítios ligados estará completamente saturada. Com isso, o conceito de ligação cooperativa só se aplica à moléculas ou complexos com mais de um sítio livre ligável. De maneira geral, o modelo de Hill contempla apenas sistemas com dois estados:  $\bar{Y} = 0$  e  $\bar{Y} = 1$ .

A partir dos estudos de Bohr, a primeira descrição de ligação cooperativa foi desenvolvida por Archibald Vivian Hill [141]. Baseando-se nas observações experimentais da interação das moléculas de  $\text{O}_2$  com moléculas de Hb, sugeriu uma equação fenomenológica

$$\bar{Y} = \frac{(K_i X)^n}{1 + (K_i X)^n} = \frac{(X)^n}{(K_d)^n + (X)^n} \quad (5.10)$$

onde  $n$  é o coeficiente de Hill,  $[X]$  a concentração do ligante,  $K_i$  a constante aparente de associação e  $K_d$  a constante aparente de dissociação. A Eq. (5.10) é conhecida como equação de Hill ou isoterma de ligação de Hill [140].

O coeficiente de Hill está diretamente relacionado com o efeito de cooperatividade do ligante, dessa maneira,

- Se  $n = 1$ , a interação é não-cooperativa, ou seja, as associações são independentes, não há aumento ou diminuição da afinidade do ligante pelo substrato após a primeira interação;
- Se  $n > 1$ , a interação tem cooperatividade positiva, ou seja, há um aumento da afinidade do ligante pelo substrato, de modo que a primeira interação facilite as subsequentes;
- Se  $n < 1$ , a interação terá cooperatividade negativa, ou seja, há uma diminuição da afinidade entre o ligante e o substrato, de modo que após a primeira interação haja dificuldade nas próximas associações.

Ao adaptar o modelo de Hill para interações DNA-ligantes como demonstrado na seção (5.2), redefinindo a notação da Eq. (5.1) podemos reescrever a Eq. (5.10), logo:

$$r = \frac{(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n} \quad (5.11)$$

A isoterma de ligação de Hill<sup>3</sup> representada pela Eq. (5.11) é semelhante a isoterma de Scatchard representada pela Eq. (5.6), sendo o modelo de Scatchard um caso particular do modelo de Hill, onde  $n = 1$  [41].

Contudo, o modelo de Hill apresenta algumas limitações, sendo possível obter dados precisos quando

- O ligante é pequeno e ocupa apenas um único sítio no substrato;
- A cooperatividade é positiva;
- Objetivo é analisar apenas dois estados do sistema, ligantes livres e ligantes ligados (equilíbrio químico) na solução.

## 5.4 Modelo de McGhee – von Hippel

Com o objetivo de obter dados mais precisos quando um ligante ocupa mais de um sítio na rede, James McGhee e Peter von Hippel desenvolveram um modelo teórico baseado na probabilidade de encontrar ligantes que estão distribuídos por toda rede. Essa probabilidade está condicionada à distribuição dos ligantes em relação aos sítios livres ligáveis e confinidade com outros ligantes ao longo da rede [126].

Para descrever o processo de interações, o modelo associa probabilidade com a constante intrínseca de equilíbrio, tamanho dos sítios ligáveis e tipo de cooperatividade correlacionando com o número de ligantes ligados à rede e total de ligantes livres em solução. O modelo de exclusão de vizinhos, ou apenas modelo de McGhee-von Hippel, apresenta casos com e sem cooperatividade [142]. Abordaremos aqui apenas o modelo sem cooperatividade.

Duas premissas importantes no modelo são consideradas: a rede de ligação (molécula de DNA) é considerada homogênea e unidimensional, e os ligantes não possuem especificidade a sítios da rede.

A rede possui muitos sítios livres ligáveis, tornando-se extensa a ponto de os efeitos de borda serem desprezados. E, por não apresentar cooperatividade, a constante intrínseca  $K_i$  independe do número de ligantes ligados.

<sup>3</sup> A descrição aqui realizada é concisa. Para maiores detalhes algumas referências podem ser consultadas [41, 140, 141].

No decorrer do processo de interação, lacunas (gaps) são formadas devido a distância entre duas moléculas consecutivas ligadas. Esses gaps apresentam um número  $s$  de sítios ligáveis (configurações possíveis da molécula de ligante no gap), dado por:

$$s = g - N + 1, \quad (5.12)$$

em que  $g$  é o número total de sítios no gap e  $N$  é o número de exclusão, ou seja, número de sítios ocupados por uma molécula do ligante ao se ligar a rede.

A interação pode ser representada através da reação química:



sendo,  $C_f$  total de moléculas livres do ligante em solução,  $\bar{S}$  é a média total de sítios livres da rede e  $C_b$  número de ligantes ligados.

A constante intrínseca no equilíbrio é dada por:

$$K_i = \frac{C_b}{C_f \bar{S}} \quad (5.14)$$

Por ser uma rede extensa, o número de sítios ligáveis por lacuna pode ser calculado através da equação:

$$\bar{s} = \sum_{g=N}^{g_{max}} (g - N + 1) P_g, \quad (5.15)$$

sendo  $P_g$  a probabilidade de uma lacuna qualquer possuir precisamente  $g$  sítios, e  $g_{max}$  representa o valor máximo de  $g$ , equivalente a uma lacuna ter a mesma dimensão da rede em si, ou seja, muito extensa.

Em virtude da unidimensionalidade da rede, haverá sempre uma unidade a mais de lacunas em relação ao número de ligantes ligados, dessa forma, a média total de sítios livres na rede pode ser calculada por:

$$\bar{S} = (C_b + 1) \bar{s} \quad (5.16)$$

Usando-se as Eqs. (5.14) e (5.15), temos:

$$\frac{C_b}{C_f} = K_i (C_b + 1) \sum_{g=N}^{\infty} (g - N + 1) P_g \quad (5.17)$$

por ser uma rede extensa, fez-se uma aproximação  $g_m \rightarrow \infty$ .

Considerando que há diversas possibilidades de ligações entre as moléculas do ligante e a rede. Tem-se sítios livres ligáveis, denotados por  $f$ , extremidades inicial e final dos sítios ligados, denotados por  $b_1, b_2, \dots, b_N$ . Após a primeira ligação, é possível que em uma determinada lacuna haja uma molécula do ligante e que o sítio adjacente possa ou não estar ocupado. A partir da notação descrita, podemos estabelecer as probabilidades

condicionais:

- $P\{ff\}$  Probabilidade de dois sítios vizinhos estarem livres. Com possibilidade de ocorrer  $g - 1$  vezes;
- $P\{fb_1\}$  Probabilidade de um sítio ligado no início da rede ter um sítio vizinho anterior livre;
- $P\{fb_N\}$  Probabilidade de um sítio ligado no final da rede ter um sítio vizinho posterior livre.

A probabilidade  $P_g$  é dada pela expressão:

$$P_g = P\{fb_N\} \times [P\{ff\}]^{g-1} \times P\{fb_1\} \quad (5.18)$$

Para definirmos a isoterma de ligação do modelo de exclusão de vizinhos, as probabilidades condicionais devem ser reescritas em termos característicos do complexo de interação ligante-DNA. Constante de ligação intrínseca ( $K_i$ ), concentração dos pares de bases ( $C_{bp}$ ), número de exclusão ( $N$ ), concentração de ligantes livres e ligados ( $C_f$  e  $C_b$ ).

A fração de sítios ligados ou fração ocupante é dada por:

$$rN = \frac{C_b N}{C_{bp}}, \quad (5.19)$$

sendo  $r$  dado pela Eq. (5.7) e  $C_b N$  o total de sítios ligados da rede.

A Eq. (5.19) no leva a concluir que a fração de sítios livres da rede será  $1 - rN$ , de forma que a probabilidade de algum sítio da rede escolhido de maneira aleatória esteja livre, também será  $1 - rN$ .

Ao analisarmos o caso de dois sítios, sendo o primeiro escolhido de maneira aleatória, a probabilidade do primeiro sítio ser livre é  $1 - rN$ . Considerando o segundo sítio livre, a probabilidade condicional dos sítios será  $P\{ff\}$ . Contudo, se o segundo sítio estiver ocupado, a probabilidade será  $r = \frac{rN}{N}$ , e por consequência, a probabilidade condicional dos sítios será  $P\{fb_1\}$ . Portanto, podemos expressar a probabilidade geral do segundo sítio ser livre:

$$1 - rN = (1 - rN)P\{ff\} + rP\{fb_N\} \quad (5.20)$$

Por ser um caso onde não há cooperatividade entre os ligantes, temos que:

$$P\{ff\} = P\{fb_N\}, \quad (5.21)$$

de maneira que não há preferência por um sítio ocupado ou livre. Usando-se a Eq. (5.20), temos que:

$$P \{ff\} = P \{fb_N\} = \frac{1 - rN}{1 - (N-1)r} \quad (5.22)$$

e

$$P \{fb_I\} = P \{b_I|b_N\} = \frac{r}{1 - (N-1)r} \quad (5.23)$$

Substituindo as Eqs. (5.22) e (5.23) na Eq. (5.18), obtemos a equação da probabilidade em função dos termos característicos do complexo de interação DNA - ligante:

$$P_g = \left( \frac{1 - rN}{1 - (N-1)r} \right)^g \left( \frac{r}{1 - (N-1)r} \right) \quad (5.24)$$

Por fim, usando-se a Eq. (5.17) podemos escrever a equação que representa a isoterma de ligação de McGhee-von Hippel:

$$\frac{r}{C_f} = K_i(1 - rN) \left( \frac{1 - rN}{1 - (N-1)r} \right)^{N-1} \quad (5.25)$$

Ao utilizar esse modelo, alguns pontos devem ser considerados:

- Trata o problema da exclusão de vizinhos de forma aprimorada, fornecendo resultados mais precisos. Contudo, o parâmetro  $r$  da isoterma não pode ser isolado de maneira analítica;
- Pode-se correlacionar o número de exclusão  $N$  deste modelo com a fração de sítios ligados  $r_{max}$  do modelo de Hill;
- Para  $N = 1$ , a Eq. (5.25) pode ser escrita da forma  $r/C_f = K_i(1 - r)$ , que é o modelo de Scatchard.

Em suma, o modelo de Scatchard é um caso particular do modelo McGee-von Hippel<sup>4</sup> quando  $N = 1$ .

## 5.5 Interação DNA - Cloroquina

Estudos bioquímicos de fármacos antimaláricos como a cloroquina tornaram-se modelos para compreensão dos mecanismos de ação e interações moleculares de diversas moléculas semelhantes, visto que, são fontes valiosas para investigar a natureza de sistemas biológicos específicos [143].

Investigações iniciais realizadas por Logan Irvin, Elinor Moore e Frank Parker demonstraram a capacidade da CLQ de interagir com o DNA e o RNA *in vitro*, sugerindo

<sup>4</sup> A descrição aqui realizada do modelo McGhee-von Hippel é concisa. Algumas referências podem ser consultadas para maiores detalhes [41, 136].

um possível mecanismo de ação que poderia interferir no processo celular dos parasitas da malária [144, 145]. Diversos estudos foram realizados para analisar a interação DNA-CLQ com uso de técnicas como espectroscopia de absorção, viscosimetria, diálise de equilíbrio, ultracentrifugação, etc.

Estes estudos demonstraram que: a cloroquina interage com o DNA e outros polinucleotídeos [145]; Apresenta preferência por resíduos de purina, interage com os fosfatos constituintes do esqueleto de açúcar-fosfato, modificando a estrutura secundária do DNA e proporcionando um efeito estabilizador na dupla-hélice [146, 147, 148]; Aumenta a viscosidade do DNA e diminui sua velocidade de sedimentação [149, 146]; A formação do complexo inibe a ação dos anticorpos anti-DNA<sup>5</sup>, sendo possível o uso do fármaco para controle de LES e outras patologias autoimunes [152]; Causa alterações nos espectros de absorção do fármaco, provavelmente devido as interações de empilhamento  $\pi$  [145]; Inibe reações enzimáticas, como a ação da DNA-polimerase, responsável pela síntese da fita complementar do DNA [148, 153].

Com o uso da técnica de Ressonância magnética nuclear, pode-se demonstrar a intercalação da molécula de cloroquina nas bases purícas do DNA através do empilhamento dos anéis heterocíclicos, e entre as moléculas de cloroquina [154]. A estrutura molecular da CLQ é formada por anéis de quinolina que intercalam entre os pares de base e uma cadeia diamino alifática (Fig. 5.1) que ao interagir com a fenda menor do DNA, por ligação eletrostática com os átomos de oxigênio dos grupos fosfato, estabiliza o complexo DNA-CLQ [155].

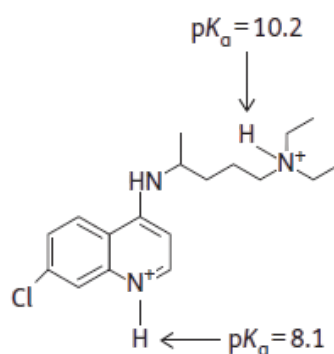


Figura 5.1 – Constantes de ionização da CLQ. A cadeia diamino alifática possui  $pK_a=10.2$  e o anel heterocíclico de quinolina possui  $pK_a=8.1$  [70].

As constantes de ionização da CLQ têm ação direta na interação com o DNA. A constante de protonação do anel é de fundamental interesse em pH fisiológico (Fig. 5.1), pois a molécula apresenta formas neutra, mono e diprotonadas [156, 157].

<sup>5</sup> O Lúpus eritematoso sistêmico passou a ser considerado uma doença autoimune devido aos anticorpos direcionados aos autoantígenos, em particular aos ácidos nucleicos e proteínas relacionadas, desses anticorpos, os anti-DNA são os mais específicos e característicos para LES [150, 151].

## VI Pinça óptica

### 6.1 Um breve histórico sobre a manipulação óptica

A busca por respostas sobre *o que é a luz e o porquê de seu comportamento* pode ser observada desde a Grécia antiga, passando por Aristóteles, Ptolomeu, Euclides, etc. Muitos outros pensadores e cientistas dedicaram-se em tentar explicar o que é a luz e seus fenômenos [126]. René Descartes considerava a luz como uma espécie de pressão propagada através de um meio elástico (éter) que preenchia todo espaço [158]. O primeiro a observar que a luz tinha capacidade de exercer forças sobre a matéria foi Johannes Kepler, ao descrever a deflexão da cauda dos cometas causada pelos raios solares [126].

Ao formular a Teoria Eletromagnética em 1873, James Clerk Maxwell pôde prever a existência dessa força, nomeada de pressão de radiação, em decorrência da radiação eletromagnética [159]. Somente 28 anos após a formulação da Teoria Eletromagnética, que Peter Lebedew, Ernest Nichols e Gordon Hull (1901) conseguiram medir a pressão de radiação em objetos macroscópicos e gases absorventes no ambiente laboratorial. Contudo, apenas no ano de 1968 foi reportada a primeira observação experimental da pressão de radiação agindo sobre um objeto macroscópico, confirmando assim, a teoria de Maxwell [160, 161].

A pressão de radiação e seu efeito são tão pequenos, dificilmente detectáveis em uma aplicação prática, de forma que a possibilidade de analisá-los com clareza tornou-se factível apenas após a criação do laser<sup>1</sup> na década de 60 [162]. Com a criação do laser e compreensão da pressão de radiação, Arthur Ashkin desenvolveu uma série de experimentos que são referências para estudos da interação da luz com a matéria.

Em seu primeiro trabalho, Ashkin mostrou que era possível usar a pressão de radiação para aprisionar e manipular partículas [163]. Com a continuidade de suas pesquisas, ele identificou duas forças atuantes nas partículas, a força de gradiente na direção do gradiente de intensidade, ou seja, na direção do centro do feixe, e a força de espalhamento, na direção de propagação do feixe incidente [164]. Experimentalmente, Ashkin mostrou que usando apenas essas forças, pode-se acelerar, levitar, desacelerar e aprisionar de forma estável partículas de tamanhos micrométricos [165, 166]. Em 1986, ao usar um feixe de laser fortemente focalizado por uma objetiva com grande abertura numérica, aprisionou uma micropartícula dielétrica e a moveu de forma tridimensional. Com isso, Ashkin apresentou a técnica conhecida como Pinça Óptica [43].

No fim da década de 80, o aprisionamento óptico passou a ser usado na área das ciências biológicas, ao capturar o vírus do mosaico do tabaco e a bactéria *Escherichia*

<sup>1</sup> Laser é uma sigla para light amplification by stimulated emission of radiation, em tradução livre, amplificação de luz por emissão estimulada de radiação [162].

*coli* [167]. Jeffrey Finer, Carlos Bustamante e Steven Block juntamente com seus colaboradores são pioneiros no uso da pinça óptica para caracterizar as propriedades mecânicas de biomoléculas como DNA e miosina [168, 45, 169].

Devido ao desenvolvimento da pinça óptica e sua aplicação nos estudos de sistemas biológicos, Arthur Ashkin foi laureado com o Prêmio Nobel em 2018, juntamente com Gérard Mourou e Donna Strickland devido ao método de geração de pulsos ópticos ultracurtos e alta intensidade [46].

## 6.2 Fundamentos do pinçamento óptico

O objetivo desta seção não é descrever minuciosamente as teorias do pinçamento óptico; faremos sim, uma abordagem elucidativa e didática para que se tenha compreensão do funcionamento de uma pinça óptica. O aprofundamento e cálculos referentes às teorias podem ser acessados nas referências que serão citadas ao longo do texto.

A pinça óptica consiste em um feixe de laser fortemente focalizado por uma lente objetiva com grande abertura numérica (NA), permitindo que objetos micrométricos sejam aprisionados na região próxima ao foco do feixe [41]. A literatura aponta várias teorias que descrevem o pinçamento óptico. Aqui descreveremos apenas duas, a Teoria Rayleigh e Teoria de óptica geométrica (OG) [170, 171, 172].

### 6.2.1 Teoria Rayleigh

A teoria Rayleigh ou limite Rayleigh é válido quando o raio da microesfera  $a$  (centro espalhador) for muito menor que o comprimento de onda da luz incidente ( $a \ll \lambda$ ). Neste caso, a microesfera irá se comportar como um dipolo induzido na presença de um campo elétrico ( $\vec{E}$ ) [170].

A força ( $\vec{F}$ ) atuante sobre um dipolo elétrico em função do campo elétrico ( $\vec{E}$ ) e do momento de dipolo ( $\vec{p}$ ) [173], pode ser calculada por:

$$\vec{F} = (\vec{p} \cdot \vec{\nabla}) \vec{E} = \vec{\nabla}(\vec{p} \cdot \vec{E}) + \vec{p} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) \quad (6.1)$$

Por estarmos no limite Rayleigh, a frequência será muito pequena ( $\omega \ll c/a$ ), e, conseqüentemente, a variação do campo elétrico ( $\vec{E}$ ) em relação ao tempo (t) de propagação na partícula será muito pequena, de modo que o momento de dipolo induzido na microesfera dependerá somente do valor instantâneo do campo elétrico incidente, tornando-se um processo quasi-estático. De forma que a variação temporal dos campos é desprezada ( $\partial B/\partial t = 0$ ), a Eq. (6.1) pode ser reescrita como:

$$\vec{F} = \vec{\nabla}(\vec{p} \cdot \vec{E}) \quad (6.2)$$

De modo que, o campo elétrico irá gerar um dipolo induzido ( $\vec{p}$ ), que pode ser calculado através da equação:

$$\vec{p} = 4\pi\epsilon_m \left( \frac{K-1}{K+2} \right) a^3 \vec{E} \quad (6.3)$$

sendo  $K$  a constante dielétrica que envolve as permissividades do meio ( $\epsilon_m$ ) e da microesfera ( $\epsilon$ ), dada por  $K = \epsilon/\epsilon_m$ .

Substituindo a Eq. (6.3) na Eq. (6.2), temos:

$$\vec{F} = 4\pi\epsilon_m \left( \frac{K-1}{K+2} \right) a^3 \vec{\nabla}(E^2) \quad (6.4)$$

A Eq. (6.4) expressa a força sobre um dipolo induzido, que é proporcional ao gradiente da intensidade do campo elétrico, empurrando a microesfera para o ponto de maior intensidade do campo, ou seja, para o centro da região focal. Essa força é nomeada de força de gradiente (Fig. 6.1) [172, 173].

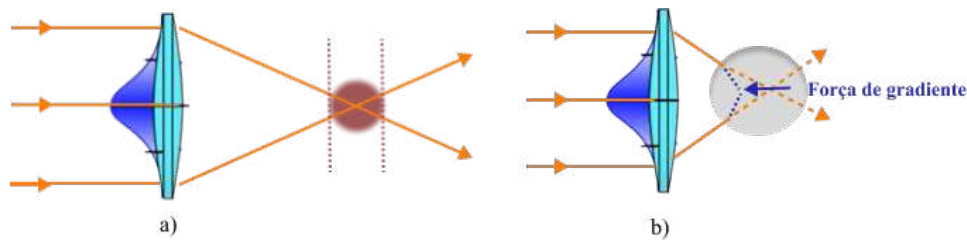


Figura 6.1 – a) Um dipolo induzido na presença de um campo elétrico é direcionado a região de maior intensidade do campo. b) A força é proporcional ao gradiente de intensidade do campo elétrico (Eq. 6.4), essa força é denominada força de gradiente.

O feixe de laser ao passar pela objetiva, terá a intensidade do campo maximizada no foco do sistema, e será nessa região que haverá condições para garantir o aprisionamento óptico. A microesfera no limite Rayleigh fica aprisionada próximo ao foco do sistema.

## 6.2.2 Teoria de óptica geométrica (OG)

O limite Rayleigh torna-se inadequado quando a microesfera tem raio  $a$  maior que o comprimento de onda da luz incidente ( $a \gg \lambda$ ). De forma que, o tratamento adequado para esses casos é realizado a partir do limite da óptica geométrica ou teoria de óptica geométrica [171]. Os princípios básicos da óptica geométrica como propagação da luz, reflexão, refração, explicam de maneira adequada o pinçamento óptico.

No limite da óptica geométrica, vamos considerar que um feixe é composto por vários raios, estes por sua vez, ao interagirem com a microesfera podem ser refletidos, absorvidos ou refratados. Caso os raios sejam refletidos ou absorvidos, a microesfera é direcionada para o sentido de propagação do feixe e não há aprisionamento óptico.

De acordo com a teoria eletromagnética, uma onda eletromagnética transporta energia ( $U$ ) e momento linear ( $\vec{p}$ ), de forma que se pode exercer pressão ao incidir um feixe de luz sobre um objeto ou superfície. Para calcularmos a pressão exercida pelos raios incidentes, recorreremos a 2ª Lei de Newton que pode ser expressa em termos do momento linear :

$$\sum \vec{F} = \frac{d\vec{p}}{dt} \quad (6.5)$$

O momento linear transportado por uma onda eletromagnética pode ser expresso pela equação:

$$\frac{d\vec{p}}{dV} = \frac{\vec{S}}{c^2} \quad (6.6)$$

em que  $d\vec{p}/dV$  é a densidade de momento linear, onde  $dV$  é a variação do volume ocupado pelo feixe (velocidade  $c$ ) ao passar por uma área  $A$  em um intervalo de tempo  $dt$ , sendo  $dV = Ac \cdot dt$  e  $\vec{S}$  é o vetor de Poynting.

Substituindo a variação do volume ( $dV$ ) na Eq. (6.6), temos:

$$\frac{1}{A} \cdot \frac{d\vec{p}}{dt} = \frac{\vec{S}}{c} \quad (6.7)$$

que representa a taxa do fluxo do momento linear eletromagnético.

Usando-se a Eq. (6.5) na Eq. (6.7), resulta em:

$$\frac{\vec{F}}{A} = \frac{\vec{S}}{c} \quad (6.8)$$

ou

$$P_{\text{rad}} = \frac{S}{c} \quad (6.9)$$

A força ( $\vec{F}$ ) expressa em termos do momento linear por unidade de área ( $A$ ) gera a pressão de radiação, também denominada força de espalhamento (Fig. 6.2). Esse momento linear responsável pela pressão de radiação é uma propriedade do campo elétrico [174].

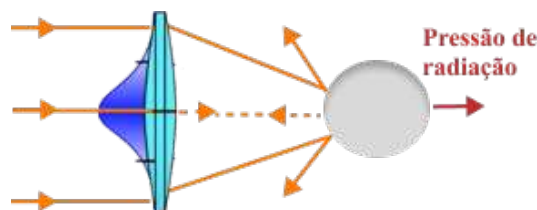


Figura 6.2 – A pressão de radiação tem a mesma direção do feixe incidente.

Até o momento, tratamos apenas casos em que os raios incidentes são refletidos ou absorvidos. Os raios incidentes também são capazes de exercer força sobre a superfície quando refratados por esta. A origem dessa força é devido a conservação do momento

linear, onde o momento linear total do sistema raio incidente-superfície deve ser o mesmo antes e depois da refração. Quando um raio incide em uma microesfera (nesse caso, microesfera dielétrica), este raio desvia sua trajetória inicial caso os índices de refração do meio de incidência e da microesfera sejam diferentes, de modo que, o raio refratado terá momento linear numa direção diferente da inicial. Com isso, pode-se afirmar que o raio sofreu uma variação em seu momento linear, que está relacionada com a alteração de sua trajetória, como pode ser visto na Fig. (6.3).

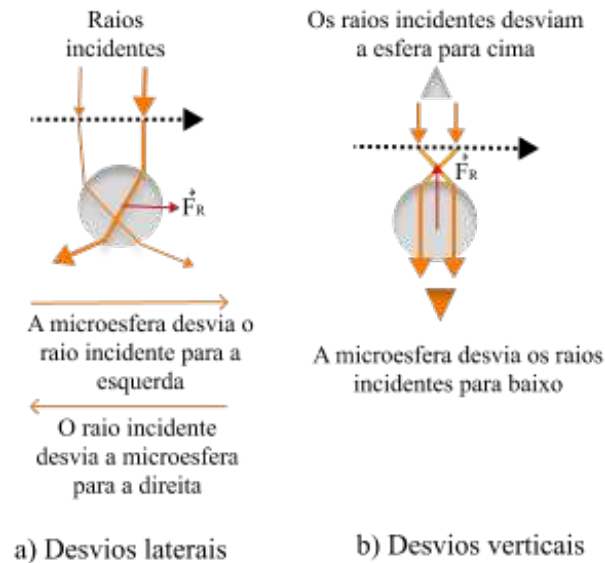


Figura 6.3 – Os raios ao incidirem na microesfera refletem e refratam. a) Os raios incidentes e a microesfera sofrem desvios laterais. c) Os raios incidentes e a microesfera sofrem desvios verticais [175].

A Eq. (6.5) determina que a microesfera tenha uma variação de momento linear com mesmo módulo e sentido contrário à variação de momento linear do raio incidente. Inicialmente, decompomos o feixe de laser em raios para facilitar a visualização da ação destes sobre a microesfera. Faremos agora o inverso, considere um feixe de laser focalizado em um determinado ponto, uma microesfera ao entrar sob a ação do feixe, se desloca em direção ao eixo óptico do sistema, o efeito da refração gera a força de gradiente que direciona a microesfera para região focal (Fig. 6.4.b).

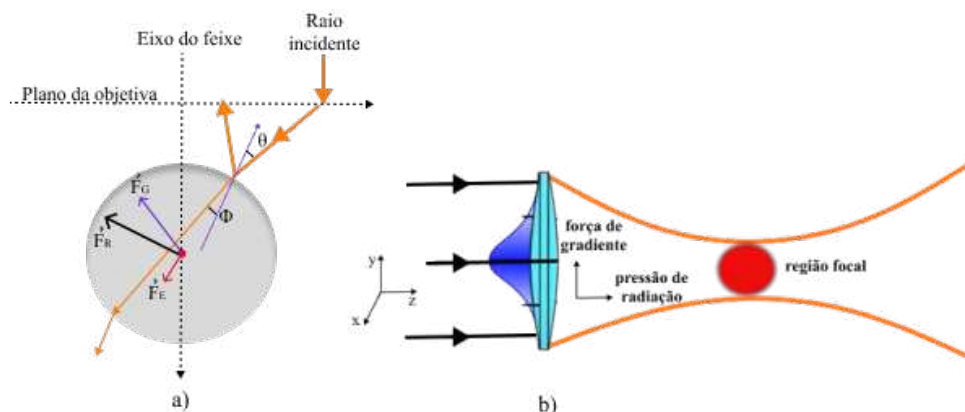


Figura 6.4 – a) Um raio incide sobre a microesfera, ao refletir gera o efeito da pressão de radiação ou força de espalhamento  $\vec{F}_E$  (em vermelho), ao refratar gera a força de gradiente  $\vec{F}_G$  (em azul) e conseqüentemente, a força restauradora  $\vec{F}_R$  (em preto). b) Por se tratar de um feixe gaussiano, os raios provenientes da região central terão mais intensidade que os raios das extremidades, de modo que, a microesfera será deslocada para região central do foco do feixe.

Em suma, o efeito da reflexão é empurrar a microesfera no mesmo sentido do raio incidente (pressão de radiação ou força de espalhamento), e o efeito da refração é deslocar a microesfera para região focal (força de gradiente). A força restauradora (Fig. 6.4.a) resultante da competição entre esses dois efeitos dá origem ao pinçamento óptico, sendo Ashkin o primeiro a observar este fenômeno [163, 165].

## 6.3 Procedimento experimental

### 6.3.1 Construção e protocolo de tratamento da lamínula

O protocolo de tratamento do porta-amostras é de suma importância, a adsorção da molécula de DNA depende do recobrimento feito pela Albumina soro bovina biotinilada (BSA-biot<sup>2</sup>) e estreptavidina<sup>3</sup> (STP) na lamínula [176]. A base do porta-amostras é uma lamínula de vidro com 0,15 mm de espessura e um anel de borracha (*o-ring*) com diâmetro de 0,8 cm. É usada parafina líquida para aderir o *o-ring* sobre a lamínula (Fig. 6.5).



Figura 6.5 – *O-ring* aderido a lamínula.

<sup>2</sup> A Proteína de Soro Bovino (BSA) é uma proteína de fácil adsorção em superfícies vítreas. Nesse protocolo, usa-se para recobrir a lamínula, sendo que, uma de suas extremidades adere-se à lamínula e a outra contém uma molécula de biotina (vitamina H) que fica exposta na solução. A BSA-biotinilada (BSA-biot) é diluída previamente em tampão A e mantida em ambiente refrigerado.

<sup>3</sup> Estreptavidina é uma proteína com capacidade de ligar-se fortemente à biotina. A STP é previamente diluída em tampão PBS a 150 mM e mantida em ambiente refrigerado.

Tabela 6.1 – Substâncias usadas para o tratamento da lamínula.

Substâncias	Volume( $\mu\text{L}$ )
BSA-biot	20
STP	20
Tampão A	40
PBS 150 mM	40

Processo: Com a estrutura do porta amostras montada (Fig. 6.5), adiciona-se BSA-biot na região interna do *o-ring*. O tempo de reação é de aproximadamente 20 minutos. Em seguida, retira-se o excesso da BSA-biot, e usa-se Tampão A<sup>4</sup> para lavar a área interna do *o-ring* e após, adiciona-se STP. Tanto o tempo de reação quanto a retirada do excesso de STP é semelhante ao da BSA-biot, entretanto, o último passo é lavar a região interna do *o-ring* com PBS 150 mM<sup>5</sup>. Vale ressaltar que durante o tempo de reação dos compostos o porta amostras é colocado no fluxo laminar sob luz ultravioleta para que possíveis contaminações sejam reduzidas. Todos os volumes usados no processo estão na descritos na Tabela (6.1).

Resultado: Após realizar todo processo de tratamento da lamínula, forma-se uma estrutura padrão da estreptavidina que pode ser observada microscopicamente na Fig. (6.6.b).

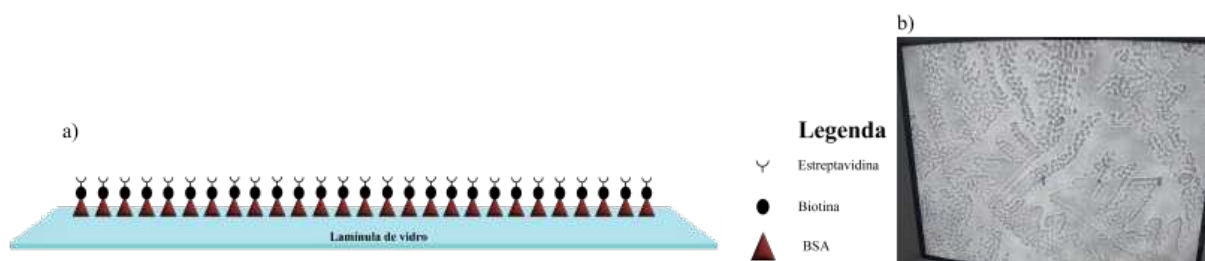


Figura 6.6 – a) Forma estrutural da BSA-biot e STP após tratamento. b) Padrão formado na lamínula pela STP.

Ao finalizar o processo de tratamento, o porta amostras é inserido no estágio do microscópio.

<sup>4</sup> O tampão A é uma solução tampão preparada com 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 40 mM de  $\text{KCl}$ , e 25 mM de  $\text{Tris HCl}$ , e tem pH 8.

<sup>5</sup> O PBS (Phosphate Buffer Saline) é um tampão de fosfato salino utilizado em diversos experimentos de Biologia Molecular. No caso destes experimentos, ele é usado para simular o sistema fisiológico humano. Devido a este fator, a concentração de sódio  $[\text{Na}]$  na solução é de 140 mM e pH 7.4.

### 6.3.2 Solução Lambda-DNA e microesferas

As amostras são compostas por uma solução aquosa de PBS com [Na] a 150 mM e moléculas de  $\lambda$ -DNA (New England Biolabs®)<sup>6</sup> ligadas as microesferas de poliestireno (Bang Labs®) com 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro e recobertas com STP [177]. As microesferas são utilizadas como ferramenta para manipular o DNA através da pinça óptica.

Tabela 6.2 – Solução DNA-microesferas.

Substância	Volume ( $\mu\text{L}$ )
PBS 150 mM	110
DNA biotilado	1
PS-STP	0,5

Processo: Adiciona-se 10  $\mu\text{L}$  de PBS 150 mM em um tubo de 1,5 mL e após, adiciona-se PS-STP<sup>7</sup> e o  $\lambda$ -DNA biotilado. A solução é colocada em banho térmico a 37 °C por uma hora. Os volumes usados no processo estão descritos na Tabela (6.2).

Resultado: Durante o período de 1 hora no banho térmico, ocorre a ligação entre uma das extremidades do DNA à uma microesfera. Por fim, adiciona-se 100  $\mu\text{L}$  de PBS 150 mM e retorna o tubo ao banho térmico por aproximadamente 10 minutos.

### 6.3.3 Sistema DNA-lamínula

Após finalizar o processo da solução DNA- microesferas, a amostra é inserida na região interna do *o-ring*. A configuração adequada para uso em experimentos de molécula única pode ser observada na Fig. (6.7), onde uma extremidade da molécula de DNA está adsorvida na lamínula e a outra está ligada a uma microesfera, formando a grosso modo, um sistema massa-mola.

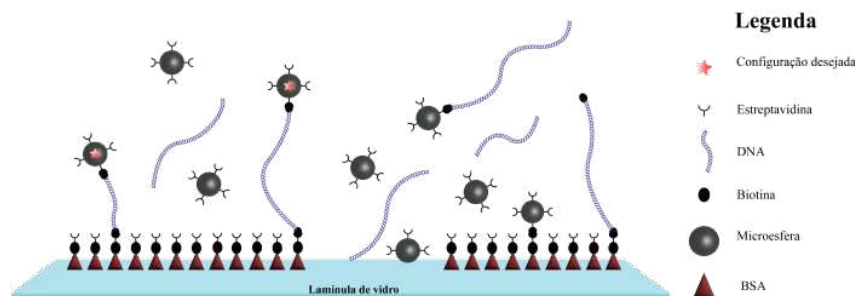


Figura 6.7 – Possíveis configurações formadas na lamínula a partir da solução contendo DNA e microesferas.

<sup>6</sup> O DNA contém uma molécula de biotina em suas extremidades, isso facilita sua ligação com a estreptavidina adsorvida na lamínula e com as microesferas.

<sup>7</sup> Do inglês, Polystyrene Spheres (PS), em tradução livre, esferas de poliestireno. As esferas de poliestireno usadas nos experimentos de pinça óptica são recobertas por estreptavidina (STP), de maneira que PS-STP é uma sigla para esfera de poliestireno-estreptavidina.

Diversas configurações podem ser encontradas na amostra, tais como, DNA isolado, microesfera adsorvida à lamínula, agregados de moléculas de DNA em uma microesfera, etc. Após encontrar a configuração desejada, são realizados os estiramentos da molécula de DNA usando o piezoelétrico acoplado ao estágio do microscópio.

### 6.3.4 Preparo das soluções de cloroquina

As alíquotas do difosfato de cloroquina (CAS:50-63-5), com peso molecular de 515,86 g/mol são diluídas em PBS com concentração diferentes de cloreto de sódio (NaCl), como descrito na Tabela (6.3).

Tabela 6.3 – Composição dos diferentes PBS usados.

Tampão	NaCl	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS [Na] = 150 mM	140 mM	4.375 mM	1.2 5mM
PBS [Na] = 1 mM	0	0.4375 mM	0.125 mM

Todas as concentrações de CLQ são diluídas individualmente, de acordo com o tampão a ser usado nos experimentos. As concentrações entre 0,2  $\mu$ M a 20  $\mu$ M são diluídas<sup>8</sup> a partir da solução estoque de 50  $\mu$ M em um volume de 200  $\mu$ L de PBS. Vale ressaltar que as soluções são preparadas após obter uma molécula de DNA dentro dos padrões pré-estabelecidos citados nas seções (3.3), (6.3.6) e na Tabela (6.4).

Tabela 6.4 – Concentração e volume das soluções de CLQ.

Concentração	Volume( $\mu$ L)
5 mM	1000
100 $\mu$ M	500
50 $\mu$ M	500
0,2 a 20 $\mu$ M	200

Após obter a molécula de DNA dentro dos parâmetros estabelecidos, é realizada a troca de alíquota. Retira-se o meio aquoso sem o fármaco e adiciona-se uma alíquota referente a concentração do fármaco que será testada. Após adicionar o fármaco (primeira troca de alíquota), o tempo de reação é analisado<sup>9</sup>, haja vista que, alguns fármacos apresentam um tempo de reação maior que 30 minutos. Depois do período de reação, a molécula de DNA é estirada cinco vezes para se obter as curvas de força em função da extensão (FEC).

<sup>8</sup> As concentrações entre 0,2  $\mu$ M e 20  $\mu$ M são preparadas no momento que serão usadas. As outras soluções ficam guardadas como solução estoque durante 10 dias, após esse período são descartadas.

<sup>9</sup> O tempo de reação pode variar conforme o fármaco que está em teste. Alguns interagem rapidamente com a molécula de DNA e outros ultrapassam o intervalo de uma hora.

### 6.3.5 Estrutura experimental

Na Fig. (6.8), temos uma representação do esquema estrutural da pinça óptica utilizada nos experimentos.

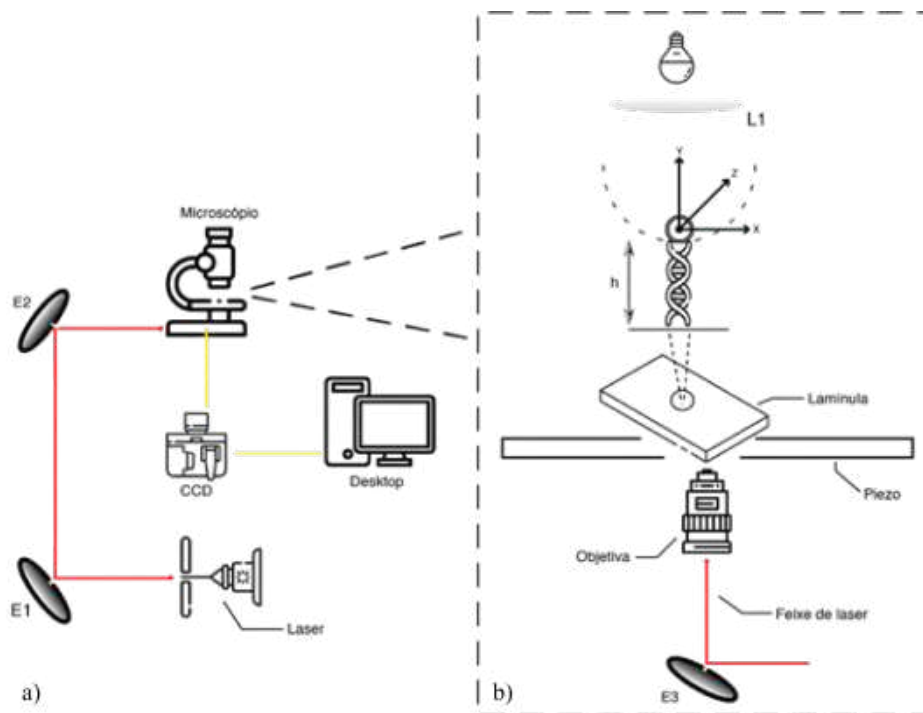


Figura 6.8 – Esquema estrutural da pinça óptica. a) O esquema é formado por um laser, dois espelhos E1 e E2, um microscópio invertido, uma câmera CCD e um desktop. b) Representação ampliada da montagem interna do microscópio: um espelho E3, uma lente objetiva, piezoelétrico, um porta amostras contendo solução de DNA e microesferas, uma lente L1.

Na Fig. (6.8), a) representa o microscópio Nikon Eclipse Ti-S. É usado um laser infravermelho (IV), modelo MIL-III-1064 da CNI Laser, que emite um feixe gaussiano com comprimento de onda de  $\lambda=1064$  nanômetros, com potência máxima de 1,5 Watts e operando no modo  $TEM_{00}$ <sup>10</sup>.

Ao sair da fonte, o laser percorre um caminho óptico, contendo dois espelhos E1 e E2, que permitem um melhor alinhamento da pinça óptica. Uma das saídas do microscópio está conectada a uma câmera CCD<sup>11</sup>, modelo JAI-BM-500GE, com taxa máxima de captura na ordem de 15 frames por segundo ligada a um desktop, permitindo assim que todo experimento seja visualizado e filmado.

Na Fig. (6.8.b), temos representada a parte interna do microscópio. Nela encontra-se um espelho dicróico E3 com alta transmitância para a luz visível e alta reflectância

<sup>10</sup> Trocando em miúdos, o modo  $TEM_{00}$  indica que os campos elétrico e magnético são transversais à direção das frentes de onda, enquanto os zeros subscritos especificam que não há nós azimutal ou radial no perfil [178].

<sup>11</sup> Charge coupled device, em tradução livre, dispositivo de carga acoplada.

para a luz no infravermelho. Por já estar no infravermelho, o laser é refletido e passa por uma lente objetiva com abertura numérica de 1.4.

A objetiva é responsável por focalizar o laser criando um poço de potencial que é a pinça óptica e as microesferas são aprisionadas na região focal. Após a objetiva, encontra-se o piezoelétrico conectado a um computador, que é o responsável por deslocar o estágio do microscópio e assim, a lamínula com precisão nanométrica nos eixos  $x$  e  $y$ .

A lente  $L1$  representa o condensador do sistema de iluminação do microscópio. Abaixo, encontra-se o poço de potencial gerado pela pinça óptica, o sistema de referência utilizado e a amostra de DNA contendo as microesferas. Na figura representada, uma das pontas do DNA está adsorvida na microesfera e a outra ponta adsorvida na lamínula, que é o porta amostras. E a altura  $h$  representa a distância do centro de massa da microesfera em relação à lamínula.

### 6.3.6 Experimento pinça óptica

A pinça óptica é utilizada para capturar uma microesfera de poliestireno revestida de estreptavidina presa em uma molécula de DNA. Ao percorrer a amostra usando-se os deslocadores acoplados ao estágio do microscópio, uma microesfera é aprisionada na região focal (Fig. 6.4.b). Alguns pontos são analisados antes de iniciar o experimento de fato, para averiguar se há apenas uma molécula de DNA ligada à microesfera (Fig. 6.7), ao estirar, a molécula deve apresentar o mesmo comprimento de contorno em quaisquer direção e o intervalo de tempo para escapar do poço de potencial deve ser aproximadamente igual.

Após essa breve análise, o conjunto DNA-microesfera é retirado da região focal para que o mesmo retorne a sua posição de equilíbrio, ou seja, de máxima entropia. Uma vez na posição de equilíbrio, o conjunto é aprisionado na região focal, no caso, o potencial óptico. A captura das imagens é realizada por uma câmera *CCD* enquanto o deslocamento do estágio do microscópio através do piezoelétrico acontece de forma simultânea.

O biopolímero pode ser estirado movendo-se o estágio do microscópio enquanto a microesfera permanece aprisionada no potencial óptico. As medidas de deslocamento ( $\Delta x$ ) da microesfera são realizadas enquanto esta encontra-se dentro do poço de potencial usando-se videomicroscopia. Importante ressaltar que, a pinça óptica é previamente calibrada, isto é, a constante de força da pinça  $k$  é determinada, de maneira que, a força aplicada sobre a microesfera pode ser calculada através da relação  $F = k\Delta x$  [179].

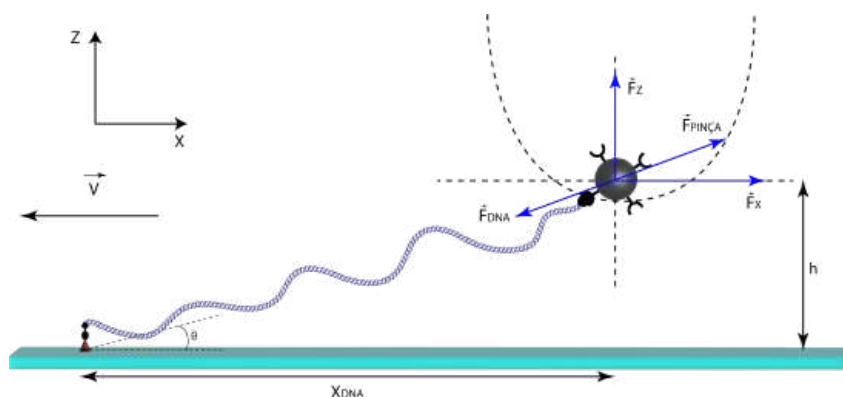


Figura 6.9 – Estiramento do DNA ao longo de sua extensão.

A altura  $h$  da microesfera em relação à lamínula é a fixa,  $h = 4,4 \mu\text{m}$ , a velocidade que o piezoelétrico se desloca é constante, sendo,  $v = 0,1 \mu\text{m/s}$ . A força exercida pela pinça na microesfera possui duas componentes: força axial, perpendicular à lamínula e a força transversal, paralela à lamínula (sendo o eixo  $x$  na direção do plano) como pode ser observado na Fig. (6.9).

O experimento é realizado em um regime quasi-estático, tendo em vista que, a velocidade é constante e de baixa intensidade ( $v = 0,1 \mu\text{m/s}$ ) e, portanto, a força de Stokes pode ser desprezada. Consequentemente, a molécula de DNA exercerá força sobre a microesfera. A força que o DNA exerce sobre a microesfera possui mesma intensidade que a força da pinça óptica.

Com este procedimento é possível determinar a curva de força em função da extensão (FEC<sup>12</sup>) da molécula de DNA e dos seus complexos formados com o fármaco em diferentes condições (força iônica, pH, concentração do fármaco, etc). De modo que, o experimento é realizado no regime entrópico, aplicando forças máximas abaixo de  $2 \text{ pN}$ . Por ser uma força de baixa intensidade, há garantia que os complexos estão próximos das condições de equilíbrio e que a físico-química da interação é independente das forças aplicadas.

As curvas experimentais obtidas são analisadas através do modelo WLC, sendo suas soluções exata e aproximada obtidas por Marko-Siggia [132], como exemplificado na Fig. (6.10), onde a linha sólida em preto corresponde ao modelo WLC e os pontos em vermelho correspondem aos dados experimentais. As curvas de força do DNA puro (sem fármaco) até a análise do comportamento global do complexo DNA-fármaco são feitas no programa KaleidaGraph. Os parâmetros mecânicos do  $\lambda$ -DNA citados na seção (3.3), podem ser observados Fig. (6.10), onde  $m_1$  denota o comprimento de persistência e  $m_2$  o comprimento de contorno.

<sup>12</sup> Do inglês, force extension curve.

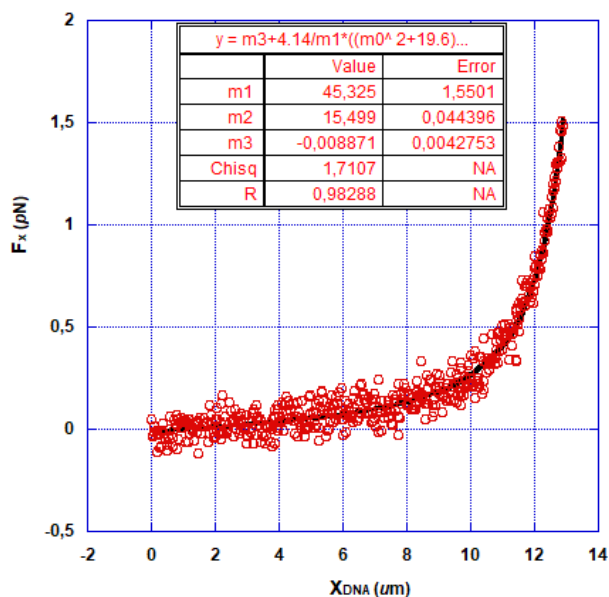


Figura 6.10 – Curva de força típica de uma molécula de DNA.

Para uma análise confiável, os parâmetros do DNA puro devem estar dentro dos limites apontados na literatura, onde o comprimento de persistência ( $A$ )  $\sim 45 \pm 5 \text{ nm}$  e comprimento de contorno ( $L$ )  $\sim 16 \pm 2 \mu\text{m}$  podem ter uma pequena variação, sendo possível observar o padrão da FEC ao se estirar cinco vezes a molécula de DNA. Após encontrar uma configuração adequada, com os parâmetros mecânicos dentro do esperado, a solução tampão é retirada e em seguida adiciona-se a solução contendo o fármaco. As soluções/alíquotas são trocadas e o complexo é analisado de acordo com as condições que são submetidos.

Portanto, os parâmetros mecânicos podem ser utilizados como sensores para detectar as interações e, com modelos apropriados, até mesmo a físico-química completa destas interações pode ser extraída a partir das medidas do comprimento de contorno e comprimento de persistência [180].

É importante ressaltar que este é um experimento de molécula única, com isso, todas as trocas de alíquotas são realizadas com o intuito de analisar as mudanças nos parâmetros mecânicos e propriedades físico-químicas que ocorrem em uma única molécula de DNA durante a formação do complexo fármaco - DNA.

## VII Eletroforese em gel

A eletroforese em gel é uma técnica empregada em áreas como biologia molecular, bioquímica, biofísica molecular etc. Utilizada de forma rotineira para separar fragmentos de proteínas, DNA ou RNA e também como ferramenta no diagnóstico de genética molecular via análise de produtos das reações em cadeia polimerase (PCR) [181, 41], o método foi desenvolvido por Wilhelm Tiselius para separar quatro componentes do plasma (albumina,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  globulina) e lhe rendeu o Prêmio Nobel em Química no ano de 1948 [182].

Há diversos tipos de eletroforese, contudo, o objetivo deste capítulo é explicar de forma prática a eletroforese em gel de agarose, uma das técnicas usadas no desenvolvimento deste trabalho.

A técnica consiste em uma matriz de gel de agarose, solução eletrolítica, cuba para corrida eletroforética e uma fonte de tensão (Fig. 7.1). A agarose é um tipo polímero, especificamente um polissacarídeo comumente usado na separação de moléculas longas ( $> 20\text{Kbp}$ ), como o DNA, a solução eletrolítica é uma solução condutora de corrente elétrica e preparada a partir de um tampão específico<sup>1</sup>, a cuba comporta a solução eletrolítica, a matriz de gel com as amostras devidamente alocadas nos poços e os eletrodos que estão ligados a fonte de tensão [181].

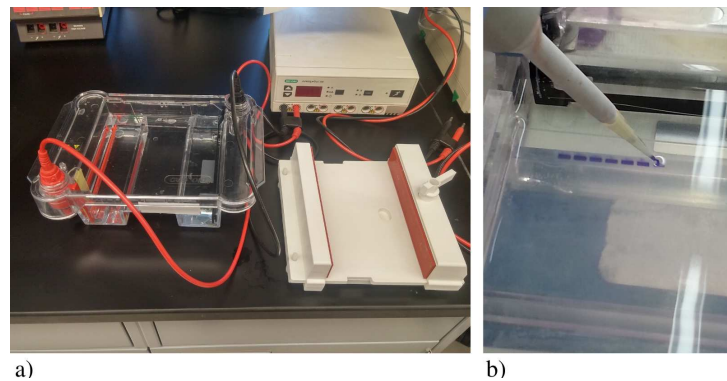


Figura 7.1 – a) Cuba e fonte de eletroforese. b) Matriz de gel e amostras alocadas nos poços.

A corrida eletroforética consiste na migração das moléculas de DNA através do gel, e obedece diferentes leis de acordo com a intensidade do campo elétrico  $\vec{E}$ , o tamanho das moléculas, e a concentração da agarose para preparar o gel [183]. No gel, a distância entre as bandas de DNA com comprimento de contorno ( $L$ ) qualquer é determinada pela porcentagem de agarose, haja vista que, a matriz é formada por poros e o tamanho destes irá variar de acordo com a concentração da agarose (Fig. 7.2). A maioria dos géis são

<sup>1</sup> Neste trabalho foi usado o tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA).

preparados em concentrações que podem variar entre 0.7%, para uma boa separação ou resolução de fragmentos de DNA contendo de 5-10 Kbp e 2% para uma boa resolução de fragmentos contendo 20-100 Kbp. A concentração de agarose comumente usada para o preparo do gel é  $\sim 1\%$  [183, 181].

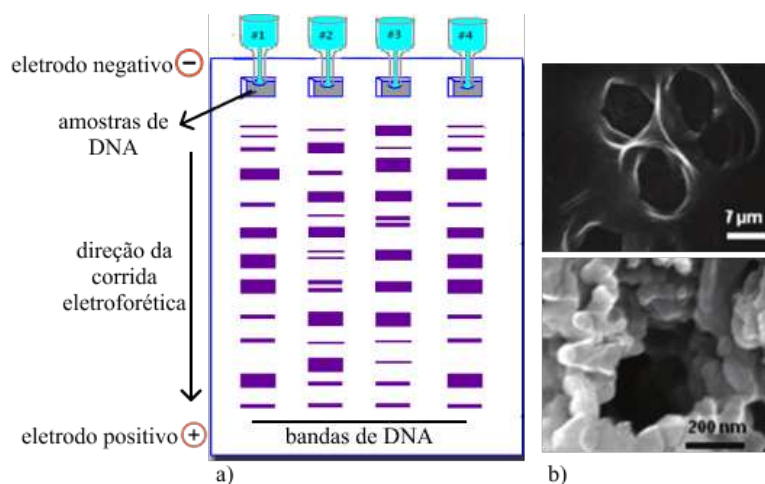


Figura 7.2 – a) Divisão das bandas de DNA de acordo com o tamanho das moléculas. b) A matriz de agarose é formada por uma rede de poros com tamanhos diferentes [184].

Para analisar as amostras de DNA após a corrida eletroforética, a matriz de gel é inserida em um transluminador de luz ultravioleta, que possibilita a visualização das amostras (Fig. 7.3) através de um marcador molecular fluorescente [181].

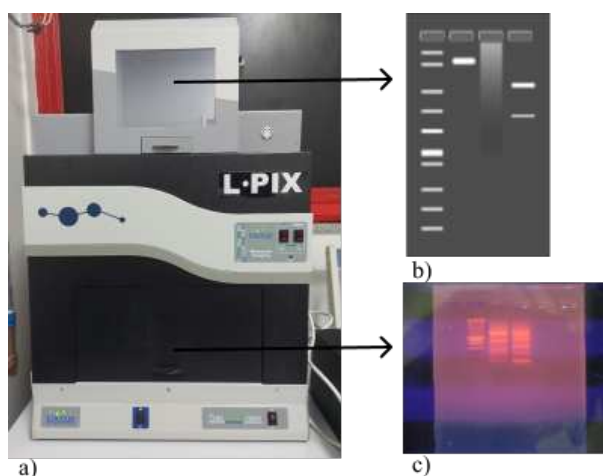


Figura 7.3 – a) Transluminador de luz UV. b) Imagem das bandas de DNA obtidas a partir da fluorescência do marcador molecular. c) Matriz de gel de agarose após a corrida eletroforética.

## 7.1 Procedimento experimental

### 7.1.1 Preparo matriz de agarose, solução eletrolítica e amostras DNA-CLQ

- Matriz de agarose

A matriz de gel é produzida no dia do experimento, com agarose a 1%. Sua composição está descrita na Tabela (7.1).

Tabela 7.1 – Gel de agarose.

Matriz de gel
1 g Agarose
10 mL TAE (1×)
90 mL H <sub>2</sub> O DI

A solução contendo TAE (1×), agarose e água deionizada é aquecida em um microondas até ficar translúcida, em seguida é arrefecida e inserida na cuba contendo o pente para moldar os poços após polimerização.

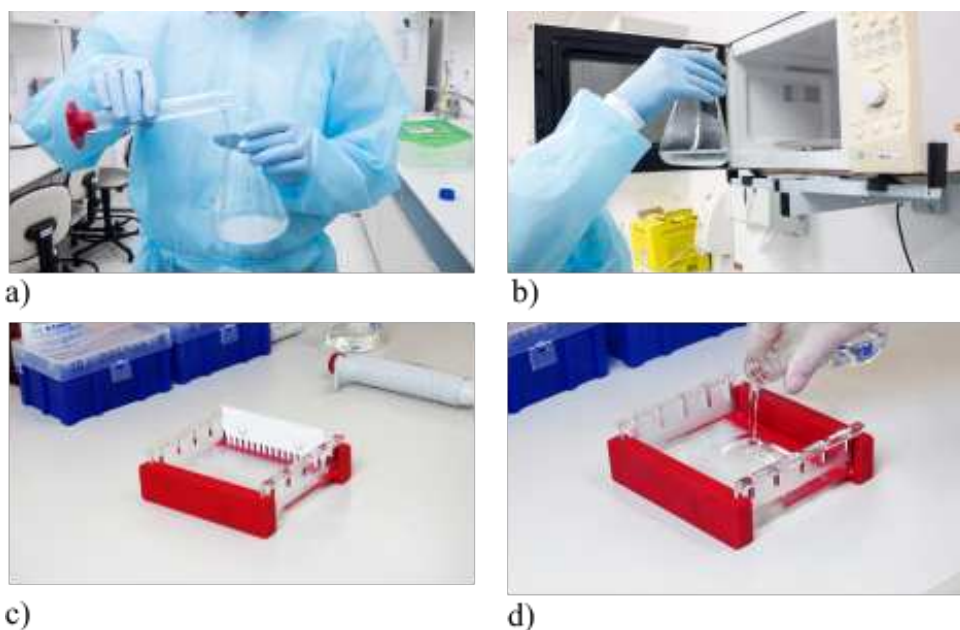


Figura 7.4 – a) Preparo da solução contendo TAE (1×), agarose e água DI. b) A solução é aquecida em um micro-ondas até ficar translúcida. c) A cuba contendo o pente para moldar os poços. d) A solução após arrefecida, é inserida na cuba contendo os pentes. As imagens foram obtidas em [185].

- Solução eletrolítica

A solução eletrolítica (TAE 1×) é preparada no dia do experimento e inserida na cuba eletroforética. Sua composição está descrita na Tabela (7.2). A solução de TAE (10×) é preparada e guardada como solução estoque.

Tabela 7.2 – Solução eletrolítica para corrida eletroforética.

TAE (10×)	TAE (1×)
1 g EDTA	60 mL TAE (10×)
3,4 mL ácido acético	540 mL H <sub>2</sub> O DI
14,5 g Tris	–
300 mL H <sub>2</sub> O DI	–

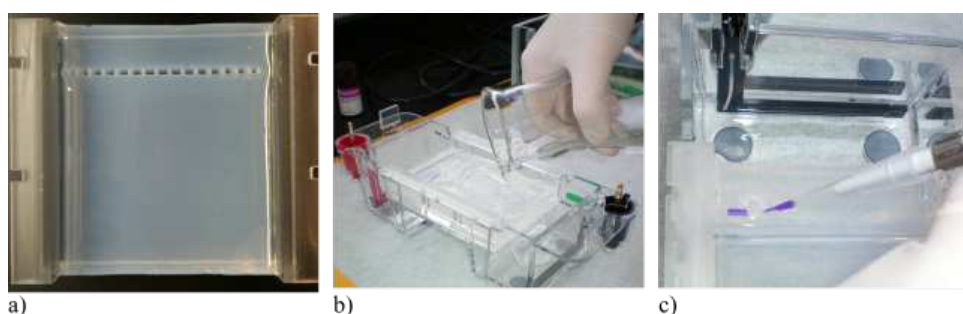


Figura 7.5 – a) Após polimerizar, a matriz de gel tem aspecto turvo, sua resistência é proporcional à concentração de agarose usada, o pente é retirado e é possível ver a formação dos poços. b) A solução eletrolítica (TAE 1×) é inserida na cuba e a matriz de gel fica submersa na solução. c) As amostras para análise são inseridas com uma pipeta em cada poço. As imagens (b) e (c) foram obtidas em [186].

- Preparo amostras DNA-CLQ

O DNA usado nos experimentos de eletroforese em gel de agarose é de origem plasmidial, pUC19 (Thermo Scientific®). As soluções de CLQ foram diluídas de acordo com a Tabela (6.4).

Inicialmente, era preparado um mix contendo DNA, PBS e GelRed<sup>2</sup>, como descrito na Tabela 7.3. A matriz de gel continha 8 poços, conseqüentemente, o volume total do mix era de 80  $\mu\text{L}$  para ser dividido igualmente em 8 microtubos, então adicionava-se a solução de CLQ e por fim, o azul de bromofenol (corante).

Tabela 7.3 – Mix DNA-GelRed.

Mix	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Total ( $\mu\text{L}$ )
DNA	3	24
PBS	5	40
GelRed	2	16

<sup>2</sup> GelRed é um corante bis-intercalante usado em experimentos de eletroforese em gel de agarose [187].

Após 30 minutos de reação entre DNA e o GelRed, era adicionada a CLQ. Cada microtubo tinha um volume total de 20  $\mu\text{L}$  por amostra, sendo 10  $\mu\text{L}$  de mix, 5  $\mu\text{L}$  de CLQ por concentração e 5  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol.

### 7.1.2 Corrida eletroforética

A corrida eletroforética consiste na migração das moléculas de DNA através do gel de agarose ao se aplicar uma diferença de potencial. Na Fig. (7.6) é possível observar todo esquema montado para a execução da corrida.

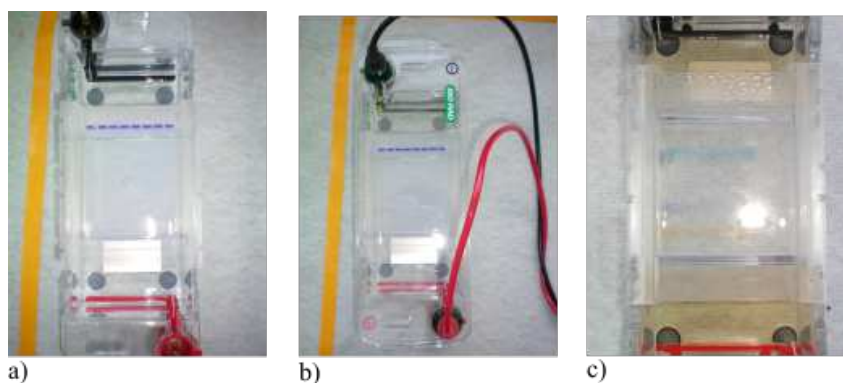


Figura 7.6 – a) Cuba contendo solução eletrolítica, gel de agarose e amostras de DNA. b) Eletrodos são ligados à cuba para que seja aplicada uma diferença de potencial. c) Ao se aplicar a diferença de potencial, um campo elétrico é gerado e as moléculas de DNA são deslocadas no gel. As imagens foram obtidas em [186].

Por fim, após a corrida, o gel é retirado da cuba eletroforética e levado ao transluminador, onde é possível ver as bandas do DNA, como pode ser observado na Fig. (7.7).

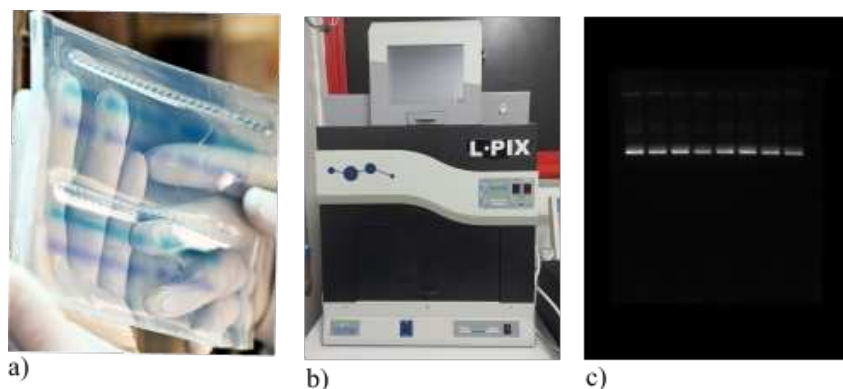


Figura 7.7 – a) Conformação do gel após corrida. b) Transluminador UV. c) Imagem obtida de um gel através do transluminador.

A partir das imagens obtidas, é possível avaliar a intensidade relativa de fluorescência das bandas de DNA e comparar com os resultados obtidos nos experimentos de pinça óptica.

## VIII Cultura de células

O cultivo celular consiste em um conjunto de técnicas que envolve isolamento, manutenção da viabilidade e proliferação das células de um determinado tecido (animal ou vegetal) em ambiente artificial (*in vitro*). O sistema *in vitro* é composto de nutrientes e fatores essenciais para sobrevivência das células, é mantido em condições controladas de temperatura, pH, osmolaridade e humidade. Em suma, a técnica permite manter e estudar o comportamento das células vivas fora do organismo de origem [188].

Wilhelm Roux, um zoólogo e embriologista realizou a primeira tentativa de cultivar células embrionárias de galinha, mantendo-as em uma solução salina aquecida por vários dias, introduzindo assim, o princípio básico da cultura de tecidos. Posteriormente, vários cientistas dedicaram-se ao estudo do cultivo de diferentes linhagens celulares [188, 189].

Por serem modelos experimentais simplificados, informativos e largamente empregados nas pesquisas, a cultura de células tornou-se uma fonte de estudos nas áreas de terapia celular, desenvolvimento fármacos, produção de vacinas, clonagem, terapia gênica etc. O principal benefício do cultivo celular é a consistência e reprodutibilidade dos resultados, que podem ser obtidos ao usar um lote de células imortalizadas [190].

### 8.1 Linhas celulares

#### 8.1.1 Melan-a

É uma linhagem derivada da pele embrionária de camundongos (C57BL/6J<sup>1</sup>), sendo a primeira linha de melanócitos de camundongos não tumorigênico estabelecida [192]. Os melanócitos são células pigmentares, i.e., são responsáveis por produzir um pigmento denominado melanina. Estas células estão distribuídas na pele, ao longo da camada basal da epiderme, nos folículos pilosos, em superfícies epiteliais e nos olhos [193].

O cultivo da linhagem Melan-a tem como principal objetivo estudar variados tipos de câncer de pele, haja vista que os melanócitos são células idênticas às células do melanoma B16 e suas sublinhas, fornecendo assim um excelente parâmetro não tumorigênico para estudos celulares e moleculares do melanoma. Em suma, analisa a diferença entre as células do melanoma e as células normais equivalentes, os melanócitos [194].

O melanoma maligno é uma das neoplasias mais agressivas em humanos, sendo responsável por 60% a 80% dos óbitos causados por câncer de pele. Embora, muitos genes envolvidos no desenvolvimento dos melanócitos podem ter relação com o desenvolvimento do melanoma, ainda não está evidente como um melanócito normal torna-se uma célula

<sup>1</sup> Linhagem endogâmica mais utilizada em estudos científicos, abrangendo áreas como biologia cardiovascular e do desenvolvimento [191].

de melanoma [195].

### 8.1.2 VERO

É uma linhagem estabelecida e imortalizada a partir de células oriundas do rim de um macaco adulto, o *Cercopithecus aethiops* (African green monkey<sup>2</sup>). É uma linha celular contínua (CCL), ou seja, possui as características de origem e alta proliferação, permitindo assim extensa caracterização celular e criação de grandes bancos de células [196, 197].

São suscetíveis a infecção de diversos tipos de vírus (*Adenovírus*, *Rotavírus*, *Zika vírus*, *Hepatite A*) e toxinas bacterianas (*Toxina diftérica* e *Shiga*). Por ter sensibilidade a vários tipos de vírus e ser uma linhagem celular contínua, a Vero é usada no estudo de diversos patógenos emergentes<sup>3</sup>, assim como, para produção de vetores virais e vacinas [198].

É importante ressaltar que a Vero foi a primeira linhagem celular contínua a ser aprovada pela OMS para fabricação de vacinas virais para uso em humanos. Alguns exemplo de vacinas à base de células Vero são, Ervebo®, contra o vírus Ébola e IMO-VAX Polio®, contra a Poliomelite, entre outras. Outro ponto importante, é o uso dessa linhagem para ensaios citotóxicos e testes de novos fármacos [199, 200, 201].

### 8.1.3 HEK-293

É uma linhagem oriunda de células renais embrionárias [202]. É a segunda<sup>4</sup> linhagem celular humana mais utilizada nas áreas de biologia celular e biotecnologia, pois podem sintetizar proteínas semelhantes as produzidas naturalmente por seres humanos [204]. Além de ser usada em uma ampla gama de experimentos, incluindo estudos de interação de proteínas, produção rápida de proteínas em pequena escala e produção biofarmacêutica [205].

Por ser um sistema que apresenta grande versatilidade, a HEK-293 tornou-se uma plataforma de cultura celular utilizada na terapia gênica para a produção de vetores virais recombinantes, proteínas recombinantes, vacinas, e várias formas de VLPs [206, 207, 208]. Além de seu uso como modelo tumoral para ensaios de transformação *in vitro* e *in vivo* [209]. Outro fator relevante é a utilização dessa linhagem celular para ensaios citotóxicos de fármacos e efeitos nanotóxicos [210, 211, 212].

## 8.2 Ensaio de citotoxicidade

Um dos indicadores mais importantes para a avaliação biológica em estudos *in vitro* é a citotoxicidade. Os níveis de viabilidade e/ou proliferação celular são bons in-

<sup>2</sup> Em tradução livre, macaco verde africano.

<sup>3</sup> Influenza H5N1, MERS-CoV, Zika vírus etc.

<sup>4</sup> A primeira linhagem celular humana mais utilizada é a HeLa [203].

dicativos de saúde das células, uma vez que, *in vitro*, agentes químicos como fármacos e pesticidas possuem diferentes mecanismos de destruição das membranas celulares, prevenção de síntese de proteínas, interações irreversíveis etc. Para determinar a morte celular causada por estes mecanismos, faz-se necessário testes citotóxicos de curto prazo, fiáveis, reproduzíveis, etc [213].

De maneira geral, o teste de citotoxicidade fundamenta-se em expor uma substância direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células, avaliando-se as modificações celulares através de diferentes mecanismos, como ensaios colorimétricos. Um dos critérios mais usados para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular [214]. A viabilidade celular é definida como o número de células saudáveis em uma amostra, sendo a proliferação celular um indicador vital para compreender os mecanismos da ação de genes, proteínas e vias que resultam na sobrevivência ou morte celular após exposição a agentes tóxicos [215].

Existem diferentes classificações para citotoxicidade e ensaios de viabilidade celular disponíveis, sendo classificados de acordo com o tipo de medida a ser realizada (alteração da cor, fluorescência, luminescência, etc) e são divididos em quatro tipos [213]:

- Ensaio de exclusão de corante: Azul de tripano, eosina, vermelho Congo e ensaios de eritrosina B;
- Ensaios colorimétricos: Ensaio de MTT, MTS, XTT, WST-1, WST-8, LDH, SRB, NRU e cristal violeta;
- Ensaios fluorométricos: Ensaio AlamarBlue e CFDA-AM;
- Ensaios luminescentes: Ensaio de ATP e viabilidade em tempo-real.

Neste trabalho, foi usado o ensaio de redução de MTT para medida de viabilidade celular e proliferação celular. Diante disso, daremos ênfase apenas para este método.

O ensaio de redução de MTT foi desenvolvido por Tim Mosmann para quantificar células vivas utilizando sais de tetrazólio [216]. Para melhor compreensão, o teste é baseado na biorredução do sal de tetrazólio (composto de tonalidade amarela, solúvel em água) em cristais de formazan (composto de tonalidade roxa, insolúvel em água). A biorredução é realizada através das enzimas desidrogenases, localizadas no interior das mitocôndrias, permitindo assim avaliar a atividade metabólica celular. O uso deste ensaio é padrão quando o objetivo de avaliar o efeito citostático de algum composto citotóxico [217, 218].

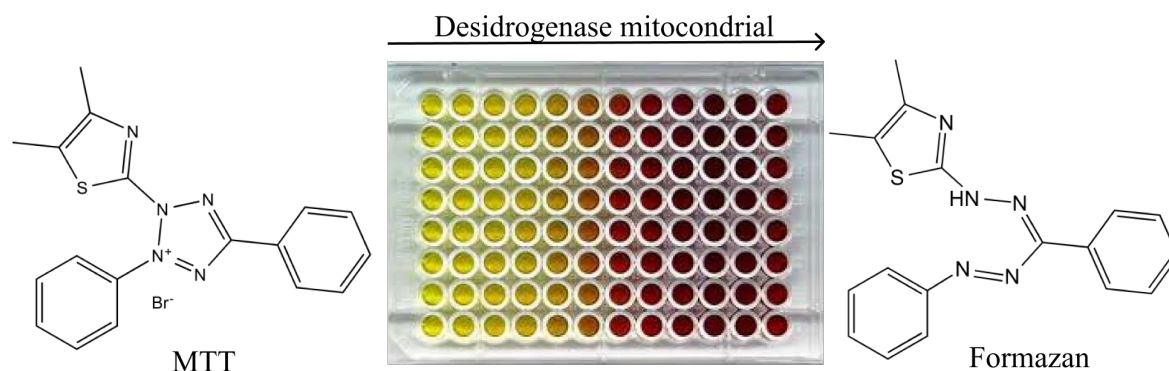


Figura 8.1 – A molécula de MTT apresenta tom amarelo ao ser inserida em cultura celular. Com a biorredução realizada pelas enzimas desidrogenases, há formação de cristais de formazan, que possuem tonalidade arroxeada [216, 219].

A atividade das enzimas desidrogenases é essencial para que ocorra a biorredução, tendo em vista que a produção dos cristais de formazan é proporcional ao número de células viáveis em cada poço, sendo então possível mensurar a quantidade de células vivas e os efeitos citotóxicos do composto [217, 220]. Vale ressaltar que a produção dos cristais de formazan depende da concentração de MTT existente no meio de cultura e por ser um cristal insolúvel em água, faz-se necessário uso de um solvente orgânico, o DMSO para dissolvê-los [221, 222]. O formazan pode ser solubilizado e quantificado por espectrofotometria com comprimento de onda de 570 nm, onde processos metabólicos como apoptose ou necrose que levam a diminuição da viabilidade celular podem ser quantificados [223].

Com os resultados obtidos nos ensaios de redução de MTT é possível avaliar a viabilidade celular e obter os valores da concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) [224]. A concentração inibitória média é uma medida de potência, isto é, representa a concentração de uma substância necessária para inibir um processo biológico *in vitro* em 50% [225]. De maneira experimental, os valores de IC<sub>50</sub> podem ser determinados ao construir uma curva dose-resposta<sup>5</sup> e examinar os efeitos de diversas concentrações de uma substância em uma linhagem celular, sendo um dos parâmetros mais importantes para comparar o potencial ou eficácia de um composto [227].

## 8.3 Procedimento experimental

### 8.3.1 Linhagens celulares

Nesse estudo foram utilizadas três linhagens celulares: VERO (ATCC® CCL-81™), derivada de Células renais de primatas (*Cercopithecus aethiops*), Melan -a (Xim-

<sup>5</sup> A curva dose-resposta descreve a magnitude/comportamento de um organismo em função da dose/concentração a um estímulo ou agente estressor (em geral substâncias tóxicas ou fármacos) após um período de exposição [226].

bio®, 153599™), derivada de Células de pele murina (*Mus musculus*), a HEK-293 (Ximbio®), derivada de Células renais humanas (*Homo sapiens sapiens*).

As três linhagens citadas são semiaderentes.

### 8.3.2 Condições de cultivo

As linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de SFB (Gibco®), 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich®), e 0,0025% de anfotericina B (Sigma-Aldrich®). As células foram crescidas em frascos apropriados para cultivo de linhagens semiaderentes e mantidas em estufa de cultivo com temperatura a 37 °C, atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, e 95% de umidade relativa.

### 8.3.3 Ensaio de viabilidade celular

Para determinar a citotoxicidade do fármaco na linhagem HEK-293 foi utilizada placa de 24 poços contendo  $6 \times 10^4$  de células/poço (Fig.8.2). Para os testes com as linhagens VERO e melan-a, foram utilizadas placas de 96 poços contendo  $7 \times 10^3$  de células/poço.

As concentrações testadas nos ensaios foram 0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M, 5.0  $\mu$ M, 10.0  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ M, 25.0  $\mu$ M e 50.0  $\mu$ M de CLQ.

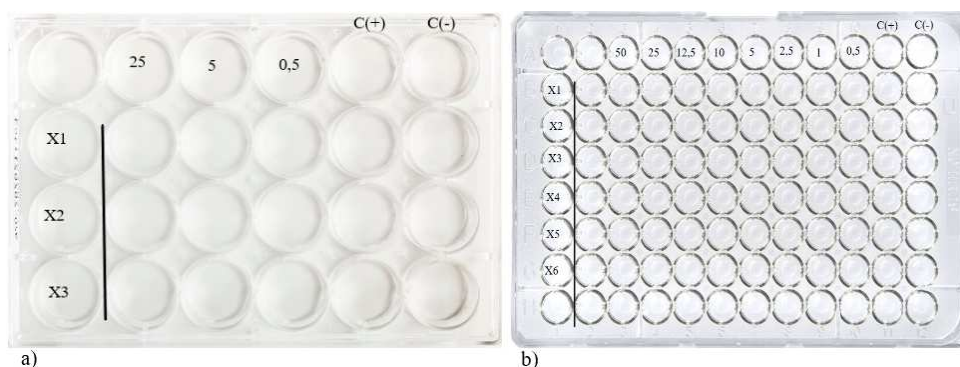


Figura 8.2 – a) Placa com 24 poços; b) placa com 96 poços.

Após 72 horas em condições de cultivo, o meio de cultura de cada poço da placa foi trocado por solução de MTT (Sigma-Aldrich®) na concentração de 5 mg/mL diluído em meio de cultura completo (30% solução de MTT e 70% de meio completo). Após 4 horas em condições de cultivo, em local sem luz, a solução de MTT (3:7) foi substituída por DMSO (Sigma-Aldrich®) puro e, logo após a placa foi submetida a leitura no espectrofotômetro SpectraMax® usando o comprimento de onda de 570 nm.

### 8.3.4 Cálculo da viabilidade celular e análise estatística

Os dados obtidos na espectroscopia de absorção foram utilizados para calcular a viabilidade celular dos tratamentos e dos grupos controles controle, através da equação

$$\text{Viabilidade}(\%) = \frac{(\text{média AT} - \text{média ACN})}{(\text{média ACP} - \text{média ACN})} \times 100 \quad (8.1)$$

onde AT, ACN e ACP são as médias dos valores de absorbância do tratamento, controle negativo e controle positivo, respectivamente.

Para construção dos gráficos de porcentagem da viabilidade celular *vs* concentração, assim como o cálculo da concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>), utilizou-se o Software Graphpad Prism 5® [224].

A significância estatística entre os tratamentos foi calculada utilizando os testes ANOVA one-way para tratamentos com 3 ou mais variáveis e teste Turkey *a posteriori*, e p-valores menores que 0,05 foram considerados significativos. A análise dos dados foi feita através do software Graphpad Prism 5® [224].

## IX Resultados e discussões

### 9.1 Resultados - Pinça óptica

#### 9.1.1 A espectroscopia de força revela as peculiaridades da interação DNA-CLQ

##### 9.1.1.1 Curvas de força vs extensão (FEC)

Os experimentos de molécula única foram realizados em meios com força iônica diferentes, que corresponde a concentrações diferenciadas de  $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$  e  $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$ , descritos na Tabela (6.3). De maneira que as diferentes curvas de força foram obtidas a partir de variadas concentrações de CLQ. As linhas sólidas correspondem ao modelo WLC e os dados experimentais foram ajustados através da equação de Marko-Siggia, de onde são extraídos os parâmetros mecânicos, como demonstrado na subseção (6.3.6).

Nas Fig. (9.1) e (9.2) podemos observar as alterações nas curvas de força obtidas em meio aquoso com diferentes forças iônicas e variadas concentrações de CLQ.

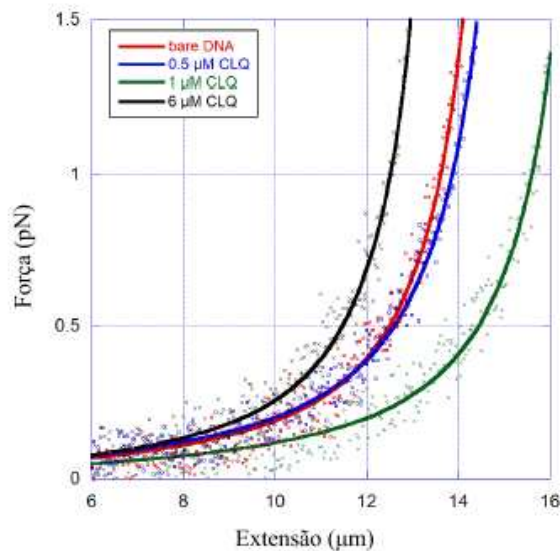


Figura 9.1 – Curvas de força obtidas a partir de diferentes concentrações de CLQ em meio com alta força iônica,  $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ . A curva em vermelho representa os dados do DNA nativo.

Na Fig. (9.1) as curvas de força da molécula de DNA em meio aquoso com alta força iônica não apresentaram um comportamento linear, haja vista que houve aumento da extensão da molécula em concentração de CLQ a  $1 \mu\text{M}$ , enquanto a concentração de CLQ a  $6 \mu\text{M}$  diminuiu sua extensão.

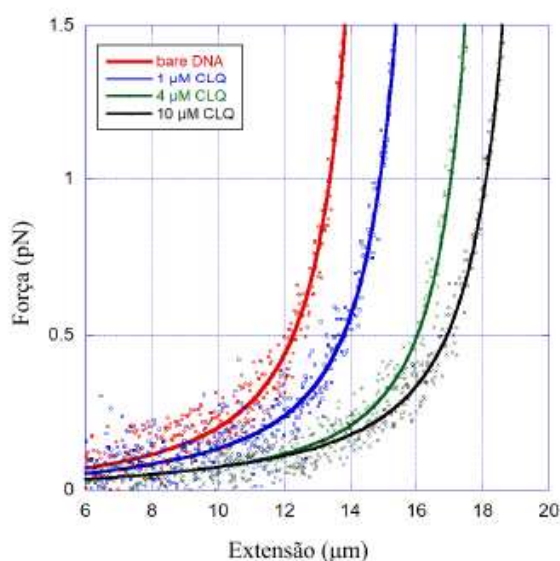


Figura 9.2 – Curvas obtidas a partir de diferentes concentrações de CLQ em meio com baixa força iônica,  $[Na] = 1$  mM. A linha curva em vermelho representa os dados do DNA nativo.

Em contrapartida, na Fig. (9.2) as curvas de força da molécula de DNA em meio aquoso com baixa força iônica, é possível observar o aumento da extensão da molécula ao aumentar a concentração da CLQ.

#### 9.1.1.2 Propriedades mecânicas dos complexos DNA-CLQ

A formação dos complexos DNA-CLQ em função da concentração do fármaco ao se utilizar dois meios com diferentes forças iônicas apresentaram resultados relevantes. Os parâmetros mecânicos, comprimento de persistência  $A$  e comprimento de contorno  $L$  extraídos evidenciam que ambos sofreram alterações significativas sob diferentes concentrações da CLQ e força iônica do meio. Como pode ser observado nas próximas figuras desta subseção.

Na Fig. (9.3), é possível observar que o comprimento de persistência da molécula de DNA apresenta uma leve alteração em meio aquoso com alta força iônica  $[Na] = 150$  mM, praticamente dentro das barras de erro.

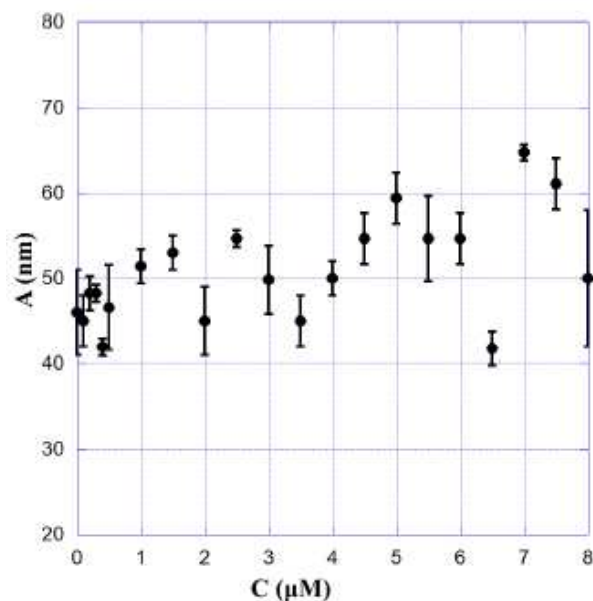


Figura 9.3 – Comprimento de persistência do complexo DNA-CLQ formado em função das concentrações da CLQ em meio aquoso com alta força iônica  $[\text{Na}] = 150$  mM.

Entretanto, na Fig. (9.4), o comprimento de persistência da molécula de DNA apresenta um aumento mais significativo em função das concentrações de CLQ ( $\sim 5\mu\text{M}$ ) em meio com baixa força iônica  $[\text{Na}] = 1$  mM, havendo um decréscimo muito leve, e permanecendo constante em concentrações mais altas.

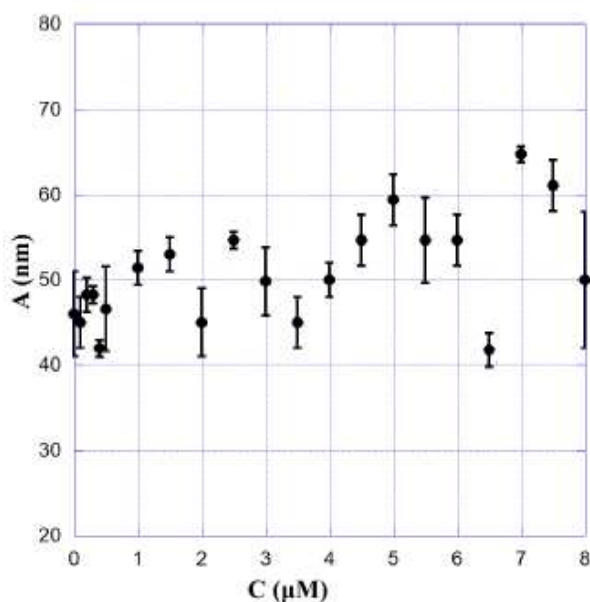


Figura 9.4 – Comprimento de persistência do complexo DNA-CLQ formado em função das concentrações da CLQ em meio aquoso com baixa força iônica  $[\text{Na}] = 1$  mM.

Quanto ao comprimento de contorno, na Fig. (9.5) a molécula de DNA apresenta

um aumento inicial significativo com concentrações de CLQ baixas ( $< 1 \mu\text{M}$ ), seguido de um decréscimo imediato para concentrações mais elevadas em meio com alta força iônica  $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ .

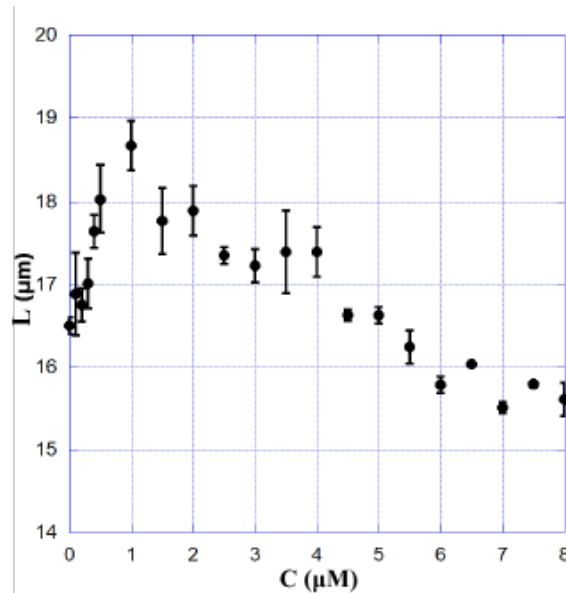


Figura 9.5 – Comprimento de contorno do complexo DNA-CLQ formado em função das concentrações de CLQ em meio aquoso com alta força iônica  $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ .

Contudo, para baixa força iônica  $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$ , na Fig. (9.6) é possível observar que o comprimento de contorno apresenta um crescimento monotônico em função das concentrações de CLQ ( $\sim 10 \mu\text{M}$ ) até a saturação.

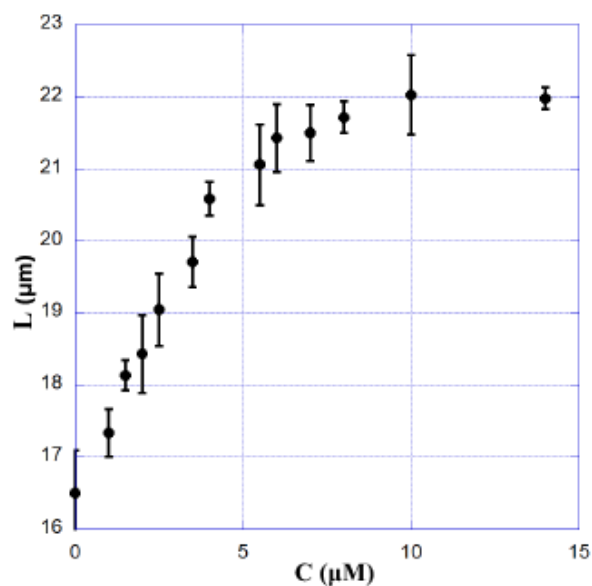


Figura 9.6 – Comprimento de contorno do complexo DNA-CLQ formado em função da concentração da CLQ em meio aquoso com baixa força iônica  $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$ .

O comportamento dos comprimentos de contorno e de persistência sob diferentes forças iônicas em função de variadas concentrações de CLQ, sugere que há mudanças

consideráveis nas forças motrizes que regem as interações, de forma que o principal modo de interação depende diretamente da força iônica do meio.

### 9.1.1.3 A físico-química da interação DNA-CLQ

- Baixa força iônica ( $[Na] = 1 \text{ mM}$ )

Diante do exposto na subseção (9.1.1.2), o comportamento mecânico do complexo DNA-CLQ em função das concentrações de CLQ obtido em meio com baixa força iônica é o mais simples de interpretar, tendo em vista que possui comportamento semelhante a complexos de DNA formados com moléculas tipicamente intercalantes sob o mesmo regime entrópico de baixas forças usado aqui nos experimentos realizados [175, 228].

O crescimento monotônico verificado no comprimento de contorno observado na Fig. (9.6), é a principal característica (considerada a "*assinatura*") do modo de ligação intercalante de um composto, sendo usado para extrair parâmetros de ligação (físico-químicos) da interação [229, 230]. De maneira que o aumento da fração do comprimento de contorno pode ser calculada em função de  $\Theta$ , assim:

$$\Theta = \frac{L - L_0}{L_0} \quad (9.1)$$

onde,  $L$  é o comprimento de contorno para uma dada concentração do fármaco e  $L_0$  é o comprimento de contorno do DNA nativo medido sem adição do fármaco na amostra.

No caso de moléculas intercalantes, o aumento fracionário do comprimento de contorno é diretamente proporcional à fração do ligante ligado na dupla-hélice, de maneira que essa fração pode ser associada a uma isoterma de ligação e, por consequência, a físico-química do complexo pode ser analisada [180].

Na seção (5.4) foi descrito o modelo de McGhee-von Hippel para o caso de ligantes que não apresentam cooperatividade entre si. A isoterma de ligação do modelo, Eq. (5.25), tornou-se nos últimos anos o padrão ouro para analisar intercalantes, uma vez que capta com precisão os efeitos de exclusão de vizinhos reproduzidos por estas moléculas ao interagir com o DNA [180, 231, 229]. Com isso, a isoterma de McGee-von Hippel pode ser escrita em termos de  $\Theta$ , logo:

$$C_T = \frac{C_{bp}}{\gamma} \Theta + \frac{\Theta(\gamma - N\Theta + \Theta)^N - 1}{K_i(\gamma - N\Theta)^N} \quad (9.2)$$

onde  $C$  e  $C_{bp}$  são, respectivamente, as frações de intercalantes e pares de bases do DNA na amostra,  $\gamma$  a fração entre o aumento do sítio de ligação causado por um intercalante e a distância média entre pares de bases consecutivos (em geral,  $\gamma \sim 1$ ),  $K$  a constante de ligação de associação e  $N$  o parâmetro de exclusão ou tamanho do sítio de ligação, o número efetivo de pares de bases da dupla-hélice ocupados por um intercalante.

Ao calcularmos o valor de  $\Theta$  para cada concentração  $C$  de CLQ, pudemos obter a

FEC (Fig. 9.7) a partir dos dados obtidos na Fig. (9.6). De maneira que, no eixo  $y$  tem-se a concentração  $C$  e no eixo  $x$  os valores de  $\Theta$ , ajustados de acordo com a Eq. (9.2). Esse ajuste pode ser observado na Fig. (9.7), de modo que a isoterma de ligação corrobora os dados experimentais obtidos, permitindo a determinação dos parâmetros de ligação  $K$  e  $N$ .

Sendo, constante de associação da ligação  $K = (3 \times 10^5 \text{ M}^{-1})$  e o tamanho dos sítios de ligação  $N = 2.2 \pm 0.1$ . Para ambos os parâmetros, estes resultados estão de acordo com os valores típicos verificados para maioria dos intercalantes sob condições experimentais semelhantes [180, 232, 175].

O comportamento do comprimento de persistência do complexo DNA-CLQ medido em baixa força iônica e observado na Fig. (9.4) é muito similar a outros intercalantes sob as mesmas condições em experimentos de molécula única realizados no regime de baixas forças, i.e., no regime entrópico ( $< 5 \text{ pN}$ ) [175, 233]. Conseguimos de fato demonstrar que, o comprimento de persistência de complexos DNA-intercalantes é fortemente dependente da força [228].

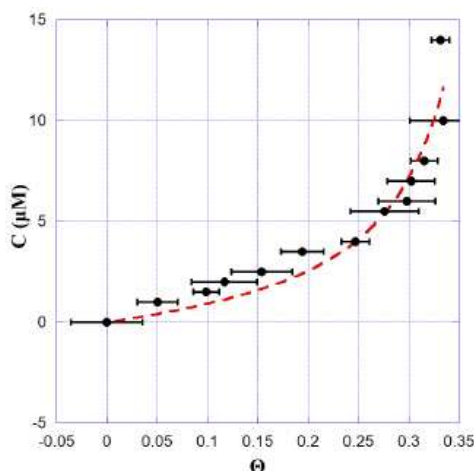


Figura 9.7 – Fração do comprimento de contorno extraída dos dados experimentais em baixa força iônica, com  $\Theta$  calculado para cada concentração de CLQ. A linha tracejada em vermelho é o ajuste feito com isoterma de ligação de McGhee-von Hippel. Esse ajuste permite determinar dois parâmetros de ligação importantes: a constante de associação da ligação  $K$  e o parâmetro de exclusão de vizinhos, também denominado tamanho do sítio de ligação  $N$ .

Estiramentos realizados sob regime entálpico, i.e., regime de altas forças ( $> 5 \text{ pN}$ ) de complexos DNA-intercalantes tende a desestabilizar sua estrutura, mesmo que seja usada concentrações baixas do intercalante, com isso, o comprimento de persistência aparente tende a ser menor que o comprimento de persistência do DNA nativo. Por outro lado, estiramentos realizados sob regime entrópico, i.e., regime de baixas forças, minimizam essa desestabilização, de forma que os resultados do comprimento de persistência obtidos neste regime tendem a coincidir com dados extraídos a partir de técnicas que

não usam forças para medir esse parâmetro, como viscosimetria [234], microscopia de fluorescência [235, 236], espalhamento dinâmico de luz etc [233].

Tais técnicas combinadas com a espectroscopia de força em regime entrópico, indicaram que o comprimento de persistência aumenta de acordo com as concentrações do intercalante ligado, e uma possível desestabilização do complexo DNA-intercalante ocorre apenas em altas concentrações, próximas à saturação do intercalante ligado [175].

Em suma, os resultados obtidos em baixa força iônica indicam fortemente que a CLQ comporta-se como um intercalante clássico, uma vez que os complexos formados com o DNA apresentam comportamentos mecânicos e propriedades físico-químicas fortemente compatíveis com este tipo de interação.

- Alta força iônica ( $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ )

O comportamento do complexo DNA-CLQ em alta força iônica é mais complexo, uma vez que a CLQ não apresenta comportamento de um intercalante clássico. Como citado na seção (5.5), a CLQ em meio com pH 7,4 apresenta-se majoritariamente como uma molécula dicatônica (+2) [70]. A diferença entre o comportamento complexo em baixa força iônica e alta força iônica está relacionada com a blindagem criada pelas interações eletrostáticas, que são peças fundamentais na interação DNA-CLQ.

Tem-se duas interações eletrostáticas relevantes para este sistema: (a) atrações eletrostáticas entre moléculas dicatônicas de CLQ e o esqueleto de açúcar-fosfato (que possui carga negativa) do DNA; e (b) a repulsão eletrostática entre as moléculas de CLQ em solução, que dificulta a agregação de moléculas CLQ-CLQ (formação de dímeros) em solução ou ligadas à dupla-hélice.

Com o aumento da força iônica, espera-se que a afinidade efetiva entre a CLQ e o DNA diminua devido à redução da atração eletrostática líquida, como consequência dos efeitos de blindagem devido a elevada concentração de contra-íons ( $\text{Na}^+$ ). Por outro lado, para a agregação de CLQ-CLQ, os contra-íons relevantes são ânions ( $\text{Cl}^-$ ) que aumentam drasticamente. Desse modo, o aumento da força iônica deve facilitar a agregação de moléculas CLQ-CLQ, aumentando a probabilidade de formar dímeros ou clusters de CLQ de ordem superior ligados ao DNA. Devido às suas dimensões, esses agregados não podem se comportar como intercalantes clássicos, e pelo menos uma fração deles deve se ligar à dupla-hélice, de forma semelhante a um ligante de fenda. Portanto, os pontos apresentados podem explicar as diferenças nos comportamentos do fármaco ao se alterar a força iônica do meio.

Outros tipos de ligantes exibem mecanismos de interação com o DNA semelhantes ao da CLQ. A Doxorrubicina, por exemplo, é um antibiótico antraciclínico utilizado para tratar vários tipos de cânceres. Demonstrou-se que este fármaco em pH quase neutro é moncatiônico (+1), tendo comportamento de intercalante clássico em baixa força iônicas, ligando-se individualmente entre os pares de bases ao longo da dupla-hélice. Contudo,

a Doxo em meio com alta força iônica forma agregados de três ou quatro moléculas ao interagir com o DNA [175]. Outro exemplo é a Cisplatina, um agente alquilante dicatiônico (2+), também usado em tratamentos quimioterápicos e que exibe o mesmo comportamento da CLQ, intercalando-se entre os pares de bases em baixa força iônica, e ao aumentar a força iônica do meio, há formação de agregados ao longo da dupla-hélice [237].

## 9.2 Resultados - Eletroforese em gel

As amostras para os experimentos de eletroforese continham moléculas de DNA pUC19, CLQ em diferentes concentrações (0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{L}$ , 1,5  $\mu\text{L}$ , 3  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 7  $\mu\text{L}$  e 10  $\mu\text{L}$ ), GelRed e azul de bromofenol, como descrito na Tabela (7.3) e PBS como descrito na Tabela (6.3). A mobilidade eletroforética dos complexos DNA-CLQ foi analisada em gel com agarose a 1%. Cada corrida foi realizada em uma cuba horizontal com tampão TAE sob diferença de potencial de 60 V durante uma hora, como indicado na Fig. (7.6).

As imagens foram obtidas usando um transluminador UV, com excitação de luz UV e um filtro passa-banda apropriado para coletar a fluorescência em  $(605 \pm 10)$  nm. Nenhuma fluorescência significante proveniente do complexo DNA-CLQ (sem GelRed) ou CLQ foi detectada nessa configuração usando este comprimento de onda, situação testada antes dos experimentos. As análises das intensidades das bandas foram feitas a partir do software livre ImageJ usando procedimento padrão [238, 239].

Os experimentos de eletroforese em gel de agarose foram realizados para complementar e confirmar as conclusões sobre as interações DNA-CLQ obtidas a partir dos experimentos de pinça óptica. Essa comparação é importante, pois a eletroforese em gel de agarose é uma técnica de múltiplas moléculas, enquanto a pinça óptica é uma técnica de molécula única (múltiplas moléculas  $\times$  molécula única).

Os resultados obtidos são apresentados na Fig. (9.8).

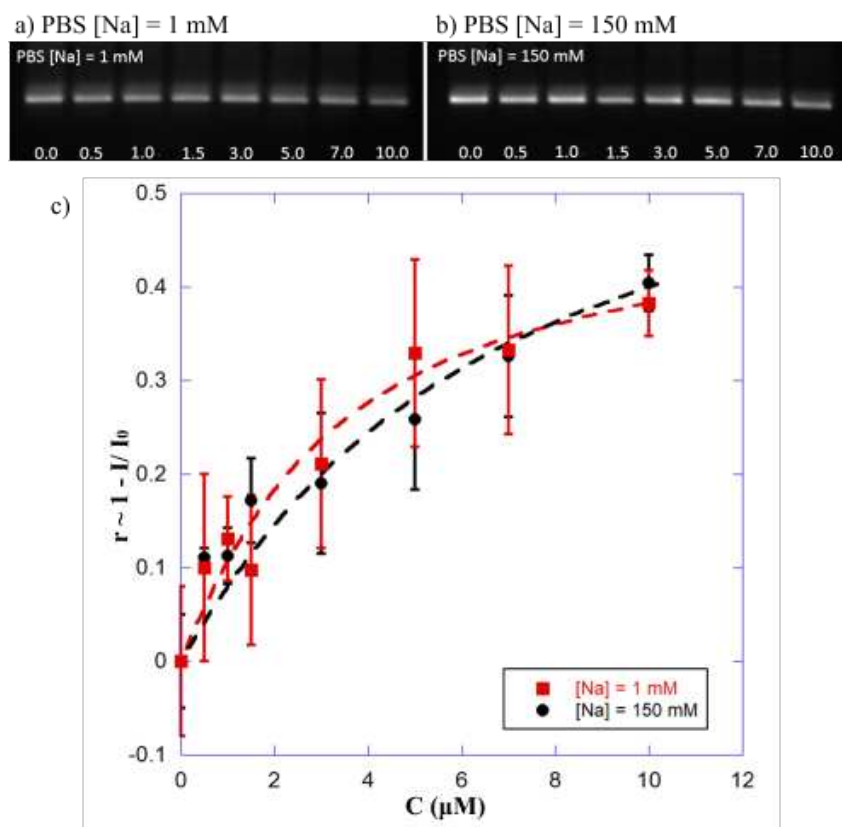


Figura 9.8 – (a-b) Apresentam imagens dos géis obtidas em PBS [Na] = 1 mM e PBS [Na] = 150 mM. A numeração abaixo de cada banda indica a concentração ( $\mu\text{M}$ ) de CLQ testada. c) Média dos dados de ligação extraídos a partir dos experimentos de eletroforese em gel. As linhas tracejadas indicam a isoterma de ligação McGee-von Hippel, de onde os parâmetros de ligação que caracterizam as interações são determinados.

A Fig. (9.8.a) apresenta imagem da matriz de gel de agarose contendo amostras em meio aquoso com baixa força iônica [Na] = 1 mM, ao passo que a Fig. (9.8.b) apresenta imagem da matriz de gel de agarose contendo amostras em meio aquoso com alta força iônica [Na] = 150 mM, ambas as imagens foram obtidas após a corrida eletroforética. A Fig. (9.8.c) mostra os dados de ligação extraídos dos experimentos de eletroforese em gel, sendo obtidos após realizar a média de quatro experimentos independentes para cada tampão, e as barras de erro foram estimadas como erro padrão dessas medições.

Nestas análises, consideramos que a fração de ligante ligado  $r$  (dado pela Eq. 5.7) é proporcional a quantidade  $(1 - I/I_0)$ , onde  $(I_0)$  é a intensidade da primeira banda que corresponde ao DNA sem o fármaco e  $(I)$  a intensidade das demais bandas que corresponde aos complexos DNA-CLQ. Essa abordagem em primeira ordem é coerente, de modo que a CLQ ao competir com o GelRed (Bis-intercalante usado nesses experimentos para corar o DNA) diminui a intensidade das bandas. Os dados obtidos a partir dessas análises foram ajustados com a isoterma de ligação McGee-von Hippel (Eq. 9.2), de modo similar aos dados da pinça óptica apontado na Fig. (9.7), observe que  $r \sim \Theta$  quando  $\gamma \sim 1$ , como citado anteriormente. Os parâmetros de ligação, constante de associação da ligação  $K$  e

o parâmetro de exclusão de vizinhos, também denominado tamanho do sítio de ligação  $N$  extraídos nos experimentos são apresentados na Tabela (9.1).

Tabela 9.1 – Parâmetros de ligação  $K$  e  $N$  obtidos dos experimentos de eletroforese.

Dados	$K(\times 10^5 \text{ M}^{-1})$	$N$
Eletroforese/PBS $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$	$1.5 \pm 0.3$	$1.4 \pm 0,1$
Eletroforese/PBS $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$	$2.8 \pm 0.8$	$1.8 \pm 0.1$

### 9.3 Comparação crítica entre a cloroquina e hidroxiclороquina

Bazoni e colaboradores demonstraram que a HCLQ possui dois modos de interação com a molécula de DNA: (*i*) interação com a fenda menor que ocorre para concentrações menores que  $5 \mu\text{M}$ , (*ii*) e intercalação que ocorre para concentrações acima de  $5 \mu\text{M}$  do fármaco [240]. De maneira que estes resultados aparentam ser contraditórios com os obtidos para CLQ em tampão PBS contendo  $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$  descrito na subseção (9.1.1.3). A CLQ apresentou dois modos de interação com a molécula de DNA em PBS  $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ : (*i*) intercalação para concentrações menores que  $1 \mu\text{M}$ , (*ii*) e interação às fendas provavelmente formando agregados CLQ-CLQ ao longo da dupla-hélice para concentrações acima de  $1 \mu\text{M}$ . No entanto, uma pequena alteração na estrutura química dos dois compostos pode explicar a diferença em seu comportamento.

Os dois fármacos possuem estruturas químicas semelhantes, como pode ser observado na Fig. (9.9), sendo que a HCLQ apresenta um grupo hidroxila (-OH) no final da cadeia lateral básica. O grupo -OH aumenta a solubilidade do composto em soluções aquosas, uma vez que este grupo molecular pode formar ligações de hidrogênio com a água, sendo a HCLQ mais hidrofílica que a CLQ [79].

Vale ressaltar que o estudo realizado por Bazoni e colaboradores [240] sobre a interação DNA-HCLQ usando a pinça óptica foi realizado nas mesmas condições experimentais descritas nas subseções (6.3.1), (6.3.2), (6.3.3) e (6.3.6), usando meio aquoso com alta força iônica  $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$  [240].

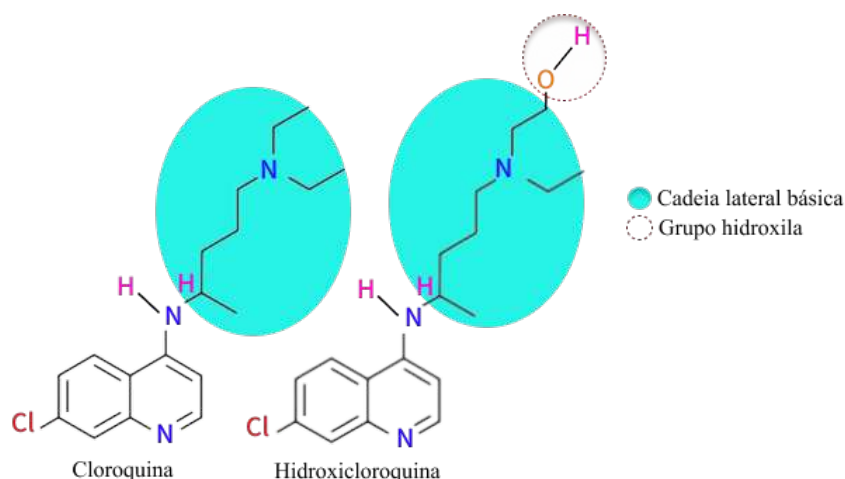


Figura 9.9 – Estrutura molecular da cloroquina e hidroxicloroquina.

## 9.4 Discussões dos resultados de Pinça óptica e Eletroforese em gel

Os primeiros estudos relacionados à formação do complexo DNA-CLQ apontaram evidências de forte interação entre essas moléculas em baixa força iônica, especificamente em pH 6,4 [144], e a diminuição da interação com o aumento da força iônica [145]. Em 1966, Richard O'Brien e colaboradores publicaram um estudo indicando haver fortes indícios que a molécula de CLQ era um agente intercalante, propondo um tipo de interação bimodal com o DNA e também um modelo estrutural do complexo DNA-CLQ. A interação bimodal sugeria que um lado da estrutura molecular da CLQ ligava-se ionicamente aos grupos fosfóricos do esqueleto de açúcar-fosfato através da fenda menor, de maneira que essa ligação estabilizava a dupla-hélice para não haver quebra das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, enquanto que o anel 7-cloroquinolina intercalava-se entre os pares de bases [241].

Em 1989, Kwakye-Berko e Meshnick publicaram um estudo apontando a relação da interação DNA-CLQ com a força iônica. De maneira que à medida que a força iônica aumentava, havia uma aparente diminuição na afinidade da ligação. Neste trabalho, os autores calcularam a partir dos dados obtidos com a técnica diálise de equilíbrio os parâmetros de ligação, constante de associação  $K$  e tamanho dos sítios de ligação  $N$ , ajustando-os com o modelo de Scatchard para o meio sem NaCl e para o meio contendo NaCl usaram o modelo de McGhee-von Hippel [242]. Embora os valores de  $K$  relatados sejam próximos aos nossos, os valores de  $N$  não são, indicando sutilezas na agregação CLQ-CLQ dependendo das condições experimentais.

Como explicitado na seção (2.1), a disseminação sobre o uso da CLQ durante a Pandemia da Covid-19 sem que houvesse comprovação da sua eficácia contra o vírus Sars-CoV-2 [63] alarmou a comunidade científica brasileira. A falta do medicamento nas

fármacias devido ao uso indiscriminado [28] sem orientação e acompanhamento adequados, gerou uma série de preocupações no tocante aos efeitos colaterais provenientes do fármaco a curto e longo prazo. Entidades como a Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Imunologia entre outras, publicaram notas de esclarecimento com os possíveis danos que o fármaco poderia causar à saúde sem que houvesse a real necessidade de seu uso [29, 30].

Compreender a nível molecular os efeitos que um fármaco pode causar à molécula de DNA é de grande relevância científica. Pois o estudo sobre estas interações tem consequência direta na orientação de uso e tipos de tratamentos que podem ser realizados.

Com o uso da técnica de molécula única é possível avaliar de maneira direta a interação de um ligante com a molécula de DNA, haja vista que todas as alterações nos parâmetros mecânicos e propriedades físico-químicas são avaliadas em uma única molécula por experimento. Visto que os parâmetros de ligação apresentam menor variação no erro.

Tabela 9.2 – Parâmetros de ligação  $K$  e  $N$  obtidos dos experimentos de eletroforese e pinça óptica.

Dados	$K(\times 10^5 \text{ M}^{-1})$	$N$
Eletroforese/PBS [Na] = 150 mM	$1.5 \pm 0.3$	$1.4 \pm 0.1$
Eletroforese/PBS [Na] = 1 mM	$2.8 \pm 0.8$	$1.8 \pm 0.1$
Pinça óptica/PBS [Na] = 1 mM	$3.0 \pm 1.0$	$2.2 \pm 0.1$

Para baixas forças iônicas ( $[\text{Na}] = 1\text{mM}$ ,  $[\text{Cl}] = 0$ ), as moléculas de CLQ intercalam-se individualmente entre os pares de bases do DNA, de maneira que, o fármaco comporta-se como um intercalante clássico. Por outro lado, em altas forças iônicas ( $[\text{Na}] = 150\text{ mM}$ ,  $[\text{Cl}] = 140\text{ mM}$ ), a probabilidade de agregação CLQ-CLQ na dupla-hélice aumenta, formando estruturas que se ligam parcialmente fora da dupla-hélice.

Observe que os parâmetros de ligação obtidos para a interação DNA-CLQ em baixa força iônica ( $[\text{Na}] = 1\text{ mM}$ ), com duas técnicas diferentes, eletroforese em gel (múltiplas moléculas) e pinça óptica (molécula única) concordam muito bem (Tabela 9.2). Por outro lado, em alta força iônica ( $[\text{Na}] = 150\text{ mM}$ ), os resultados obtidos através da eletroforese mostram que a constante de associação  $K$  e o tamanho do sítio de ligação  $N$  da interação diminuem ligeiramente com o aumento da força iônica. Essa variação em  $K$  para  $[\text{Na}] = 150\text{ mM}$  sugere que a CLQ passou a apresentar um mecanismo de interação que desvia da intercalação clássica, pois o valor do parâmetro  $N$  obtido foi muito pequeno, sendo que, a intercalação clássica ocorre comumente em sítios de ligação com tamanhos de  $\sim 2$  e  $\sim 4$  [180, 243]. Tal conclusão também corrobora com os resultados obtidos na pinça óptica para  $[\text{Na}] = 150\text{ mM}$ , onde o comportamento dos parâmetros, especificamente, o comprimento de contorno ( $L$ ) é diferente do esperado para intercalantes clássicos.

A partir dos resultados obtidos através da técnica de pinça óptica, vimos que a

CLQ interage fortemente com a molécula de DNA, contudo, os detalhes intrínsecos da interação dependem estritamente da força iônica do meio. O fármaco não só comporta-se como um intercalante clássico em baixas forças iônicas, mas também apresenta outro possível modo de ligação além da intercalação em alta força iônica, interagindo com o DNA possivelmente através das fendas maior e menor da dupla-hélice, resultados estes que foram reforçados com a eletroforese em gel. É importante ressaltar que todas as medidas extraídas na pinça óptica foram realizadas no equilíbrio químico, com tempo de reação ( $\geq 30$  minutos), para que o complexo DNA-CLQ pudesse entrar em equilíbrio na solução, de forma que o comportamento não monotônico dos parâmetros não fossem consequências de rearranjos transitórios em diferentes modos que as vezes são encontrados ao realizar estudos cinéticos [244].

Quanto à comparação crítica entre a CLQ e HCLQ, sabemos que compostos intercalantes tendem a ser moléculas hidrofóbicas, que penetram entre os pares de bases adjacentes do DNA e permanecem dentro da dupla-hélice devido a uma combinação de forças motrizes como atração eletrostática, empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e interações hidrofóbicas. Assim, a hidrofobicidade de uma molécula é reduzida por algum meio, por exemplo, adição de um grupo hidrofílico como -OH pode diminuir a sua afinidade para intercalare a dupla-hélice, favorecendo outro possível modo de ligação. De maneira que verificou-se de fato este comportamento ao comparar os resultados dos experimentos com os dois fármacos: enquanto a HCLQ se liga ao esqueleto de açúcar-fosfato e intercalare-se apenas em concentrações mais elevadas, próximo a saturação do primeiro modo de ligação preferencial; a CLQ apresenta comportamento oposto, sendo a intercalação o primeiro modo de ligação preferencial.

Comportamento esse que também é similar com os fármacos doxorrubicina e daunomicina, que diferem entre si apenas pelo grupo -OH em sua estrutura. Em trabalhos anteriores, para alta força iônica ( $[Na] = 150mM$ ), a doxorrubicina apresenta o tamanho do sítio de ligação  $\sim 4,8$  [175], enquanto a daunomicina para o mesmo parâmetro é  $\sim 3,3$ . Estes resultados sugerem que a daunomicina, que não apresenta grupo -OH terá mais moléculas intercaladas que a doxorrubicina para duas moléculas de DNA idênticas, cada uma saturada com um tipo de fármaco.

Em uma comparação entre CLQ e HCLQ, o grupo -OH presente na HCLQ tende a diminuir a afinidade do fármaco em intercalare na dupla-hélice do DNA. Comportamento de fato observado ao relacionar os estudos das interações DNA-HCLQ [240] e DNA-CLQ realizados neste trabalho.

## 9.5 Avaliação da viabilidade celular

### 9.5.1 Ensaio de MTT

Para verificar a toxicidade da CLQ sobre células saudáveis em cultura, foi realizado o ensaio de citotoxicidade descrito na seção (8.3).

No ensaio de redução de MTT é possível observar a alteração da coloração roxa de acordo com o aumento da concentração da CLQ (Fig. 9.10). Os dados experimentais foram obtidos a partir de tri e quadruplicatas, e então calculada a concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ).

Variadas concentrações da CLQ foram usadas (0.25  $\mu$ M; 0.5  $\mu$ M; 1.0  $\mu$ M; 2.5  $\mu$ M; 5.0  $\mu$ M; 10.0  $\mu$ M; 12.5  $\mu$ M; 25.0  $\mu$ M; 50.0  $\mu$ M) durante o tratamento das três linhas celulares.

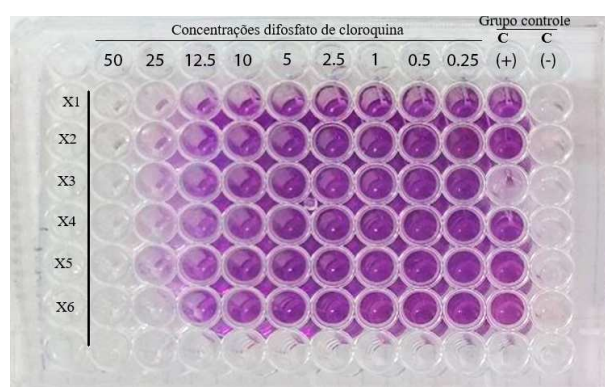


Figura 9.10 – Resultado do ensaio de MTT após tratamento com variadas concentrações de CLQ. Os poços do grupo controle C(+) contêm apenas células e meio de cultura; os poços do grupo controle C(-) não contêm células ou fármaco, apenas meio de cultura.

Muitos fármacos expressam seus efeitos biológicos através de inibições enzimáticas e o estudo dessas inibições é um componente essencial para compreender o mecanismo da ação dos fármacos e outros compostos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* [245].

### 9.5.2 Determinação da viabilidade celular e concentração inibitória - CLQ

A concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ) indica a concentração mínima necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular, sendo assim uma medida de potência [225]. A viabilidade celular em cada linhagem mostra o grau de citotoxicidade do fármaco. Cada linhagem apresentou uma resposta celular distinta após o tratamento com a CLQ. As figuras (9.11), (9.12) e (9.13) apontam essas diferenças.

Importante ressaltar que, as barras representam os valores médios e desvio padrão de quatro experimentos independentes, e os asteriscos representam diferenças estatísticas entre os grupos controle e os grupos tratados.

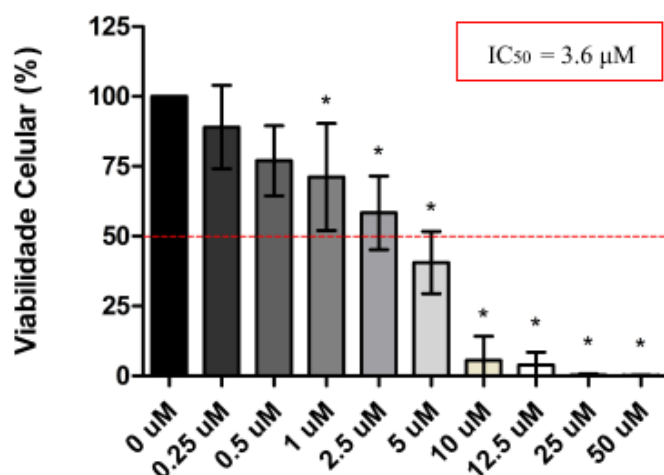


Figura 9.11 – Viabilidade celular da linhagem melan-a após tratamento com a CLQ.

A partir do ensaio citotóxico obteve-se o valor da concentração inibitória média para a linhagem melan-a, sendo  $IC_{50} = 3.6 \mu M$  (Fig. 9.11). Evidenciando assim a toxicidade do fármaco em concentrações abaixo de  $4 \mu M$  nesta linhagem.

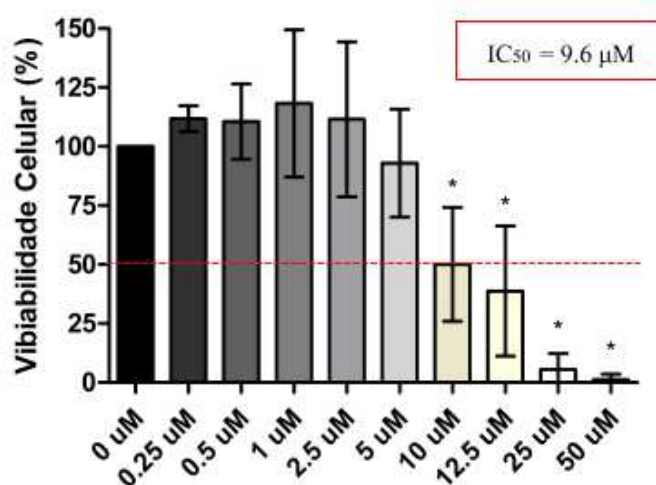


Figura 9.12 – Viabilidade celular da linhagem Vero após tratamento com a CLQ.

O ensaio de citotoxicidade com a linhagem Vero apresentou o valor da concentração inibitória média  $IC_{50} = 9.6 \mu M$  (Fig. 9.12). Demonstrando menor suscetibilidade ao fármaco em concentrações próximas de  $10 \mu M$ . Resultado corroborado por Rossi e colaboradores [246] ao analisar a replicação dessa linha celular após tratamento com a CLQ.

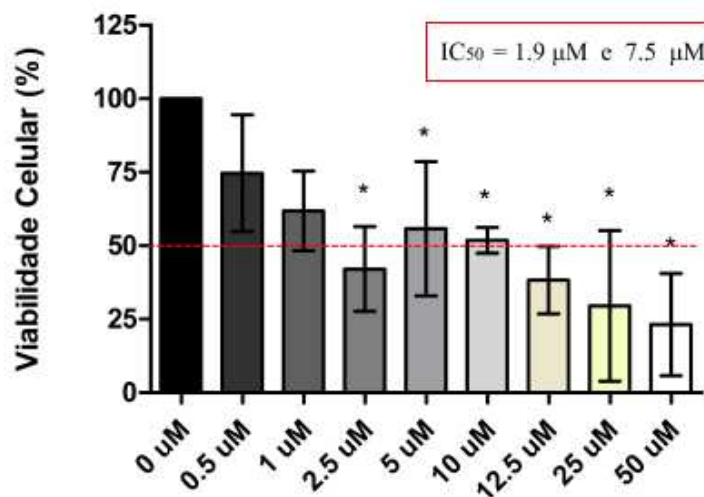


Figura 9.13 – Viabilidade celular da linhagem HEK-293 após tratamento com a CLQ.

Por fim, o resultado dos ensaios citotóxicos apresentou dois valores distintos para concentração inibitória média  $IC_{50} = 1.9 \mu\text{M}$  e  $IC_{50} = 7.5 \mu\text{M}$  (Fig. 9.13). De acordo com a literatura, este fenômeno é conhecido como efeito hormético, i.e., um comportamento bifásico na curva dose-resposta.

A hormese ou efeito hormético é um fenômeno da relação dose-resposta, ocorre quando um organismo é submetido a diferentes concentrações de um fármaco ou composto e apresenta dois tipos de resposta biológica, sendo um estimulatório e outro inibitório [247].

### 9.5.3 Determinação da viabilidade celular e concentração inibitória - HCLQ

Para verificar a toxicidade da HCLQ sobre células saudáveis em cultura, foi realizado o ensaio de citotoxicidade descrito na seção (8.3). Variadas concentrações da HCLQ foram usadas ( $0.25 \mu\text{M}$ ;  $0.5 \mu\text{M}$ ;  $1.0 \mu\text{M}$ ;  $2.5 \mu\text{M}$ ;  $5.0 \mu\text{M}$ ;  $10.0 \mu\text{M}$ ;  $12.5 \mu\text{M}$ ;  $25.0 \mu\text{M}$ ;  $50.0 \mu\text{M}$ ) durante o tratamento das três linhas celulares.

Importante ressaltar que, as barras representam os valores médios e desvio padrão de quatro experimentos independentes, e os asteriscos representam diferenças estatísticas entre os grupos controle e os grupos tratados.

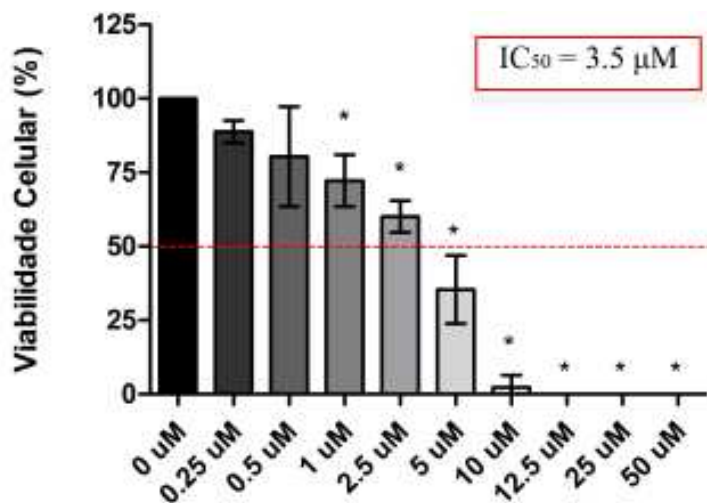


Figura 9.14 – Viabilidade celular da linhagem melan-a após tratamento com a HCLQ.

A partir do ensaio citotóxico obteve-se o valor da concentração inibitória média para a linhagem melan-a, sendo  $IC_{50} = 3.5 \mu M$  (Fig. 9.14). Evidenciando assim a toxicidade do fármaco em concentrações abaixo de  $4 \mu M$  nesta linhagem.

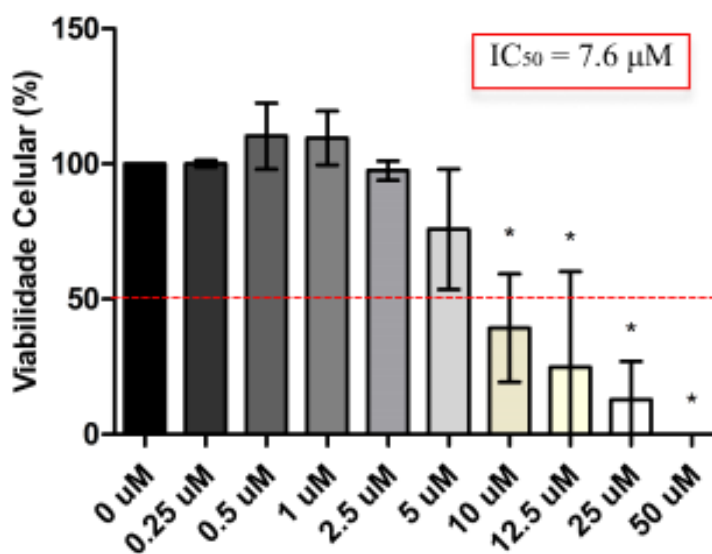


Figura 9.15 – Viabilidade celular da linhagem Vero após tratamento com a HCLQ.

O ensaio de citotoxicidade com a linhagem Vero apresentou o valor da concentração inibitória média  $IC_{50} = 7.6 \mu M$  (Fig. 9.15). Demonstrando menor suscetibilidade ao fármaco em concentrações próximas de  $8 \mu M$ .

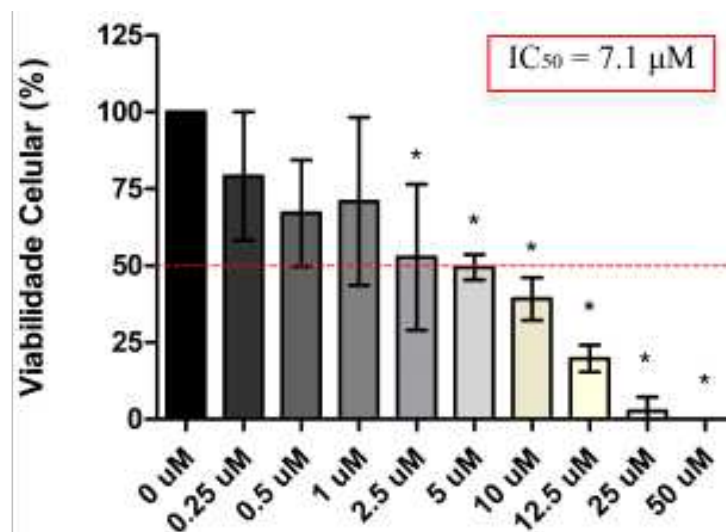


Figura 9.16 – Viabilidade celular da linhagem HEK-293 após tratamento com a HCLQ.

Por fim, o resultado do ensaio citotóxico apresentou apenas um valor para concentração inibitória média  $IC_{50} = 7.1 \mu M$  (Fig. 9.16).

## 9.6 Discussões dos resultados de Viabilidade celular

Como vimos na seção (8.2) do capítulo 8, o uso de testes *in vitro* para avaliar a toxicidade de compostos foram estabelecidos a partir da cultura celular [214]. Um dos indicadores mais importantes da avaliação biológica de um sistema *in vitro* é a citotoxicidade [213]. A fim de verificar a citotoxicidade dos fármacos cloroquina e hidroxiclo-roquina, foram usadas três linhagem celulares oriundas de diferentes espécies, a Vero, melan-a e HEK-293 que apresentaram comportamentos distintos após tratamento com os dois compostos.

A melan-a, é uma linhagem de melanócitos não tumorigênicos de murina [194], que após tratamento com diferentes concentrações de CLQ e HCLQ apresentaram valores de  $IC_{50} = 3.6 \mu M$  e  $3.5 \mu M$  respectivamente, sendo possível verificar a toxidez dos fármacos em baixas concentrações (Fig. 9.17).

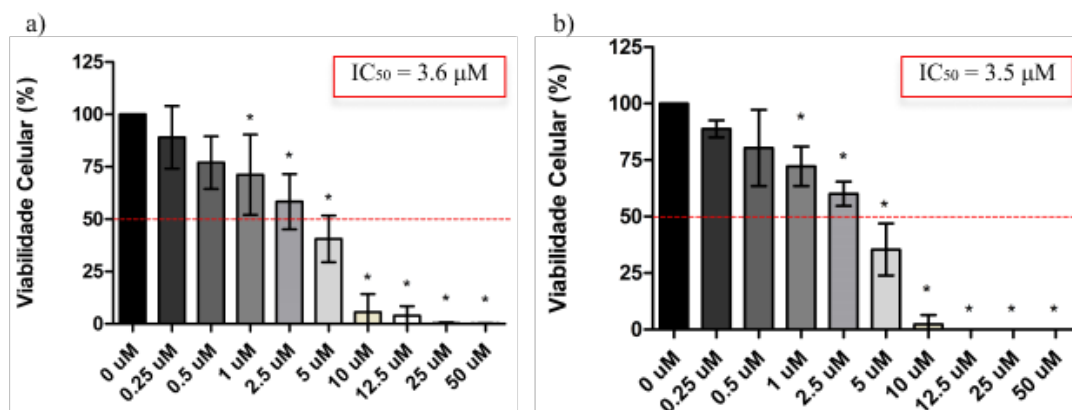


Figura 9.17 – Viabilidade celular da linhagem melan-a após tratamento:(a) CLQ e (b) HCLQ.

Por ser uma linhagem oriunda de melanócitos [191], estudos demonstram a forte interação entre a CLQ e melanina [248, 249], assim como a HCLQ e melanina [79]. A melanina é o pigmento responsável pela coloração da pele, cabelos e olhos, além de oferecer fotoproteção ao organismo absorvendo luz ultravioleta [250]. Tanto a CLQ quanto a HCLQ são usadas no controle de doenças autoimunes como artrite reumatoide e lúpus eritematoso [83, 251]. Um dos efeitos colaterais mais comuns da CLQ e HCLQ devido ao uso prolongado é a retinopatia<sup>1</sup>, haja vista que o epitélio pigmentar da retina é formado por melanócitos [79], além de hiperpigmentação, miopia e reações cutâneas [252].

A linhagem Vero, oriunda de células renais de primata [197] apresentou valor de  $IC_{50} = 9.6 \mu M$  após tratamento com a CLQ e  $IC_{50} = 7.6 \mu M$  após tratamento com a HCLQ (Fig. 9.18).

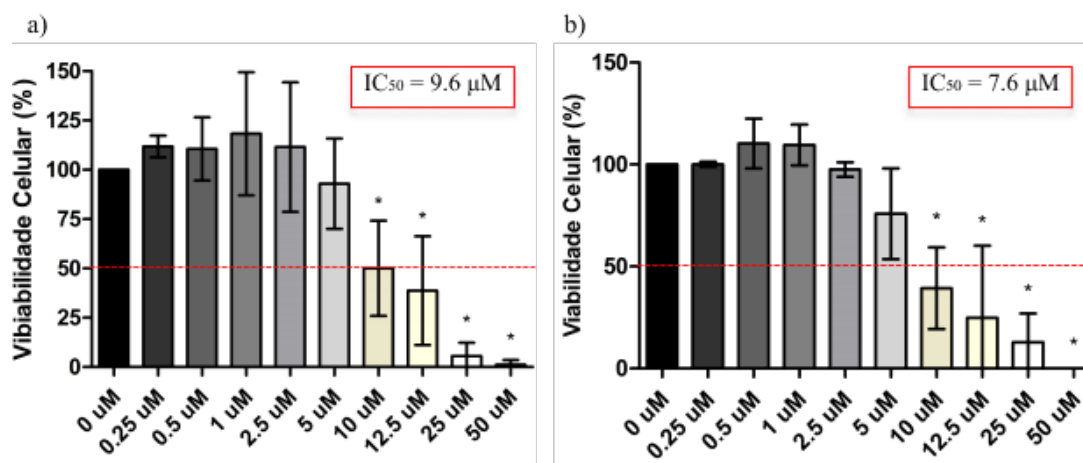


Figura 9.18 – Viabilidade celular da linhagem HEK-293 após tratamento:(a) CLQ e (b) HCLQ.

Esses dados indicam maior toxicidade da HCLQ em relação à CLQ nessa linha celular, contudo, a literatura apresenta a HCLQ sendo 40% menos tóxica em modelos animais [253] que a CLQ. Rossi e colaboradores [246] realizaram um estudo para comparar os efeitos

<sup>1</sup> Danos dos vasos sanguíneos presentes na retina [79].

da CLQ em células Vero (grupo controle) e células MCF-7 (grupo tratado), constatando um crescimento da viabilidade do grupo controle e diminuição da viabilidade do grupo em tratamento para a mesma concentração<sup>2</sup> de 1,56 mg/L (3,02  $\mu\text{M}$ ), ao aumentar a concentração da CLQ durante o ensaio, observou-se um comportamento oposto, diminuição da viabilidade do grupo controle e aumento da viabilidade do grupo em tratamento.

Por fim, a linhagem HEK-293 oriunda de células renais humanas [202], demonstrou ser mais sensível à CLQ que HCLQ. O resultado dos ensaios citotóxicos apresentou dois valores distintos de  $\text{IC}_{50} = 1.9 \mu\text{M}$  e  $7.5 \mu\text{M}$  após tratamento com a CLQ. Contudo, a linhagem não exibiu a mesma resposta celular após tratamento com a HCLQ, apresentando valor de  $\text{IC}_{50} = 7.1 \mu\text{M}$  (Fig. 9.19).

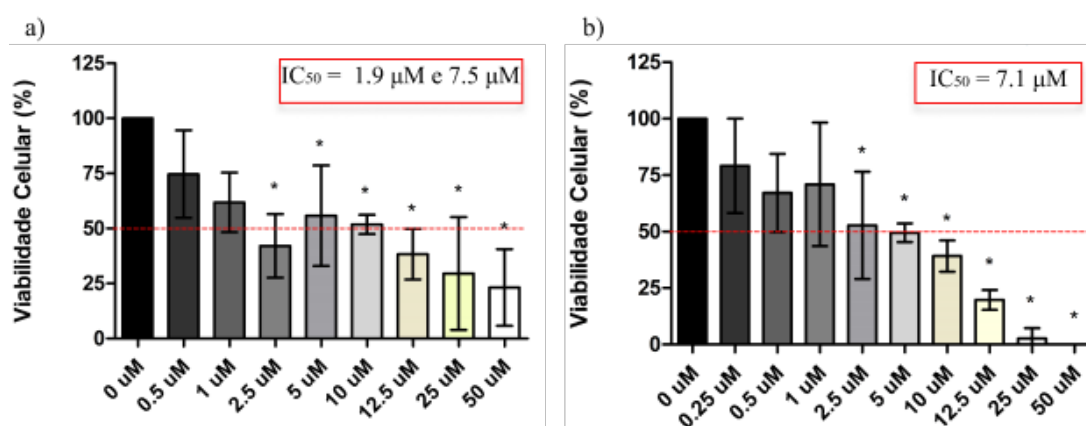


Figura 9.19 – Viabilidade celular da linhagem HEK-293 após tratamento:(a) CLQ e (b) HCLQ.

O comportamento observado na linhagem HEK-293 após tratamento com a CLQ é conhecido como efeito hormético e está diretamente relacionado com o aumento da concentração do fármaco [254]. Ao apresentar dois valores de  $\text{IC}_{50}$ , em concentrações abaixo de  $2.0 \mu\text{M}$  causaram um efeito estimulatório, ou seja, crescimento de células viáveis, ao aumentar a concentração ( $> 5.0 \mu\text{M}$ ) houve um efeito inibitório, diminuindo a viabilidade celular. O comportamento hormético induzido pela CLQ foi objeto de estudo realizado por Calabrese e colaboradores em 2021 [254]. Ao analisar diversas pesquisas com células tumorais e não tumorais, células neuronais, células infectadas etc., observaram um número substancial de modelos experimentais que demonstravam o comportamento hormético induzido pela cloroquina. Devido a esses fatores há necessidade de cuidados ao utilizar o fármaco, especialmente no contexto em que vários indivíduos fazem uso da CLQ.

Um possível causador do efeito hormético induzido pela CLQ seja a mistura racêmica da qual o fármaco é composto [254]. Como apresentado na seção (2.3), a mistura contém uma razão equivalente das formas R(-)cloroquina e S(+)-cloroquina (Fig. 2.2), apesar de ser uma mistura opticamente inativa, os enantiômeros apresentam diferenças em suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, além de exibir efeitos biológicos

<sup>2</sup> O autor cita como menor concentração 1,56 mg/L e maior concentração 50 mg/L [246].

e terapêuticos distintos [83]. Vale ressaltar que o enantiômero S(+)-cloroquina é preferencialmente excretado pelos rins, se comparado com o enantiômero R(-)-cloroquina. Devido a insuficiência renal associada à família 4-aminoquilina, é possível que o enantiômero S(+)-cloroquina seja mais tóxico em humanos que o enantiômero R(-)-cloroquina [79].

Os valores de  $IC_{50}$  tiveram variação entre  $1.9 \mu\text{M}$  e  $9.6 \mu\text{M}$ , dependendo do fármaco, mas especialmente da linhagem celular. Os resultados obtidos para cada condição específica são mostrados na Tabela (9.3).

Tabela 9.3 – Valores de  $IC_{50}$  em  $\mu\text{M}$  da CLQ e HCLQ obtidos em três diferentes linhagens celulares.

Linhagem celular	CLQ	HCLQ
Melan-a	$3.6 \pm 1.6$	$3.5 \pm 1.0$
Vero	$9.6 \pm 2.4$	$7.6 \pm 2.3$
HEK-293	$1.9 \pm 6.9$ e $7.5 \pm 6.0$	$7.1 \pm 6.9$

Observamos que as três linhagens celulares foram mais sensíveis a hidroxicloroquina que ao difosfato de cloroquina, apresentando valores menores de  $IC_{50}$  para a HCLQ, embora dentro das barras de erro experimentais. É importante ressaltar que os efeitos tóxicos destes fármacos observados em linhagens celulares distintas pode ser uma característica geral, uma vez que as células analisadas são oriundas de espécies diferentes e todas demonstraram alta sensibilidade ao tratamento com a CLQ e HCLQ.

Contudo, as relações dose-resposta desconhecidas de ambos os fármacos, a não definição de uma dose mínima eficiente e quais doses são tóxicas representam um desafio para prática clínica [34]. Haja vista que grande parte das pesquisas abordam a ação dos fármacos *in vitro* e *in vivo* com modelos animais.

## X Conclusões

O uso de um único fármaco para tratamento de diferentes patologias é habitual na área da saúde, um exemplo a ser dado é a cloroquina. A CLQ foi desenvolvida para tratar pacientes infectados com malária e em seguida passou a ser usada para controle de doenças reumáticas autoimunes. Devido a ação farmacológica da CLQ, vários testes usando células infectadas com diferentes tipos de vírus foram realizados, constatando-se sua eficiência *in vitro* [70]. Um dos estudos aponta a CLQ como potencial fármaco para tratar pacientes infectados pelo SARS-CoV-1 [6], tornando-se base para novas pesquisas que tinham como finalidade combater o SARS-CoV-2 em 2020 [255]. Muitos fármacos tem como característica a interação com a molécula de DNA, e compostos que possuem esse aspecto são comumente usados no tratamento de neoplasias malignas, como é o caso da doxorrubicina [175].

Neste trabalho, o objetivo principal era compreender o mecanismo de interação da CLQ com a molécula de DNA. É importante frisar que a motivação para estudar o complexo DNA-CLQ surgiu devido a ampla disseminação e uso do fármaco contra o SARS-CoV-2, vírus causador da pandemia da COVID-19. Com isso, ao revisar os estudos existentes sobre a interação DNA-CLQ, observamos que estes apontavam a CLQ como molécula intercalante apenas em meio com baixa força iônica [157, 146, 145]. Para tornar esse trabalho mais robusto, além de realizar ensaios de molécula única usando a pinça óptica, fizemos ensaios de redução de MTT em três diferentes linhagens celulares para analisar o nível de citotoxicidade da CLQ. De forma que esta tese possui duas análises distintas do fármaco cloroquina, uma a nível molecular e outra a nível celular. A interação molecular da CLQ com o DNA, estudada a nível de molécula única com uso da pinça óptica e complementada com a técnica eletroforese em gel de agarose (múltiplas moléculas), assim como os efeitos diretos do fármaco sobre diferentes linhagens celulares, avaliando sua citotoxicidade.

A partir dos ensaios de pinçamento óptico, observamos que a CLQ interage fortemente com o DNA, mas os detalhes intrínsecos do mecanismo de ligação dependem fortemente da força iônica do meio circundante. Em meio contendo baixa baixa força iônica  $[Na] = 1 \text{ mM}$ , a CLQ tem como principal modo de interação a intercalação. Ao passo que em meio com alta força iônica  $[Na] = 150 \text{ mM}$ , o fármaco apresenta outro modo de ligação possível para além da intercalação, a interação com as fendas do DNA, sendo este o principal modo de interação.

De modo que o comportamento intercalante da CLQ em baixa força iônica foi observado, fato que é corroborado por estudos anteriores. Ao passo que em alta força iônica também há comportamento intercalante, entretanto, o principal modo de interação possível é a ligação às fendas do DNA. O comportamento bimodal da CLQ em meio

contendo alta força iônica ainda não havia sido observado, sendo anteriormente descartada a possibilidade de interação com a molécula de DNA em meio com alta força iônica. Também foi possível extrair os parâmetros de ligação  $K$  e  $N$  do complexo DNA-CLQ com elevada precisão, haja vista que o uso da técnica de pinça óptica permitiu analisar o comportamento do DNA ao ser exposto a variadas concentrações de CLQ.

Com os dados obtidos com a técnica de eletroforese em gel de agarose, foi possível observar a diminuição da intensidade relativa de fluorescência das bandas de DNA ao interagir com a cloroquina em meio contendo  $[\text{Na}] = 1\text{mM}$ , porém, em meio contendo  $[\text{Na}] = 150\text{mM}$  verificou-se que não houve o mesmo comportamento. Ao compararmos com os resultados obtidos nos ensaios de pinça óptica, constatamos que o uso de técnicas diferentes (molécula única  $\times$  múltiplas moléculas) observou-se o comportamento semelhante da CLQ.

Em relação aos resultados dos ensaios de redução de MTT, demonstrou-se que a CLQ apresenta elevada citotoxicidade para as três diferentes linhagens celulares testadas: Vero, Melan-a, e HEK-293. Contudo, apenas a linhagem HEK-293 apresentou dois valores de concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ), o comportamento observado na linhagem HEK-293 é denominado comportamento hormético e de acordo com Calabrese, a CLQ induz a hormese [254].

No que se refere à comparação crítica descrita na seção (9.3), os resultados obtidos para CLQ em ambos os níveis foram comparados com os equivalentes obtidos para a HCLQ. Os dois fármacos são intercalantes, porém, a CLQ apresenta modo principal de intercalação em baixa força iônica e, como relatado por Bazoni e colaboradores [240], a HCLQ apresenta intercalação em alta força iônica. Em relação à citotoxicidade dos fármacos, a literatura apontar menor toxicidade da HCLQ em relação à CLQ, contudo, ambos os fármacos mostraram uma citotoxicidade elevada e semelhante, provavelmente relacionada à forte afinidade pela molécula de DNA.

Concluimos neste trabalho que o fármaco cloroquina possui dois possíveis modos de interação com a molécula de DNA em meio com alta força iônica, o de intercalação entre os pares de base e o de ligação às fendas, sendo o segundo o principal modo de interação. Quanto ao nível celular, a CLQ apresenta alta citotoxicidade, e comportamento hormético sendo observado apenas na linhagem celular HEK-293.

## Referências

- [1] Damir Huremović. *Psychiatry of pandemics: a mental health response to infection outbreak*. Springer, 2019.
- [2] World Health Organization. Director-general’s opening remarks at the media briefing on covid-19, March 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19-11-march-2020>.
- [3] Mohd Sharjeel Sofi, Aadil Hamid, and Sami Ullah Bhat. Sars-CoV-2: A critical review of its history, pathogenesis, transmission, diagnosis and treatment. *Biosafety and Health*, 2(4):217–225, 2020.
- [4] World Health Organization. Who coronavirus (covid-19) dashboard. <https://covid19.who.int/measures>, 2020.
- [5] Alimuddin Zumla, Jasper FW Chan, Esam I Azhar, David SC Hui, and Kwok-Yung Yuen. Coronaviruses—drug discovery and therapeutic options. *Nature reviews Drug discovery*, 15(5):327–347, 2016.
- [6] Adrea Savarino, John R Boelaert, Antonio Cassone, Giancarlo Majori, and Roberto Cauda. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today’s diseases. *The Lancet infectious diseases*, 3(11):722–727, 2003.
- [7] Martin J Vincent, Eric Bergeron, Suzanne Benjannet, Bobbie R Erickson, Pierre E Rollin, Thomas G Ksiazek, Nabil G Seidah, and Stuart T Nichol. Chloroquine is a potent inhibitor of sars coronavirus infection and spread. *Virology journal*, 2(1):1–10, 2005.
- [8] Els Keyaerts, Leen Vijgen, Piet Maes, Johan Neyts, and Marc Van Ranst. In vitro inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine. *Biochemical and biophysical research communications*, 323(1):264–268, 2004.
- [9] Manli Wang, Ruiyuan Cao, Leike Zhang, Xinglou Yang, Jia Liu, Mingyue Xu, Zhengli Shi, Zhihong Hu, Wu Zhong, and Gengfu Xiao. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-ncov) in vitro. *Cell Research*, 30(3):269–271, 2020.
- [10] Rajesh M Shetty and ArunKumar Namachivayam. Evidence for chloroquine/hydroxychloroquine in the treatment of covid-19. *Indian Journal of Critical Care Medicine: Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 25(4):441, 2021.

- [11] Andrea Cortegiani, Giulia Ingoglia, Mariachiara Ippolito, Antonino Giarratano, and Sharon Einav. A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of covid-19. *Journal of critical care*, 57:279–283, 2020.
- [12] Xueting Yao, Fei Ye, Miao Zhang, Cheng Cui, Baoying Huang, Peihua Niu, Xu Liu, Li Zhao, Erdan Dong, Chunli Song, et al. In vitro antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (sars-cov-2). *Clinical infectious diseases*, 71(15):732–739, 2020.
- [13] Jianjun Gao, Zhenxue Tian, and Xu Yang. Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of covid-19 associated pneumonia in clinical studies. *Bioscience trends*, 2020.
- [14] Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Uso off label: erro ou necessidade? *Revista Saúde Pública*, 46(2):398–9, 2012.
- [15] Wei Tang, Zhujun Cao, Mingfeng Han, Zhengyan Wang, Junwen Chen, Wenjin Sun, Yaojie Wu, Wei Xiao, Shengyong Liu, Erzhen Chen, et al. Hydroxychloroquine in patients with mainly mild to moderate coronavirus disease 2019: open label, randomised controlled trial. *bmj*, 369, 2020.
- [16] Sylwester Drożdżal, Jakub Rosik, Kacper Lechowicz, Filip Machaj, Katarzyna Kotfis, Saeid Ghavami, and Marek J Łos. Fda approved drugs with pharmacotherapeutic potential for sars-cov-2 (covid-19) therapy. *Drug resistance updates*, 53:100719, 2020.
- [17] Michael A Chary, Alexander F Barbuto, Sudeh Izadmehr, Bryan D Hayes, and Michele M Burns. Covid-19: therapeutics and their toxicities. *Journal of Medical Toxicology*, 16(3):284–294, 2020.
- [18] Mandeep R Mehra, Sapan S Desai, Frank Ruschitzka, and Amit N Patel. Retracted: Hydroxychloroquine or chloroquine with or without a macrolide for treatment of COVID-19: a multinational registry analysis. *The Lancet*, 2020.
- [19] PAHO. Manejo clínico da covid-19: Orientações provisórias. [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52285/OPASWBRACOV19-1920075\\_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52285/OPASWBRACOV19-1920075_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y), março 2022.
- [20] Urooj Fatima, Syed Saif Abbas Rizvi, Saher Fatima, and Md Imtaiyaz Hassan. Impact of hydroxychloroquine/chloroquine in covid-19 therapy: two sides of the coin. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 40(10):469–471, 2020.
- [21] World Health Organization. Therapeutics and covid-19: living guideline. Technical report, World Health Organization, March 2021.

- [22] Universidade Aberta-SUS. Coronavírus: Brasil confirma primeiro caso da doença. <https://www.unasus.gov.br/noticia/coronavirus-brasil-confirma-primeiro-caso-da-doenca>.
- [23] Maicon Falavigna, Verônica Colpani, Cinara Stein, Luciano Cesar Pontes Azevedo, Angela Maria Bagattini, Gabriela Vilela de Brito, José Miguel Chatkin, Sergio Cimerman, Mirian de Freitas Dal Ben Corradi, and Clovis Arns Cunha. Diretrizes para o tratamento farmacológico da covid-19. consenso da associação de medicina intensiva brasileira, da sociedade brasileira de infectologia e da sociedade brasileira de pneumologia e tisiologia. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 32:166–196, 2020.
- [24] Ministério da Saúde. Nota informativa nº 5/2020-daf/sctie/ms. <https://legis.senado.leg.br/sdleg-getter/documento/download/f8f7a359-cc19-464e-a5a0-6cb92a26376f>.
- [25] Ministério da Saúde. Nota informativa nº 17/2020-se/gab/se/ms. <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/estudos-e-notas-informativas/2020/old-file-removed-covid-05mar2021-11h37.pdf/view>.
- [26] Justiça Federal. Sentença. <https://redeaps.org.br/wp-content/uploads/2022/05/Sentenca-SBMFCxUNIAO.pdf>, 2022.
- [27] David William Russell and Joseph Sambrook. *Molecular cloning: a laboratory manual*, volume 1. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- [28] Carolline Rodrigues Menezes, Cristina Sanches, and Farah Maria Drumond Chequer. Effectiveness and toxicity of chloroquine and hydroxychloroquine associated (or not) with azithromycin for the treatment of covid-19. what do we know so far? *J. Health Biol. Sci.(Online)*, 2020.
- [29] Sociedade Brasileira de Imunologia. Parecer científico da sociedade brasileira de imunologia sobre a utilização da cloroquina/hidroxicloroquina para o tratamento da covid-19, Maio 2020. <https://sbi.org.br/parecer-cientifico/parecer-da-sociedade-brasileira-de-imunologia-sobre-a-utilizacao-da-cloroquina-hidroxicloroquina-para-o-tratamento-da-covid-19/>.
- [30] Sociedade Brasileira de Cardiologia. Nota de esclarecimento. <https://www.portal.cardiol.br/post/nota-de-esclarecimento-1>, Maio 2020.
- [31] Bruno Fonseca Larissa Fernandes Anna Beatriz Anjos, Bianca Muniz. O mapa da cloroquina: como governo bolsonaro enviou 2,8 milhões de comprimidos para todo o brasil. <https://apublica.org/2021/03/o-mapa-da-cloroquina-como-governo-bolsonaro>

- [-enviou-28-milhoes-de-comprimidos-para-todo-o-brasil/?goal=0\\_069298921c\ -624550bcae-288596113&mc\\_cid=624550bcae&mc\\_eid=9e192bbf87.](#)
- [32] DC Warhurst. Antimalarial drugs. *Drugs*, 33(1):50–65, 1987.
- [33] Robert W Berliner, David P Earle, John V Taggart, Charles G Zubrod, William J Welch, Neal J Conan, Eli Bauman, Sidney T Scudder, and James Shannon. Studies on the chemotherapy of the human malarías. vi. the physiological disposition, antimalarial activity, and toxicity of several derivatives of 4-aminoquinoline. *The Journal of clinical investigation*, 27(3):98–107, 1948.
- [34] Eva Schrezenmeier and Thomas Dörner. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. *Nature Reviews Rheumatology*, 16(3):155–166, 2020.
- [35] Amin Gasmi, Massimiliano Peana, Sadaf Noor, Roman Lysiuk, Alain Menzel, Asma Gasmi Benahmed, and Geir Bjørklund. Chloroquine and hydroxychloroquine in the treatment of covid-19: the never-ending story. *Applied microbiology and biotechnology*, 105(4):1333–1343, 2021.
- [36] Wenmin Zhou, Hui Wang, Yuqi Yang, Zhe-Sheng Chen, Chang Zou, and Jianye Zhang. Chloroquine against malaria, cancers and viral diseases. *Drug Discovery Today*, 25(11):2012–2022, 2020.
- [37] Ronaldo Mohana-Borges. *Dengue Virus: Methods and Protocols*. Springer, 2021.
- [38] Fabian Müller, Jörg König, Hartmut Glaeser, Ingrid Schmidt, Oliver Zolk, Martin F Fromm, and Renke Maas. Molecular mechanism of renal tubular secretion of the antimalarial drug chloroquine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(7):3091–3098, 2011.
- [39] Tomohisa Kitagawa, Atsushi Matsumoto, Ichiro Terashima, and Yukifumi Uesono. Antimalarial quinacrine and chloroquine lose their activity by decreasing cationic amphiphilic structure with a slight decrease in ph. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(7):3885–3896, 2021.
- [40] Cevayir Coban. The host targeting effect of chloroquine in malaria. *Current opinion in immunology*, 66:98–107, 2020.
- [41] Márcio Santos Rocha. *Interações DNA- Ligantes: uma introdução*. Livraria da Física, 2020.
- [42] Wilhelm Guschlbauer. *DNA-ligand Interactions: From Drugs to Proteins*, volume 137. Springer Science & Business Media, 2013.

- [43] Arthur Ashkin, James M Dziedzic, John E Bjorkholm, and Steven Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics letters*, 11(5):288–290, 1986.
- [44] Arthur Ashkin, James M Dziedzic, and T Yamane. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 330(6150):769–771, 1987.
- [45] Carlos Bustamante, John F Marko, Eric D Siggia, and S Smith. Entropic elasticity of  $\lambda$ -phage dna. *Science*, 265(5178):1599–1600, 1994.
- [46] Bell Labs Institute. Arthur ashkin wins 2018 nobel prize in physics. <https://www.bell-labs.com/institute/blog/arthur-ashkin-nobel-prize/>.
- [47] Kathryn A Glatter and Paul Finkelman. History of the plague: An ancient pandemic for the age of COVID-19. *The American Journal of Medicine*, 134(2):176–181, 2021.
- [48] James P Morgan. Quinine’s Predecessor: Francesco Torti and the Early History of Cinchona. *JAMA*, 271(11):881–882, 1994.
- [49] Cuicai Zhang, Bo Pang, Zhemin Zhou, Haiyin Wang, Haijian Zhou, Xin Lu, Pengcheng Du, Lijuan Zhang, Jie Li, Zhigang Cui, et al. The purifying trend in the chromosomal integron in *Vibrio cholerae* strains during the seventh pandemic. *Infection, Genetics and Evolution*, 26:241–249, 2014.
- [50] Alexander E. Gorbalenya. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-ncov and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4):536–544, 2020.
- [51] Maria Luísa Oliveira Ferreira Melo, Rodinei Augusti, Viviane Dias Medeiros Silva, Yan Jeronimo Gomes Lobo, Yuri Gomes Figueiredo, Júlio Onésio Ferreira Melo, Thayná Victoria Silva do Nascimento, Ricardo Rodrigues Jimenez, Romualdo Luciano da Silva, Sâmia Boselli Dovoezem Quirino Pantarotto, et al. Cloroquina e hidroxicloroquina em tempos de pandemia pela covid-19: automedicação e intoxicação. *Educação, Trabalho e Saúde: Caminhos e possibilidades em tempos de Pandemia*, 2(1):81–101, 2022.
- [52] Universidade Aberta-SUS. Organização Mundial de Saúde declara pandemia do novo Coronavírus, Março 2020. <https://www.unasus.gov.br/noticia/organizacao-mundial-de-saude-declara-pandemia-de-coronavirus>.
- [53] WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. <https://covid19.who.int/>, 2021.
- [54] Ahmed A Al-Qahtani. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): emergence, history, basic and clinical aspects. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(10):2531–2538, 2020.

- [55] I Made Artika, Aghnianditya Kresno Dewantari, and Ageng Wiyatno. Molecular Biology of Coronaviruses: current knowledge. *Heliyon*, 6(8):4743, 2020.
- [56] Paul S Masters. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Advances in virus research*, 66:193–292, 2006.
- [57] Adriaan H De Wilde, Dirk Jochmans, Clara C Posthuma, Jessika C Zevenhoven-Dobbe, Stefan Van Nieuwkoop, Theo M Bestebroer, Bernadette G Van Den Hoogen, Johan Neyts, and Eric J Snijder. Screening of an fda-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of middle east respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(8):4875–4884, 2014.
- [58] Philippe Gautret, Jean-Christophe Lagier, Philippe Parola, Line Meddeb, Morgane Mailhe, Barbara Doudier, Johan Courjon, Valérie Giordanengo, Vera Esteves Vieira, Hervé Tissot Dupont, et al. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(1):105949, 2020.
- [59] Tingting Qiu, Shuyao Liang, Monique Dabbous, Yitong Wang, Ru Han, and Mondher Toumi. Chinese guidelines related to novel coronavirus pneumonia. *Journal of Market Access & health Policy*, 8(1):1818446, 2020.
- [60] Jie Zhonghua, H He, X Hu, and Z Za. Expert consensus on chloroquine phosphate for the treatment of novel coronavirus pneumonia. *Bibl. Nac. Med*, 43:185–188, 2020.
- [61] Solidarity Trial Consortium WHO. Repurposed antiviral drugs for Covid-19—interim who solidarity trial results. *New England journal of Medicine*, 384(6):497–511, 2021.
- [62] World Health Organization. Covid-19 solidarity therapeutics trial, March 2022. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/global-research-on-novel-coronavirus-2019-ncov/solidarity-clinical-trial-for-covid-19-treatments>.
- [63] Mayla Gabriela Silva Borba, Fernando Fonseca Almeida Val, Vanderson Souza Sampaio, Marcia Almeida Araújo Alexandre, Gisely Cardoso Melo, Marcelo Brito, Maria Paula Gomes Mourão, José Diego Brito-Sousa, Djane Baía-da Silva, Marcus Vinitius Farias Guerra, et al. Effect of high vs low doses of chloroquine diphosphate as adjunctive therapy for patients hospitalized with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection: a randomized clinical trial. *JAMA Network Open*, 3(4):e208857–e208857, 2020.

- [64] Wesley Francis Costa Cota. Número de casos confirmados de COVID-19 no Brasil. <https://covid19br.wcota.me/#fontes>, julho 2022.
- [65] Saul Jarcho, Francesco Torti, et al. *Quinine's predecessor*. Johns Hopkins University Press, 1993.
- [66] Rohan Deb Roy. *Malarial subjects: Empire, medicine and nonhumans in British India, 1820–1909*. Cambridge University Press, 2017.
- [67] Leo Barney Slater. *War and disease: biomedical research on malaria in the twentieth century*. Rutgers University Press, 2009.
- [68] Marta G dos Santos Tanos França and José D. Figueroa-Villar. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Química Nova*, 31:1271–1278, 2008.
- [69] JF Snell, JW Corcoran, KL Arora, and FE Hahn. *Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents*, volume 3. Springer Science & Business Media, 2012.
- [70] Md Abdul Alim Al-Bari. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(6):1608–1621, 2015.
- [71] Kristine Krafts, Ernst Hempelmann, and Agnieszka Skórska-Stania. From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. *Parasitology research*, 111(1):1–6, 2012.
- [72] National Library of Medicine. Chloroquine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2719>, Maio 2021.
- [73] RG Cooper and T Magwere. Chloroquine: novel uses & manifestations. *Indian Journal of Medical Research*, 127(4), 2008.
- [74] Linda S Karaffa. *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. RSC Publishing, 2013.
- [75] Mauro Chinappi, Allegra Via, Paolo Marcatili, and Anna Tramontano. On the mechanism of chloroquine resistance in plasmodium falciparum. *PloS one*, 5(11):e14064, 2010.
- [76] William Stone and Christina Klouda. Endosomal-lysosomal proton-fluxes, cq/hcq and sars-cov-2. [https://www.researchgate.net/publication/344452251\\_Endosomal-Lysosomal\\_Proton-Fluxes\\_CQHCQ\\_and\\_SARS-CoV-2](https://www.researchgate.net/publication/344452251_Endosomal-Lysosomal_Proton-Fluxes_CQHCQ_and_SARS-CoV-2), October 2020.

- [77] James A Shayman and Akira Abe. Drug induced phospholipidosis: an acquired lysosomal storage disorder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(3):602–611, 2013.
- [78] Domenico Plantone and Tatiana Koudriavtseva. Current and future use of chloroquine and hydroxychloroquine in infectious, immune, neoplastic, and neurological diseases: a mini-review. *Clinical drug investigation*, 38(8):653–671, 2018.
- [79] David J Browning. *Hydroxychloroquine and chloroquine retinopathy*. Springer, 2014.
- [80] J Cymerman Craig, Hemendra N Bhargava, E Thomas Everhart, Bruce LaBelle, Ulrich Ohnsorge, and Richard V Webster. Absolute configuration of the enantiomers of 7-chloro-4-[[4-(diethylamino)-1-methylbutyl] amino] quinoline (chloroquine). *The Journal of Organic Chemistry*, 53(6):1167–1170, 1988.
- [81] Patrick Augustijns and Norbert Verbeke. Stereoselective pharmacokinetic properties of chloroquine and de-ethyl-chloroquine in humans. *Clinical pharmacokinetics*, 24(3):259–269, 1993.
- [82] Klara Valko and Thong Zhang. Biomimetic properties and estimated in vivo distribution of chloroquine and hydroxy-chloroquine enantiomers. *ADMET and DMPK*, 9(2):151–165, 2021.
- [83] Clifford NB Tagoe and David Ofori-Adjei. Effects of chloroquine and its enantiomers on the development of rat embryos in vitro. *Teratology*, 52(3):137–142, 1995.
- [84] Guanguan Li, Jing Sun, Yi-You Huang, Yingjun Li, Yongjie Shi, Zhe Li, Xiang Li, Feng Hua Yang, Jincun Zhao, Hai-Bin Luo, et al. Enantiomers of chloroquine and hydroxychloroquine exhibit different activities against sars-cov-2 in vitro, evidencing s-hydroxychloroquine as a potentially superior drug for covid-19. *BioRxiv*, 2020.
- [85] Mohd Suhail. A computational and literature-based evaluation for a combination of chiral anti-cov drugs to block and eliminate sars-cov-2 safely. *Journal of Computational Biophysics and Chemistry*, 20(04):417–432, 2021.
- [86] Israel Agranat, Hava Caner, and John Caldwell. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(10):753–768, 2002.
- [87] Ilaria D’Acquarica and Israel Agranat. Chiral switches of chloroquine and hydroxychloroquine: potential drugs to treat covid-19. *Drug Discovery Today*, 25(7):1121, 2020.
- [88] Arnold L Demain and Sergio Sanchez. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of antibiotics*, 62(1):5–16, 2009.

- [89] Md Mushtaque et al. Reemergence of chloroquine (cq) analogs as multi-targeting antimalarial agents: a review. *European journal of medicinal chemistry*, 90:280–295, 2015.
- [90] Allyn M Kaufmann and Jeffrey P Krise. Lysosomal sequestration of amine-containing drugs: analysis and therapeutic implications. *Journal of pharmaceutical sciences*, 96(4):729–746, 2007.
- [91] Mírian da Silva Costa, Rudolf Kiralj, and Márcia Ferreira. Estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o heme. *Química Nova*, 30:25–31, 2007.
- [92] Rang Rang, James M Ritter, Rod J Flower, and Graeme Henderson. *Rang & dale farmacologia*. Elsevier Brasil, 2015.
- [93] Fundação Oswaldo Cruz. Farmanguinhos cloroquina. <https://www.bulas.med.br/p/bulas-de-medicamentos/bula/5751farmanguinhos+cloroquina.htm>, março 2020.
- [94] Ministério da Saúde. Guia de tratamento da malária no brasil. [https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_tratamento\\_malaria\\_brasil.pdf](https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_tratamento_malaria_brasil.pdf), julho 2020.
- [95] Ivone Manzali de Sá. A resistência à cloroquina e a busca de antimalariais entre as décadas de 1960 e 1980. *História, ciências, saúde-Manguinhos*, 18:407–430, 2011.
- [96] Joseli Oliveira-Ferreira, Marcus VG Lacerda, Patrícia Brasil, José LB Ladislau, Pedro L Tauil, and Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro. Malaria in brazil: an overview. *Malaria journal*, 9(1):1–15, 2010.
- [97] Aisha Tamba. Over 400,000 people die of malaria every year-who. <https://standard.gm/gambia-news/over-400000-people-die-of-malaria-every-year-who/>, April 2020.
- [98] Sociedade Brasileira de Reumatologia. O tratamento do lúpus eritematoso sistêmico. <https://www.reumatologia.org.br/orientacoes-ao-paciente/o-tratamento-do-lupus-eritematoso-sistemico/>, Abril 2011.
- [99] Hephzibah Akpovwa. Chloroquine could be used for the treatment of filoviral infections and other viral infections that emerge or emerged from viruses requiring an acidic ph for infectivity. *Cell Biochemistry and Function*, 34(4):191–196, 2016.
- [100] International Committee on Taxonomy of Viruses. International committee on taxonomy of viruses. <https://ictv.global/taxonomy>.

- [101] Md Abdul Alim Al-Bari. Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. *Pharmacology research & perspectives*, 5(1):e00293, 2017.
- [102] Alexander R Surrey and Henry F Hammer. Some 7-substituted 4-aminoquinoline derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 68(1):113–116, 1946.
- [103] Evan W McChesney. Animal toxicity and pharmacokinetics of hydroxychloroquine sulfate. *The American journal of medicine*, 75(1):11–18, 1983.
- [104] Allen H Mackenzie. Pharmacologic actions of 4-aminoquinoline compounds. *The American journal of medicine*, 75(1):5–10, 1983.
- [105] National Center for Biotechnology Information. Hydroxychloroquine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3652#section=Computed-Properties>.
- [106] Ilan Ben-Zvi, Shaye Kivity, Pnina Langevitz, and Yehuda Shoenfeld. Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 42(2):145–153, 2012.
- [107] G Michael Blackburn, Michael J Gait, David Loakes, David M Williams, Andy Flavell, Martin Egli, W David Wilson, Stephanie Allen, Anna Marie Pyle, Julie Fisher, et al. *Nucleic acids in chemistry and biology*. Royal Society of Chemistry, 2006.
- [108] Ralf Dahm. Discovering dna: Friedrich miescher and the early years of nucleic acid research. *Human genetics*, 122(6):565–581, 2008.
- [109] Erwin Chargaff. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia*, 6(6):201–209, 1950.
- [110] Alfred D Hershey and Martha Chase. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. In *Die Entdeckung der Doppelhelix*, pages 121–139. Springer, 2017.
- [111] James D Watson and Francis HC Crick. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356):737–738, 1953.
- [112] David L Nelson and Michael M Cox. *Princípios de Bioquímica de Lehninger-7*. Artmed Editora, 2018.
- [113] Andréa Carla de Souza Góes and Bruno Vinicius Ximenes Oliveira. Projeto genoma humano: um retrato da construção do conhecimento científico sob a ótica da revista ciência hoje. *Ciência & Educação (Bauru)*, 20:561–577, 2014.

- [114] Biological U.S. Department of Energy Office of Science and Environmental Research. Human genome project information archive 1990–2003. [https://web.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/redirect.shtml](https://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/redirect.shtml), 2019.
- [115] Chris R Calladine and Horace Drew. *Understanding DNA: the molecule and how it works*. Academic press, 1997.
- [116] Andrew D Bates, Anthony Maxwell, et al. *DNA topology*. Oxford University Press, USA, 2005.
- [117] Robijn F Bruinsma. Physics of protein-dna interaction. In *Physics of bio-molecules and cells. Physique des biomolécules et des cellules*, pages 1–68. Springer, 2002.
- [118] James D Watson, Tania A Baker, Stephen P Bell, Alexander Gann, Michael Levine, and Richard Losicke. *Biologia Molecular do Gene*. Artmed Editora, 2015.
- [119] Leslie Pray. Discovery of dna structure and function: Watson and crick. *Nature Education*, 1(1), 2008.
- [120] Christopher A Hunter and Jeremy KM Sanders. The nature of.  $\pi$ - $\pi$  interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 112(14):5525–5534, 1990.
- [121] Francesco Luigi Gervasio, Riccardo Chelli, Piero Procacci, and Vincenzo Schettino. The nature of intermolecular interactions between aromatic amino acid residues. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 48(1):117–125, 2002.
- [122] Hande Karabıyık, Resul Sevinçek, and Hasan Karabıyık.  $\pi$ -cooperativity effect on the base stacking interactions in dna: is there a novel stabilization factor coupled with base pairing h-bonds? *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(29):15527–15538, 2014.
- [123] Ludmila V Yakushevich. *Nonlinear physics of DNA*. John Wiley & Sons, 2006.
- [124] Boualem Hammouda. Insight into the denaturation transition of dna. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(5):532–534, 2009.
- [125] Rita Dias and Bjorn Lindman. *DNA interactions with polymers and surfactants*. John Wiley & Sons, 2008.
- [126] Eduardo Ferreira da Silva. Análise de complexos dna-ligantes com aplicações na construção de carreadores de fármacos. 2018.
- [127] Bruce Alberts. Molecular biology of the cell 5e. *Garland science*, pages 906–911, 2008.
- [128] Iwao Teraoka. *Polymer solutions: an introduction to physical properties*. John Wiley, 2002.

- [129] Angelo Rosa. Lecture notes on polymer physics. [https://sites.ifi.unicamp.br/veraoifgw/files/2015/03/notes\\_polymers\\_Angelo-Rosa.pdf](https://sites.ifi.unicamp.br/veraoifgw/files/2015/03/notes_polymers_Angelo-Rosa.pdf).
- [130] Michael Rubinstein, Ralph H Colby, et al. *Polymer physics*, volume 23. Oxford university press New York, 2003.
- [131] Frederick Reif. *Fundamentals of statistical and thermal physics*. Waveland Press, 2009.
- [132] John F Marko and Eric D Siggia. Stretching dna. *Macromolecules*, 28(26):8759–8770, 1995.
- [133] Andrew Marantan and L Mahadevan. Mechanics and statistics of the worm-like chain. *American Journal of Physics*, 86(2):86–94, 2018.
- [134] Toshihiro Kawakatsu. *Statistical physics of polymers: an introduction*. Springer Science & Business Media, 2004.
- [135] Donald Crothers Victor Bloomfield and Ignacio Tinoco. *Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions*. University Science Books, 2000.
- [136] Marcio S Rocha. Revisiting the neighbor exclusion model and its applications. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 93(1):1–7, 2010.
- [137] GD Scatchard. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.*, 51:660–672, 1949.
- [138] Carla Wofsy and Byron Goldstein. Interpretation of scatchard plots for aggregating receptor systems. *Mathematical biosciences*, 112(1):115–154, 1992.
- [139] Donald Voet, Judith G Voet, and Charlotte W Pratt. *Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular*. Artmed Editora, 2014.
- [140] Melanie I Stefan and Nicolas Le Novere. Cooperative binding. *PLoS computational biology*, 9(6):e1003106, 2013.
- [141] Archibald Vivian Hill. The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. *Biochemical Journal*, 7(5):471, 1913.
- [142] James D McGhee and Peter H von Hippel. Theoretical aspects of dna-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *Journal of molecular biology*, 86(2):469–489, 1974.
- [143] Robert E Rhoads. *Proceedings of the Research Symposium on Complexes of Biologically Active Substances with Nucleic Acids and Their Modes of Action: Held at the Walter Reed Army Institute of Research Washington, 16–19 March 1970*, volume 2. Springer Science & Business Media, 2012.

- [144] J Logan Irvin, Elinor Moore Irvin, and Frank S Parker. The interaction of antimalarials with nucleic acids. *Science*, 110(2860):426–428, 1949.
- [145] Frank S Parker and J Logan Irvin. The interaction of chloroquine with nucleic acids and nucleoproteins. *Journal of biological Chemistry*, 199(2):897–909, 1952.
- [146] FE Hahn, RL O’Brien, J Ciak, JL Allison, and JG Olenick. Studies on modes of action of chloroquine, quinacrine, and quinine and on chloroquine resistance. *Military Medicine*, 131(suppl\_9):1071–1089, 1966.
- [147] Lerena Wade Blodgett and K Lemone Yielding. Comparison of chloroquine binding to dna, and polyadenylic and polyguanylic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 169(2):451–456, 1968.
- [148] Stanley N Cohen and K Lemone Yielding. Inhibition of dna and rna polymerase reactions by chloroquine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(2):521–527, 1965.
- [149] NB Kurnick and Irma E Radcliffe. Reaction between dna and quinacrine and other antimalarials. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 60(4):669–688, 1962.
- [150] RJT Smeenk, HG Van den Brink, K Brinkman, RM Termaat, JHM Berden, and AJG Swaak. Anti-dsdna: choice of assay in relation to clinical value. *Rheumatology international*, 11(3):101–107, 1991.
- [151] Maria Roseli Monteiro Callado, José Rubens Costa Lima, Maria Nancy de Alencar Barroso, Antonio Tiago Mota Pinheiro, Moisés Francisco da Cruz Neto, Maria Arenilda de Lima Abreu, and Walber Pinto Vieira. Utilidade da triagem dos anticorpos anti-dsdna por quimioluminescência, seguida de confirmação por imunofluorescência indireta. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 53:412–418, 2013.
- [152] David Stollar and Lawrence Levine. Antibodies to denatured deoxyribonucleic acid in lupus erythematosus serum. v. mechanism of dna-anti-dna inhibition by chloroquine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 101(2):335–341, 1963.
- [153] RICHARD L O’Brien, John G Olenick, and Fred E Hahn. Reactions of quinine, chloroquine, and quinacrine with dna and their effects on the dna and rna polymerase reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 55(6):1511–1517, 1966.
- [154] HELENE STERNGLANZ, K LEMONE YIELDING, and KENNETH M PRUITT. Nuclear magnetic resonance studies of the interaction of chloroquine diphosphate with adenosine 5’-phosphate and other nucleotides. *Molecular Pharmacology*, 5(4):376–381, 1969.

- [155] Fred E. Victor Hahn, Thomas A. and Elizabeth Hansen. A preliminary nuclear magnetic resonance study of the effect of ph on the structure of chloroquine diphosphate. In *Proceedings of the Research Symposium on Complexes of Biologically Active Substances with Nucleic Acids and Their Modes of Action*, pages 91–102. Springer, 1971.
- [156] Stanley N Cohen and K Lemone Yielding. Spectrophotometric studies of the interaction of chloroquine with deoxyribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 240(7):3123–3131, 1965.
- [157] J Logan Irvin and Elinor Moore Irvin. Spectrophotometric and potentiometric evaluation of apparent acid dissociation exponents of various 4-aminoquinoline' s1. *Journal of the American Chemical Society*, 69(5):1091–1099, 1947.
- [158] Alex Montwill and Ann Breslin. *Let there be light: the story of light from atoms to galaxies*. World Scientific, 2013.
- [159] Giovanni Volpi Philip H. Jones, Onofrio M. Magarò. *Optical Tweezers: Principles and Applications*. Champaign Library, 2017.
- [160] Peter Lebedew. Untersuchungen über die druckkräfte des lichtetes. *Annalen der Physik*, 311(11):433–458, 1901.
- [161] Ernest Fox Nichols and Gordon Ferrie Hull. The pressure due to radiation.(second paper.). *Physical Review (Series I)*, 17(1):26, 1903.
- [162] Charles H Townes. *How the laser happened: adventures of a scientist*. Oxford University Press, 2018.
- [163] Arthur Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical review letters*, 24(4):156, 1970.
- [164] Arthur Ashkin. History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 6(6):841–856, 2000.
- [165] Arthur Ashkin and JM Dziedzic. Optical levitation by radiation pressure. *Applied Physics Letters*, 19(8):283–285, 1971.
- [166] Arthur Ashkin and JM Dziedzic. Optical levitation in high vacuum. *Applied Physics Letters*, 28(6):333–335, 1976.
- [167] Arthur Ashkin and James M Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235(4795):1517–1520, 1987.

- [168] Jeffrey T Finer, Robert M Simmons, and James A Spudich. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, 368(6467):113–119, 1994.
- [169] Steven M Block, Lawrence SB Goldstein, and Bruce J Schnapp. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature*, 348(6299):348–352, 1990.
- [170] Márcio Santos Rocha. Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicação no estudo da interação dna-fármacos. 2008.
- [171] Arthur Ashkin. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical journal*, 61(2):569–582, 1992.
- [172] A Mazolli. Teoria das pinças ópticas: uma aplicação da teoria de espalhamento mie. *Instituto de Física da UFRJ*, page 41, 2003.
- [173] Wolfgang KH Panofsky and Melba Phillips. *Classical electricity and magnetism*. Courier Corporation, 2005.
- [174] W Sears, Mark Waldo Zemansky, Hugh D Young, and Roger A Freedman. Física óptica e física moderna. *Trad. Cláudia Martins*, 12, 2004.
- [175] EF Silva, RF Bazoni, EB Ramos, and MS Rocha. Dna-doxorubicin interaction: New insights and peculiarities. *Biopolymers*, 107(3):e22998, 2017.
- [176] Ichiro Amitani, Bian Liu, Christopher C Dombrowski, Ronald J Baskin, and Stephen C Kowalczykowski. Watching individual proteins acting on single molecules of dna. In *Methods in enzymology*, volume 472, pages 261–291. Elsevier, 2010.
- [177] GV Shivashankar and A Libchaber. Single dna molecule grafting and manipulation using a combined atomic force microscope and an optical tweezer. *Applied physics letters*, 71(25):3727–3729, 1997.
- [178] Ian R Kenyon. *The light fantastic: a modern introduction to classical and quantum optics*. Oxford University Press, USA, 2008.
- [179] MS Rocha. Optical tweezers for undergraduates: theoretical analysis and experiments. *American Journal of Physics*, 77(8):704–712, 2009.
- [180] MS Rocha. Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate dna interactions with drugs and proteins in single molecule experiments. *Integrative Biology*, 7(9):967–986, 2015.

- [181] Muhittin Yılmaz, Cem Ozic, and İlhami Gok. Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. *Gel Electrophoresis–Principles and Basics*, 4:33, 2012.
- [182] Oliver Smithies. *How it all began: A personal history of gel electrophoresis*. Springer, 2019.
- [183] Gary W Slater and Jaan Noolandi. The biased reptation model of dna gel electrophoresis: mobility vs molecular size and gel concentration. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 28(10):1781–1791, 1989.
- [184] Hsien-Chen Ko, Chi-Tsu Yuan, and Jau Tang. Probing and controlling fluorescence blinking of single semiconductor nanoparticles. *Nano reviews*, 2(1):5895, 2011.
- [185] Kasvi. Você sabe como é preparado o gel de agarose na eletroforese? <https://kasvi.com.br/como-preparado-gel-de-agarose-eletroforese/>, Agosto 2016.
- [186] Instructables. How to prepare an electrophoresis argarose gel. <https://www.instructables.com/How-to-Prepare-an-Electrophoresis-Argarose-Gel/>, July 2011.
- [187] FAP Crisafuli, EB Ramos, and MS Rocha. Characterizing the interaction between dna and gelred fluorescent stain. *European Biophysics Journal*, 44(1):1–7, 2015.
- [188] Brenna de Sousa Barbosa, Fernanda Araujo dos Santos, Muriel Magda Lustosa Pimentel, Denilsa Pires Fernandes, Erika Almeida Prexedes, and Marcelo Barbosa Bezerra. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. uma revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 9(2):334–347, 2015.
- [189] Juan Carlos Ramos Gonçalves; Marianna Vieira Sobral. *Cultivo de Células: da teoria à bancada*. UFPB, PB, 2020.
- [190] Anna Christina Rosa Guimarães; Daniel Santos de Souza; Emanuele Amorin Alves; Ester Maria Mota; Helene Santos Barbosa; Leandro Medrado; Luzia de Fátima Gonçalves Caputo; Lycia de Brito Gitirana; Pedro Paulo de Abreu Manso; Suzana Côrte-Real. *Conceitos e métodos para formação de profissionais de laboratório em saúde*. FioCruz, IOC, SP, 2010.
- [191] The Jackson Laboratory. C57bl/6j. <https://www.jax.org/strain/000664>.
- [192] Chikara Sato, Shosuke Ito, and Takuji Takeuchi. Establishment of a mouse melanocyte clone which synthesizes both eumelanin and pheomelanin. *Cell structure and function*, 10(4):421–425, 1985.
- [193] Audrey Uong and Leonard I Zon. Melanocytes in development and cancer. *Journal of cellular physiology*, 222(1):38–41, 2010.

- [194] Dorothy C Bennett, Philip J Cooper, and Ian R Hart. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the b16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *International journal of cancer*, 39(3):414–418, 1987.
- [195] Bizhan Bandarchi, Cyrus Aleksandre Jabbari, Ali Vedadi, and Roya Navab. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. *Journal of clinical pathology*, 66(8):644–648, 2013.
- [196] NAOKI Osada, Arihiro Kohara, Toshiyuki Yamaji, Noriko Hirayama, Fumio Kasai, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, and Kentaro Hanada. The genome landscape of the african green monkey kidney-derived vero cell line. *DNA research*, 21(6):673–683, 2014.
- [197] Rebecca Sheets. History and characterization of the vero cell line. *Cent Biol Eval Res (CBER)*, pages 1–12, 2000.
- [198] European Collection of Authenticated Cell Cultures. General cell collection: Vero. [https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=84113001&collection=ecacc\\_gc](https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=84113001&collection=ecacc_gc).
- [199] Elena Postnikova, Yu Cong, Lisa Evans DeWald, Julie Dyall, Shuiqing Yu, Huanying Zhou, Robin Gross, James Logue, Yingyun Cai, Nicole Deiuliis, et al. Testing therapeutics in cell-based assays: Factors that influence the apparent potency of drugs. *PLoS One*, 13(3):e0194880, 2018.
- [200] Célia Sayoko Takata, Flávia Saldanha Kubrusly, Cosue Miyaki, Inácio França Mendes, and Edda de Rizzo. Suscetibilidade da linhagem de células vero a cepas vacinais do vírus do sarampo. *Revista de Saúde Pública*, 28:209–212, 1994.
- [201] Sascha Kiesslich and Amine A Kamen. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotechnology Advances*, 44:107608, 2020.
- [202] Frank L Graham, J Smiley, WC Russell, and R Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by dna from human adenovirus type 5. *Journal of general virology*, 36(1):59–72, 1977.
- [203] Milton W Taylor. *Viruses and man: A history of interactions*. Springer, 2014.
- [204] Yao-Cheng Lin, Morgane Boone, Leander Meuris, Irma Lemmens, Nadine Van Roy, Arne Soete, Joke Reumers, Matthieu Moisse, Stéphane Plaisance, Radoje Drmanac, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature communications*, 5(1):1–12, 2014.

- [205] Michela Pulix, Vera Lukashchuk, Daniel C Smith, and Alan J Dickson. Molecular characterization of hek293 cells as emerging versatile cell factories. *Current Opinion in Biotechnology*, 71:18–24, 2021.
- [206] Diego Fontana, Ricardo Kratje, Marina Etcheverrigaray, and Claudio Prieto. Rabies virus-like particles expressed in hek293 cells. *Vaccine*, 32(24):2799–2804, 2014.
- [207] Petiot Emma and Amine Kamen. Real-time monitoring of influenza virus production kinetics in hek293 cell cultures. *Biotechnology Progress*, 29(1):275–284, 2013.
- [208] Bárbara de Alencar Oliveira, Eliane dos Santos França, Viviane Guimarães Souza, Antonio Carlos Rosário Vallinoto, and Andréa Nazaré Monteiro Rangel da Silva. Vetores virais para uso em terapia gênica. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 9(2):10–10, 2018.
- [209] Chao Shen, Meijia Gu, Ci Song, Lixia Miao, Liu Hu, Dan Liang, and Congyi Zheng. The tumorigenicity diversification in human embryonic kidney 293 cell line cultured in vitro. *Biologicals*, 36(4):263–268, 2008.
- [210] Rafa S Almeer, Daoud Ali, Saud Alarifi, Saad Alkahtani, and Mansour Alman-sour. Green platinum nanoparticles interaction with hek293 cells: Cellular toxicity, apoptosis, and genetic damage. *Dose-Response*, 16(4):1559325818807382, 2018.
- [211] Yawen Chen, Ting Xu, Xinyue Yang, Wenhai Chu, Shuangqing Hu, and Daqiang Yin. The toxic potentials and focus of disinfection byproducts based on the human embryonic kidney (hek293) cell model. *Science of the Total Environment*, 664:948–957, 2019.
- [212] Xiongwei Liu, Kuizhong Shan, Xiaxia Shao, Xianqing Shi, Yun He, Zhen Liu, Joe Antony Jacob, and Lichun Deng. Nanotoxic effects of silver nanoparticles on normal hek-293 cells in comparison to cancerous hela cell line. *International Journal of Nanomedicine*, 16:753, 2021.
- [213] Özlem Sultan Aslantürk. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*, 2:64–80, 2018.
- [214] Sizue Ota Rogero, Ademar Benévolo Lugão, Tamiko Ichikawa Ikeda, and Áurea Silveira Cruz. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, 6:317–320, 2003.
- [215] Aysun Adan, Yagmur Kiraz, and Yusuf Baran. Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current pharmaceutical biotechnology*, 17(14):1213–1221, 2016.

- [216] Tim Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2):55–63, 1983.
- [217] E Borenfreund, H Babich, and N Martin-Alguacil. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—the neutral red (nr) and tetrazolium mtt tests. *Toxicology in vitro*, 2(1):1–6, 1988.
- [218] Mediha Selimović-Dragaš, Amina Huseinbegović, Sedin Kobašlija, and Šahza Hatibović-Kofman. A comparison of the in vitro cytotoxicity of conventional and resin modified glass ionomer cements. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 12(4):273, 2012.
- [219] Jean Paul Kamdem. Metodologia da pesquisa no ensino de ciências biológicas. <https://slideplayer.com.br/slide/11703785/>, 2016.
- [220] Francois Denizot and Rita Lang. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, 89(2):271–277, 1986.
- [221] David T Vistica, Philip Skehan, Dominic Scudiero, Anne Monks, Angela Pittman, and Michael R Boyd. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer research*, 51(10):2515–2520, 1991.
- [222] Munetaka Ishiyama, Hideyuki Tominaga, Masanobu Shiga, Kazumi Sasamoto, Yosuke Ohkura, and Keiyu Ueno. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19(11):1518–1520, 1996.
- [223] Paula Roberta Otaviano Soares. Atividade antiproliferativa de benzaldeído canfeno tiossemicarbazonas em células de melanoma humano (sk-mel-37). 2008.
- [224] Harvey Motulsky and Arthur Christopoulos. *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting*. Oxford University Press, 2004.
- [225] Senem Aykul and Erik Martinez-Hackert. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical biochemistry*, 508:97–103, 2016.
- [226] Louis J Casarett et al. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*, volume 71470514. McGraw-Hill New York, 2008.

- [227] Arijit Bag and Pradip Kr Ghorai. Development of quantum chemical method to calculate half maximal inhibitory concentration (ic50). *Molecular Informatics*, 35(5):199–206, 2016.
- [228] RFea Bazoni, CHM Lima, EB Ramos, and MS Rocha. Force-dependent persistence length of dna–intercalator complexes measured in single molecule stretching experiments. *Soft Matter*, 11(21):4306–4314, 2015.
- [229] MS Rocha, MC Ferreira, and ON Mesquita. Transition on the entropic elasticity of dna induced by intercalating molecules. *The Journal of chemical physics*, 127(10):09B609, 2007.
- [230] Aleksandra Mihailovic, Ioana Vladescu, Micah McCauley, Elaine Ly, Mark C Williams, Eileen M Spain, and Megan E Nuñez. Exploring the interaction of ruthenium (ii) polypyridyl complexes with dna using single-molecule techniques. *Langmuir*, 22(10):4699–4709, 2006.
- [231] Ali A Almaqwashi, Thayaparan Paramanathan, Ioulia Rouzina, and Mark C Williams. Mechanisms of small molecule–dna interactions probed by single-molecule force spectroscopy. *Nucleic acids research*, 44(9):3971–3988, 2016.
- [232] Andreas S Biebricher, Iddo Heller, Roel FH Roijmans, Tjalle P Hoekstra, Erwin JG Peterman, and Gijs JL Wuite. The impact of dna intercalators on dna and dna-processing enzymes elucidated through force-dependent binding kinetics. *Nature communications*, 6(1):1–12, 2015.
- [233] LA Reis, EB Ramos, and MS Rocha. Dna interaction with diaminobenzidine studied with optical tweezers and dynamic light scattering. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(46):14345–14350, 2013.
- [234] KE Reinert. Anthracycline-binding induced dna stiffening, bending and elongation; stereochemical implications from viscometric investigations. *Nucleic acids research*, 11(10):3411–3430, 1983.
- [235] Graham J Atwell, William A Denny, George R Clark, Charmian J O’Connor, Yukiko Matsuzawa, and Kenichi Yoshikawa. Mono-, bis- and tetra-acridine ligands: Synthesis, x-ray structural determination and dynamic fluorescence microscopic studies on the modification of the higher order structure of dna. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 8(9):597–604, 1995.
- [236] Stephen R Quake, Hazen Babcock, and Steven Chu. The dynamics of partially extended single molecules of dna. *Nature*, 388(6638):151–154, 1997.

- [237] L Oliveira and MS Rocha. Force spectroscopy unravels the role of ionic strength on dna-cisplatin interaction: Modulating the binding parameters. *Physical Review E*, 96(3):032408, 2017.
- [238] Johannes Schindelin, Curtis T Rueden, Mark C Hiner, and Kevin W Eliceiri. The imagej ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular reproduction and development*, 82(7-8):518–529, 2015.
- [239] Caroline A Schneider, Wayne S Rasband, and Kevin W Eliceiri. Nih image to imagej: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7):671–675, 2012.
- [240] RF Bazoni, TA Moura, and MS Rocha. Hydroxychloroquine exhibits a strong complex interaction with dna: Unraveling the mechanism of action. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 11(22):9528–9534, 2020.
- [241] Richard L O’Brien, James L Allison, and Fred E Hahn. Evidence for intercalation of chloroquine into dna. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 129(3):622–624, 1966.
- [242] Frank Kwakye-Berko and Steven R Meshnick. Binding of chloroquine to dna. *Molecular and biochemical parasitology*, 35(1):51–55, 1989.
- [243] Kathy R Chaurasiya, Thayaparan Paramanathan, Micah J McCauley, and Mark C Williams. Biophysical characterization of dna binding from single molecule force measurements. *Physics of life reviews*, 7(3):299–341, 2010.
- [244] Javier Jarillo, José A Morín, Elena Beltrán-Heredia, Juan PG Villaluenga, Borja Ibarra, and Francisco J Cao. Mechanics, thermodynamics, and kinetics of ligand binding to biopolymers. *PLoS One*, 12(4):e0174830, 2017.
- [245] Marília Luz Cardenas Antoni Cortés, Marta Cascante and Athel Cornish-Bowden. Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data. *Biochemical Journal*, 357(1):263–268, 2001.
- [246] Tiziana Rossi, Andrea Coppi, Elisa Bruni, Antonio Ruberto, Saverio Santachiara, and Giosue Baggio. Effects of anti-malarial drugs on mcf-7 and vero cell replication. *Anticancer research*, 27(4B):2555–2559, 2007.
- [247] Edward J Calabrese and Linda A Baldwin. Hormesis: the dose-response revolution. *The Selected Works of Edward J. Calabrese*, page 2, 2003.
- [248] RL Schroeder, P Pendleton, and JP Gerber. Physical factors affecting chloroquine binding to melanin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 134:8–16, 2015.

- [249] Shigeki Inoue, Katsutoshi Hasegawa, Shosuke Ito, Kazumasa Wakamatsu, and Keisuke Fujita. Antimelanoma activity of chloroquine, an antimalarial agent with high affinity for melanin. *Pigment cell research*, 6(5):354–358, 1993.
- [250] Minela Aida Maranduca, Daciana Branisteanu, Dragomir Nicolae Serban, Daniel Constantin Branisteanu, Gabriela Stoleriu, Nicuta Manolache, and Ionela Lascramioara Serban. Synthesis and physiological implications of melanic pigments. *Oncology Letters*, 17(5):4183–4187, 2019.
- [251] Mohamad A El Shishtawy, Khodor Haidar Hassan, Ragaee Ramzy, Fadwa Berri, Mohamad Mortada, Salam Nasreddine, and Mohamad Ezzedine. Comparative toxicity study of chloroquine and hydroxychloroquine on adult albino rats. *Eur Sci J*, 1:399–407, 2015.
- [252] Eugen Alexander Shippey, Vanya D Wagler, and Angelique N Collamer. Hydroxychloroquine: An old drug with new relevance. *Cleveland Clinic journal of medicine*, 85(6):459–467, 2018.
- [253] Jacob A Lebin and Kathy T LeSaint. Brief review of chloroquine and hydroxychloroquine toxicity and management. *Western Journal of Emergency Medicine*, 21(4):760, 2020.
- [254] Edward J Calabrese, Jaap C Hanekamp, Yannic N Hanekamp, Rachna Kapoor, Gaurav Dhawan, and Evgenios Agathokleous. Chloroquine commonly induces hormetic dose responses. *Science of the Total Environment*, 755:142436, 2021.
- [255] Philippe Gautret, Jean-Christophe Lagier, Philippe Parola, Line Meddeb, Jacques Sevestre, Morgane Mailhe, Barbara Doudier, Camille Aubry, Sophie Amrane, and Piseth Seng. Clinical and microbiological effect of a combination of hydroxychloroquine and azithromycin in 80 covid-19 patients with at least a six-day follow up: A pilot observational study. *Travel medicine and infectious disease*, 34:101663, 2020.
- [256] Tânia Tomé. *Dinâmica Estocástica e Irreversibilidade Vol. 35*. Edusp, 2001.
- [257] Alexei R Khokhlov, Alexander Yu Grosberg, and Vijay S Pande. *Statistical physics of macromolecules*, volume 1. Springer, 1994.

# APÊNDICE A – Passeio aleatório

## 1.1 O passeio aleatório em uma dimensão

Nesta seção, estudaremos brevemente o modelo de passeio aleatório em uma dimensão, cuja generalização para mais dimensões será dada no Apêndice (1.2) [130, 131].

Para definir o modelo, imaginemos uma partícula que se mova de forma errática em um reticulado unidimensional, de espaçamento  $\Delta x = 1$ , a cada passo saltando para a esquerda com probabilidade  $p$  e para a direita com probabilidade  $(1 - p)$  [256, 131]. Em um passeio sem sentido preferencial,  $p = \frac{1}{2}$ , sendo este o caso que nos interessa [130]. O número de trajetórias compostas por  $N$  passos e que terminem na posição  $x$  é dada por:

$$W(N, x) = \frac{N!}{N_+!N_-!}, \quad (1.1)$$

onde  $N_+$  é o número de passos para a direção em que  $x$  cresce e  $N_-$  é o número de passos na direção em que  $x$  decresce, ambos respeitando

$$N = N_+ + N_-. \quad (1.2)$$

Visto que  $x = N_+ - N_-$ , podemos ainda usar a condição de normalização, dada pela Eq. (1.2), afim de se eliminar a dependência em  $N_+$  e  $N_-$ . Com isto, a Eq. (1.1) se torna:

$$W(N, x) = \frac{N!}{\left(\frac{N+x}{2}\right)! \left(\frac{N-x}{2}\right)!}, \quad (1.3)$$

Como o número total de trajetórias contendo  $N$  passos é de  $2^N$ , a probabilidade de uma dessas trajetórias terminar a uma distância  $x$  da origem é:

$$P(N, x) = \frac{W(N, x)}{2^N} = \frac{N!}{2^N \left(\frac{N+x}{2}\right)! \left(\frac{N-x}{2}\right)!}. \quad (1.4)$$

Podemos modificar ainda a Eq. (1.4) levando-se em conta que:

$$\left(\frac{N+x}{2}\right)! = \left(\frac{N}{2}\right)! \prod_{i=1}^{\frac{x}{2}} \left(\frac{N}{2} + i\right) \quad (1.5)$$

e

$$\left(\frac{N-x}{2}\right)! = \frac{\left(\frac{N}{2}\right)!}{\prod_{i=1}^{\frac{x}{2}} \left(\frac{N}{2} + 1 - i\right)}. \quad (1.6)$$

Com estas modificações, tomando-se o logaritmo natural de ambos os lados da Eq. (1.4) e com algumas manipulações algébricas, obtemos:

$$\ln \left( \frac{W(N, x)}{2^N} \right) = \ln \left( \frac{N!}{2^N \left(\frac{N}{2}\right)! \left(\frac{N}{2}\right)!} \right) - \sum_{i=1}^{\frac{x}{2}} \ln \left( \frac{1 + \frac{2i}{N}}{1 + \frac{2(1-i)}{N}} \right). \quad (1.7)$$

Para  $N \gg 1$ , podemos usar  $\ln(1+x) \approx x$  na Eq. (1.7), obtendo:

$$\ln \left( \frac{W(N, x)}{2^N} \right) = \ln \left( \frac{N!}{2^N \left(\frac{N}{2}\right)! \left(\frac{N}{2}\right)!} \right) - \frac{x^2}{2N}. \quad (1.8)$$

Aqui, usamos o fato de que

$$\sum_{i=1}^n i = n \frac{(n+1)}{2}. \quad (1.9)$$

Tomando-se o exponencial da Eq. (1.8), obtemos:

$$P(N, x) = \frac{N!}{2^N \left(\frac{N}{2}\right)! \left(\frac{N}{2}\right)!} e^{-\frac{x^2}{2N}}. \quad (1.10)$$

Usando-se agora a aproximação de Stirling  $N! \sim \sqrt{2\pi N} \left(\frac{N}{e}\right)^N$ , obtemos finalmente a aproximação gaussiana:

$$P(N, x) = \frac{2}{\sqrt{2\pi N}} e^{-\frac{x^2}{2N}}. \quad (1.11)$$

Contudo, a Eq. (1.11) foi obtida para  $x$  e  $N$  pertencendo ao conjunto  $\{0, 1, 2, \dots\}$  e simultaneamente par ou ímpar, caso contrário,  $P(N, x) = 0$  [130]. Ainda assim, podemos utilizar a Eq. (1.11) como uma densidade de probabilidades. Com esta finalidade, definimos  $P(N, x)dx$  como a probabilidade de encontrarmos uma trajetória que finalize no intervalo  $\left(x - \frac{dx}{2}, x + \frac{dx}{2}\right)$  após  $N$  passos. Assim, podemos integrar a Eq. (1.11) e aplicar o fator de normalização adequado, obtendo assim:

$$P(N, x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi N}} e^{-\frac{x^2}{2N}}. \quad (1.12)$$

Vale notar também que  $\langle x^2 \rangle = N$  e, como  $\langle x \rangle = 0$ , temos a variância  $\sigma_x^2 = \langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2 = \langle x^2 \rangle$ . Com isto, podemos representar  $P(N, x)$  como:

$$P(N, x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi \langle x^2 \rangle}} e^{-\frac{x^2}{2\langle x^2 \rangle}}, \quad (1.13)$$

que é uma forma mais usual.

De uma maneira geral, podemos imaginar um passeio aleatório cujo comprimento de passo seja  $b$ , resultando em  $\langle x^2 \rangle = b^2 N$  e, conseqüentemente,  $\sigma_x^2 = b^2 N$ .

## 1.2 O passeio aleatório em mais dimensões

Um passeio aleatório em um espaço de dimensão  $n_D \geq 1$ , no qual não haja sentido e nem direção preferenciais, podemos generalizar o Apêndice (1.1) de uma forma simples, visto que podemos enxergar o passeio multidimensional como um conjunto de passeios aleatórios independentes [130, 256, 131]. Assim, um passeio em  $n$  dimensões formado por  $N$  passos de comprimento  $b$  findará em uma posição representada pelo vetor  $\vec{R}$  com probabilidade:

$$P_{n_D}(N, \vec{R}) dx_1 dx_2 \cdots dx_n = P_{1_D}(N, x_1) P_{1_D}(N, x_2) \cdots P_{1_D}(N, x_n) dx_1 dx_2 \cdots dx_n, \quad (1.14)$$

onde

$$\vec{R} = \sum_{i=1}^{n_D} x_i \hat{x}_i. \quad (1.15)$$

Mais uma vez, como no caso unidimensional,

$$\langle \vec{R} \rangle = \vec{0} \quad (1.16)$$

e

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = \sum_{i=1}^{n_D} \langle x_i^2 \rangle = b^2 N. \quad (1.17)$$

Vale notar que  $\vec{R}^2$  representa aqui o quadrado do módulo de  $\vec{R}$ .

Como cada um dos passeios aleatórios unidimensionais contribui igualmente para a soma na Eq. (1.17), por seguirem a mesma distribuição de probabilidades  $P_{1_D}(N, x_i)$  [130, 131], resulta que

$$\langle x_i^2 \rangle = \frac{1}{n_D} \langle \vec{R}^2 \rangle = \frac{1}{n_D} b^2 N \quad (1.18)$$

para  $i \leq n_D$ . Com isto, podemos escrever:

$$P_{1_D}(N, x_i) = \sqrt{\frac{n_D}{2\pi \langle \vec{R}^2 \rangle}} e^{-\frac{n_D x_i^2}{2 \langle \vec{R}^2 \rangle}}. \quad (1.19)$$

Visto que  $P_{n_D}(N, \vec{R}) = \prod_{i=1}^{n_D} P_{1_D}(N, x_i)$ , temos que:

$$P_{n_D}(N, \vec{R}) = \sqrt{\frac{n_D}{2\pi \langle \vec{R}^2 \rangle}} e^{-\frac{n_D \vec{R}^2}{2 \langle \vec{R}^2 \rangle}}. \quad (1.20)$$

Em coordenadas polares, podemos encontrar a probabilidade total de uma configuração polimérica ser encontrada com um vetor  $\vec{R}$  cujo módulo  $R$  possua valor num intervalo

$\left(R - \frac{dR}{2}, R + \frac{dR}{2}\right)$  [130]:

$$P(R) = 4\pi R^2 P(\vec{R}). \quad (1.21)$$

# APÊNDICE B – Relação entre a função de partição e função de correlação do modelo Kratky-Porod

O desenvolvimento matemático referente à Eq. (4.18) relacionada a função de partição do modelo Kratky-Porod, é dada por:

$$Z = (2\pi)^{N-1} \left[ \int d\gamma \sin\gamma \exp(\beta\kappa_0 \cos\gamma) \right]^{N-1}$$

Fazendo-se  $\omega = \beta\kappa_0 \cos\gamma$ , temos  $d\omega = -\beta\kappa_0 \sin\gamma d\gamma$ . E assim, com  $\sin\gamma d\gamma = -d\omega/\beta\kappa_0$ , torna-se a integral entre colchetes:

$$\begin{aligned} \left\{ \int_0^\pi d\gamma \sin\gamma \exp\beta\kappa_0 \cos\gamma \right\} &= -\frac{1}{\beta\kappa_0} \int_{\beta\kappa_0}^{-\beta\kappa_0} d\omega e^\omega \\ &= \frac{1}{\beta\kappa_0} \int_{-\beta\kappa_0}^{\beta\kappa_0} d\omega e^\omega \\ &= \frac{2}{\beta\kappa_0} \sinh(\beta\kappa_0) \end{aligned} \quad (2.1)$$

Onde,

$$Z = \left( \frac{4\pi}{\beta\kappa_0} \sinh(\beta\kappa_0) \right)^{N-1} \quad (2.2)$$

Agora, da Eq. (4.18), vemos que cada um dos segmentos  $\gamma_i$  são variáveis independentes e igualmente distribuídas, visto que:

$$\begin{aligned} Z\{\gamma_1, \gamma_2, \dots, \gamma_{N-1}\} &= Z_{\gamma_1} Z_{\gamma_2} \dots Z_{\gamma_{N-1}} \\ &= Z_\gamma^{N-1} \end{aligned} \quad (2.3)$$

Da Eq. (2.3), podemos inferir que a probabilidade conjunta  $P(\gamma_1, \dots, \gamma_{N-1})$  pode ser decomposta em  $p(\gamma_1) \dots p(\gamma_{N-1})$ , levando a:

$$\begin{aligned}
 \langle \hat{t}_i \cdot \hat{t}_{i+s} \rangle &= \langle \cos(\gamma_{i,s}) \rangle \\
 &= \langle \text{Re} \left\{ \exp \left[ \hat{j} (\gamma_i + \gamma_{i+1} + \dots + \gamma_{i+s}) \right] \right\} \rangle \\
 &= \text{Re} \left\langle \prod_{k=1}^s e^{\hat{j}\gamma_{i+k}} \right\rangle \\
 &= \text{Re} \left\{ \prod_{k=1}^s \langle e^{\hat{j}\gamma_{i+k}} \rangle \right\} \\
 &= \text{Re} \left[ \langle \cos \gamma \rangle + \hat{j} \langle \text{sen} \gamma \rangle \right]^s
 \end{aligned} \tag{2.4}$$

Tendo em vista que o custo energético de  $\gamma = 0$  é mínimo, enquanto que o custo energético de  $\gamma = \pi$  é máximo, vemos que  $\langle \cos \gamma \rangle \neq 0$  (vide interpretação da Eq. (4.16)). Por outro lado, conformações com  $\gamma = \pm \sigma$  possuem a mesma energia e, portanto, a mesma probabilidade, resultando em  $\langle \text{sen} \gamma \rangle = 0$ .

Com isto,

$$\begin{aligned}
 \langle \hat{t}_i \cdot \hat{t}_{i+s} \rangle &= \langle \cos \gamma \rangle^s \\
 &= \exp \{ \ln \langle \cos \gamma \rangle^s \} \\
 &= \exp \{ -s \ln \langle \cos \gamma \rangle^{-1} \}
 \end{aligned} \tag{2.5}$$

Agora, basta-nos calcular  $\langle \cos \gamma \rangle$ :

$$\begin{aligned}
 \langle \cos \gamma \rangle &= \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \cos \gamma \frac{e^{\beta \kappa_0 \cos \gamma}}{Z_\gamma} \text{sen} \gamma d\gamma d\phi \\
 &= \frac{2\pi}{Z_\gamma} \int_0^\pi \cos \gamma \exp \{ \beta \kappa_0 \cos \gamma \} \text{sen} \gamma d\gamma
 \end{aligned} \tag{2.6}$$

Fazendo-se  $x = \beta \kappa_0 \cos \gamma$ , enquanto  $x(\gamma = 0) = \beta \kappa_0$  e  $x(\gamma = \pi) = -\beta \kappa_0$ , temos:

$$\begin{aligned}
 \langle \cos\gamma \rangle &= \frac{2\pi}{Z_\gamma} \int_{-\beta\kappa_0}^{-\beta\kappa_0} \frac{x}{\beta\kappa_0} e^x \left( \frac{-dx}{\beta\kappa_0} \right) \\
 &= \frac{2\pi}{\beta(\kappa_0)^2 Z_\gamma} \int_{-\beta\kappa_0}^{\beta\kappa_0} x e^x dx \\
 &= \frac{\partial}{\partial \beta\kappa_0} \ln Z_\gamma \\
 &= \frac{\partial}{\partial(\beta\kappa_0)} \ln \left[ \frac{4\pi}{\beta\kappa_0} \sinh(\beta\kappa_0) \right] \\
 &= \frac{\partial}{\partial(\beta\kappa_0)} \{ \ln 4\pi + \ln \sinh(\beta\kappa_0) - \ln(\beta\kappa_0) \} \\
 &= \frac{\cosh(\beta\kappa_0)}{\sinh(\beta\kappa_0)} - \frac{1}{\beta\kappa_0} \\
 &= \left\{ \cotgh(\beta\kappa_0) - \frac{1}{\beta\kappa_0} \right\} \tag{2.7}
 \end{aligned}$$

- Cálculo da função de correlação  $\langle \hat{t}_k \cdot \hat{t}_m \rangle$

Afim de calcularmos  $\langle \hat{t}_k \cdot \hat{t}_m \rangle$ , orientemos o eixo z de um sistema de coordenadas esféricas na direção de um vetor unitário  $\langle \hat{t}_l \rangle$  com  $k < l < m$ , de modo a termos:

$$\begin{aligned}
 \langle \hat{t}_k \cdot \hat{t}_m \rangle &= \langle \text{sen}\psi_{kl} \cos\phi_k \text{sen}\psi_{ml} \cos\phi_m \\
 &\quad + \text{sen}\psi_{kl} \text{sen}\phi_k \text{sen}\psi_{ml} \text{sen}\phi_m \\
 &\quad + \cos\psi_{kl} \cos\psi_{ml} \rangle
 \end{aligned}$$

Aqui,  $\psi_{kl}$  é o ângulo formado entre  $\hat{t}_k$  e  $\hat{t}_l$  e  $\phi_n$  é o ângulo formado entre  $\rho_k$  (a projeção de  $\hat{t}_k$  no plano  $xy$ ) e o eixo  $x$ .

Como  $\psi_{kl}$  e  $\psi_{ml}$  são estatisticamente independentes, visto que trata-se de uma cadeia ideal, bem como os ângulos  $\phi_k$  e  $\phi_m$ , temos:

$$\begin{aligned}
 \langle \hat{t}_k \cdot \hat{t}_m \rangle &= \langle \text{sen}\psi_{kl} \rangle \langle \cos\phi_k \rangle \langle \text{sen}\psi_{ml} \rangle \langle \cos\phi_m \rangle \\
 &\quad + \langle \text{sen}\psi_{kl} \rangle \langle \text{sen}\phi_k \rangle \langle \text{sen}\psi_{ml} \rangle \langle \text{sen}\phi_m \rangle \\
 &\quad + \langle \cos\psi_{kl} \rangle \langle \cos\psi_{ml} \rangle
 \end{aligned}$$

Agora, como os ângulos polares  $\phi$  são equiprováveis, temos  $\langle \text{sen}\phi \rangle = \langle \cos\phi \rangle = 0$ , resultando em  $\langle \hat{t}_k \cdot \hat{t}_m \rangle = \langle \cos\psi_{kl} \rangle \langle \cos\psi_{ml} \rangle$ . Contudo, podemos estabelecer  $l = k + 1$ , resultando em  $\langle \hat{t}_k \cdot \hat{t}_m \rangle = \langle \cos\psi \rangle \langle \cos\psi_{m,k+1} \rangle$ , onde  $\psi = \psi_{k,k+1}$  para qualquer  $k$ .

Agora, da definição do produto escalar, vemos que  $\langle \cos\psi_{m,k+1} \rangle$  é justamente a definição de  $\langle \hat{t}_k \cdot \hat{t}_m \rangle$ , de forma que podemos escrever:

$$\begin{aligned}
 \langle \hat{t}_k \cdot \hat{t}_m \rangle &= \langle \cos\psi \rangle \langle \hat{t}_{k+1} \cdot \hat{t}_m \rangle \\
 &= \langle \cos\psi \rangle^2 \langle \hat{t}_{k+2} \cdot \hat{t}_m \rangle \\
 &= \langle \cos\psi \rangle^j \langle \hat{t}_{k+j} \cdot \hat{t}_m \rangle \\
 &= \langle \cos\psi \rangle^{|m-k|}
 \end{aligned}$$

Utilizamos  $|m - k|$  para enfatizar que o importante é a distância absoluta entre os vetores unitários  $k$  e  $m$ . Com isto,

$$\begin{aligned}
 \langle \hat{t}_k \cdot \hat{t}_m \rangle &= \langle \cos\psi \rangle^{|m-k|} \\
 &= \exp \left\{ \ln \langle \cos\psi \rangle^{|m-k|} \right\} \\
 &= \exp \left\{ |m - k| (-1)^2 \ln(\langle \cos\psi \rangle) \right\} \\
 &= \exp \left\{ - |m - k| \ln(\langle \cos\psi \rangle^{-1}) \right\} \\
 &= \exp \left\{ -b \frac{|m - k|}{A} \right\}
 \end{aligned} \tag{2.8}$$

Onde  $A \equiv \frac{b}{|\ln(\cos\psi)|}$  é o comprimento de persistência [257].

## ANEXO A – Publicação

THE JOURNAL OF  
PHYSICAL  
CHEMISTRY **B**  
A JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY

pubs.acs.org/JPCB

Article

## New Insights into the Mechanism of Action of the Drug Chloroquine: Direct Interaction with DNA and Cytotoxicity

Ethe A. Costa, Amanda P. Gonçalves, Josiane A. D. Batista, Raniella F. Bazoni, Anésia A. Santos, and Márcio S. Rocha\*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.2c01119>

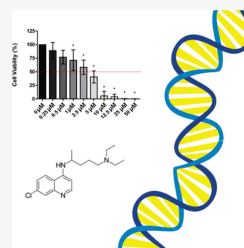
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

**ABSTRACT:** Chloroquine (CLQ) and hydroxychloroquine (HCLQ) are compounds largely employed in the treatment of various human diseases for decades. Nevertheless, a number of intrinsic details concerning their mechanisms of action, especially at the molecular level, are still unknown or have presented controversial results in the literature. Using optical tweezers, here, we investigate at the single-molecule level the molecular mechanism of action of the drug CLQ in its intrinsic interaction with the double-stranded (ds)DNA molecule, one of its targets inside cells, determining the binding modes and the physicochemical (binding) parameters of the interaction. In particular, we show that the ionic strength of the surrounding medium strongly influences such interaction, changing even the main binding mode. In addition, the cytotoxicity of CLQ against three different cell lines was also investigated here, allowing one to evaluate and compare the effect of the drug on the cell viability. In particular, we show that CLQ is highly cytotoxic at a very low (a few micromolar) concentration range for all cell lines tested. These results were rigorously compared to the equivalent ones obtained for the closely related compound hydroxychloroquine (HCLQ), allowing a critical comparison between the action of these drugs at the molecular and cellular levels.



### INTRODUCTION

Although scientists and the pharmaceutical industry have discovered and synthesized a number of efficient drugs to treat human and animal diseases over the past decades, important peculiarities concerning the molecular mechanisms of action of many of these drugs remain unknown, especially with respect to the intrinsic interactions of such compounds with cellular components like proteins and nucleic acids.

Chloroquine (CLQ) and hydroxychloroquine (HCLQ) are compounds largely used in malarial treatment. Besides that, they are also used to treat autoimmune diseases such as lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.<sup>1–3</sup> In early 2020, some studies proposed that these antimalarials agents could be an alternative in tackling the COVID-19 pandemics.<sup>3,4</sup> Nevertheless, their use for this purpose is no longer recommended by the World Health Organization (WHO) since they offer a high risk of adverse effects and, in addition, their antiviral effects have not been demonstrated in clinical trials.<sup>5</sup>

In fact, CLQ and its derivative HCLQ, which was synthesized with the purpose to reduce the cytotoxicity of the former,<sup>6</sup> present a wide range of side effects that can be explained by their action upon neural and cardiac cells, where low concentrations of these molecules cause the inhibition of important ionic channels.<sup>7–10</sup> In addition, previous studies have shown that both CLQ and HCLQ can directly interact

with DNA molecules, thus being potentially cytotoxic to many types of cells.<sup>11–19</sup>

Despite the studies cited above, many peculiarities of the DNA interaction with CLQ are still unknown. In particular, a single-molecule study for investigating such peculiarities is still lacking. This type of study is today recognized as the state of the art to characterize DNA interactions with ligands such as drugs or proteins, allowing one to determine the binding modes and the physicochemical (binding) parameters of these interactions.<sup>20–24</sup> Here, we fill this gap, presenting a single-molecule study, which unveils the main aspects of the DNA–CLQ interaction. The results achieved were compared to those obtained from a classic bulk technique, gel electrophoresis. Finally, the conclusions drawn were rigorously compared to an equivalent study recently performed with the similar compound HCLQ,<sup>18</sup> providing new insights into the intrinsic differences between the molecular mechanisms of action of the two drugs. In summary, both drugs interact strongly with

Received: February 15, 2022

Revised: April 26, 2022

Downloaded via UNIV FED DE VICOSA on May 18, 2022 at 22:14:35 (UTC). See <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> for options on how to legitimately share published articles.

ACS Publications

© XXXX American Chemical Society

A

<https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.2c01119>  
J. Phys. Chem. B XXXX, XXX, XXX–XXX