

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MILA KANASIRO MIYAHIRA

**AVALIAÇÃO IN SILICO DO POTENCIAL DE INTERCALAÇÃO EM DNA PARA
APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES POR MEIO DE DOCKING MOLECULAR**

UBERLÂNDIA - MG

2026

MILA KANASIRO MIYAHIRA

**AVALIAÇÃO IN SILICO DO POTENCIAL DE INTERCALAÇÃO EM DNA PARA
APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES POR MEIO DE DOCKING MOLECULAR**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

UBERLÂNDIA - MG

2026

MILA KANASIRO MIYAHIRA

**AVALIAÇÃO IN SILICO DO POTENCIAL DE INTERCALAÇÃO EM DNA
PARA APLICAÇÃO EM BIOCENSORES POR MEIO DE DOCKING
MOLECULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biotecnologia da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior - IBTEC

Presidente

José Augusto Leoncio Gomide - IBTEC

Membro

Kellen Cristina Silva Marques – IBTEC

Membro

“Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.”

Uberlândia, Minas Gerais, 22 de junho de 2026

RESUMO

A estrutura do DNA possui uma flexibilidade conformacional intrínseca que é fundamental para o entendimento de sua organização e funções biológicas. Entre as interações que evidenciam essa característica destaca-se a intercalação, um mecanismo não-covalente em que moléculas geralmente planas e aromáticas se inserem entre os pares de bases adjacentes da dupla hélice. Esse processo induz modificações estruturais significativas, como o desenrolamento e o alongamento da fita, podendo interferir em processos celulares vitais como a replicação e a transcrição. Dada a relevância biológica e toxicológica dessas interações, a avaliação do potencial intercalante é crucial tanto para a compreensão de mecanismos de ação quanto para a garantia da segurança farmacêutica e o desenvolvimento de biossensores. Nesse cenário, o uso de métodos *in silico*, como o docking molecular, permite modelar tridimensionalmente e quantificar a estabilidade dessas interações, auxiliando na predição da eficácia e da genotoxicidade de novos compostos de interesse biotecnológico.

A seleção de moléculas com capacidade de intercalação foi realizada por meio de uma triagem nos bancos de dados NuBBE e PubChem, adotando uma estrutura similar ao biossensor brometo de etídio como modelo de pesquisa. O estudo utilizou o programa Autodock Vina para ensaios de docking direcionado e blind docking contra o receptor de DNA (PDB 2ROU), validando a preferência energética pelos sítios de ligação identificados. Além disso, foram executadas análises de toxicidade para mutagenicidade Ames e sensibilização cutânea via plataforma pkCSM, além da visualização das interações intermoleculares em 2D. Os resultados permitiram ranquear 17 compostos com afinidades superiores à do controle brometo de etídio, com destaque para a molécula 14771754. Este composto apresentou energia de ligação favorável, modo de ligação consistente e ausência de mutagenicidade, diferenciando-se de outros candidatos que, embora mais afins, apresentaram potencial mutagênico.

Palavras-chave: Biossensores; *Docking* molecular; Intercalação de DNA; Mutagenicidade; Toxicidade *in silico*.

ABSTRACT

The DNA structure has an intrinsic conformational flexibility that is fundamental to understanding its organization and biological functions. Among the interactions highlighting this characteristic, intercalation stands out as a non-covalent mechanism where generally planar and aromatic molecules insert themselves between adjacent base pairs of the double helix. This process induces significant structural modifications, such as unwinding and elongation of the strand, which may interfere with vital cellular processes like replication and transcription. Given the biological and toxicological relevance of these interactions, evaluating the intercalating potential is crucial for understanding mechanisms of action, ensuring pharmaceutical safety, and developing biosensors. In this scenario, the use of *in silico* methods, such as molecular docking, allows for the three-dimensional modeling and quantification of the stability of these interactions, aiding in the prediction of the efficacy and genotoxicity of new compounds of biotechnological interest.

The selection of molecules with intercalation capacity was performed through a screening of the NuBBE and PubChem databases, using a structure similar to the ethidium bromide biosensor as a research model. The study employed the Autodock Vina software for directed docking and blind docking against the DNA receptor (PDB 2ROU), validating the energetic preference for the identified binding sites. Furthermore, toxicity analyses for Ames mutagenicity and skin sensitization were conducted via the pkCSM platform, in addition to the visualization of 2D intermolecular interactions. The results allowed for the ranking of 17 compounds with affinities superior to the ethidium bromide control, with molecule 14771754 being a highlight. This compound exhibited favorable binding energy, a consistent binding mode, and an absence of mutagenicity, distinguishing itself from other candidates that, despite higher affinity, showed mutagenic potential.

Keywords: Molecular docking; DNA intercalation; Biosensors; *In silico* toxicity; Mutagenicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo geral	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1. Programas	9
3.2. Obtenção e preparo de banco de dados	9
3.3. Obtenção e preparo do receptor	10
3.4. Docking molecular	10
3.5. Toxicidade	11
3.6. Interações 2D	11
3.7. Blind docking	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4.1. Obtenção e preparação dos bancos de dados	11
4.2. <i>Blind Docking</i>	11
4.3. <i>Docking</i>	15
4.4. Toxicidade	16
4.5. Interações 2D	23
5. CONCLUSÃO	28

1. INTRODUÇÃO

A estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA) tem sido intensamente estudada, e há um crescente reconhecimento da existência de flexibilidade conformacional na dupla hélice do DNA, o que é fundamental para a compreensão de sua estrutura e função (Hendry *et al.*, 2007). Uma interação fundamental que evidencia essa flexibilidade e suas implicações biológicas é a interação não-covalente entre o DNA e pequenas moléculas orgânicas (Strekowski; Wilson, 2007).

Entre os modos de interação não-covalente, a intercalação é um mecanismo central. A intercalação envolve a inserção de moléculas (geralmente planas, aromáticas e com carga positiva entre pares de bases adjacentes) (Ferguson; Denny, 2007; Streckowski; Wilson, 2007). Esse processo induz alterações estruturais localizadas no DNA, como o desenrolamento e alongamento da hélice (Strekowski; Wilson, 2007), essenciais para a organização da cromatina (Ferguson; Denny, 2007).

A intercalação molecular representa um modo fundamental de interação não-covalente entre pequenas moléculas orgânicas e o DNA de dupla fita (Hendry *et al.*, 2007). Este mecanismo ocorre quando um ligante, que tipicamente possui uma estrutura planar ou semi-planar, se insere reversivelmente no espaço existente entre pares de bases adjacentes da hélice (Ferguson; Denny, 2007). O ato de intercalação induz modificações estruturais localizadas no DNA, notadamente o desenrolamento da dupla hélice e o alongamento da fita (Strekowski; Wilson, 2007). Embora a visão original definisse os intercalantes clássicos como estruturas aromáticas planas e fusionadas (Snyder, 2007), há evidências de que uma ampla gama de moléculas atípicas ou de anéis não-fundidos, incluindo aquelas com maior espessura molecular, são capazes de realizar a intercalação (Hendry *et al.*, 2007). Essas interações são estabilizadas por uma combinação de forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e, no caso de ligantes catiônicos, por interações eletrostáticas (Strekowski; Wilson, 2007). A relevância biológica e toxicológica da intercalação reside no fato de que ela pode perturbar processos vitais como a replicação e transcrição (Ferguson; Denny, 2007). A avaliação do potencial intercalante apresenta relevância não apenas para a compreensão do mecanismo de ação dessas moléculas, mas também para garantir a segurança farmacêutica (Snyder, 2007).

A intercalação de DNA é um processo fundamental utilizado no desenvolvimento de biossensores para detectar compostos aromáticos (Pandey; Weetall, 1995). Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, 1992), biossensores são dispositivos

analíticos que utilizam componentes biológicos (como enzimas, anticorpos ou DNA) para detectar substâncias químicas ou biomarcadores em amostras diversas. Eles convertem a interação biológica em um sinal mensurável (elétrico, óptico ou térmico), permitindo diagnósticos rápidos e precisos, muito comuns em testes de gravidez e medidores de glicose. Além disso, o desenvolvimento de modelos computacionais tem se destacado como uma abordagem promissora para a predição da atividade biológica e da potencial genotoxicidade dessas substâncias (Hendry et al., 2007).

O *docking* molecular estabeleceu-se como uma técnica fundamental na análise computacional tridimensional (*in silico*) para modelar e quantificar a interação de pequenas moléculas (ligantes) com macromoléculas biológicas, como a dupla hélice do DNA (Hendry et al., 2007). Este método é vital para medir a capacidade de intercalação de um composto. O *docking* calcula a qualidade do "encaixe" (fit) e a estabilidade da interação ligante-receptor (Snyder, 2007). Essa estabilidade é quantificada em unidades de energia (frequentemente kcal/mol) e deriva das forças de van der Waals e interações eletrostáticas, além das ligações de hidrogênio (Hendry et al., 2007; Strekowski; Wilson, 2007). A modelagem computacional refinada, permite avaliar a complementaridade estereoquímica entre o ligante e o sítio de intercalação, demonstrando que o grau de ajuste se correlaciona com o grau de atividade biológica e pode ser utilizado para prever tanto a eficácia quanto a genotoxicidade de um composto (Hendry et al., 2007).

A importância desse método cresceu com a descoberta de que muitas moléculas que não possuem estruturas classicamente reativas causam genotoxicidade por meio de interações não-covalentes, como a intercalação ou a ligação em sulcos (groove-binding) (Ferguson; Denny, 2007). Nesse contexto, o docking mostrou ter alta concordância com ensaios biológicos *in vitro* na previsão de moléculas com potencial intercalante de DNA (Snyder, 2007).

A busca por novas moléculas intercalantes é fundamental por esses compostos constituírem o componente ativo dos biossensores de DNA (Nelson; Ferguson; Denny, 2007). Esses dispositivos funcionam como detectores de alta precisão para identificar poluentes e toxinas aromáticas no meio ambiente, além de serem ferramentas valiosas para monitorar possíveis danos ao material genético (Strekowski; Wilson, 2007). Atualmente, o maior desafio para essa tecnologia é que as substâncias padrão utilizadas, como o brometo de etídio, possuem toxicidade elevada e potencial carcinogênico comprovado por meio de resultados positivos no teste de Ames (Snyder, 2007). Essa característica gera riscos significativos tanto para o meio ambiente quanto para a saúde ocupacional dos pesquisadores. Portanto, este trabalho justifica-se pela necessidade de utilizar métodos computacionais avançados para filtrar, entre milhares

de opções, moléculas que se "encaixem" na dupla hélice com uma afinidade superior à dos padrões atuais, mas que apresentem um perfil de segurança biológica muito mais rigoroso para o uso humano (Hendry *et al.*, 2007; Snyder, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é realizar a seleção de moléculas com capacidade intercalante de DNA para posterior aplicação em biossensores através de métodos *in silico*.

2.2. Objetivos específicos

- Obter e preparar moléculas do banco de dados
- Obter e preparar receptor
- Realizar o *docking* molecular
- Realizar o *blind docking* para validação do sítio de ligação
- Avaliar as interações intermoleculares entre receptor e ligantes
- Realizar análise de toxicidade

3. MATERIAIS E MÉTODOS

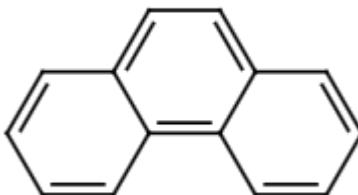
3.1. Programas

Foram utilizados os programas Autodock Tools 1.5.7. La Jolla, CA, EUA; Autodock Vina 1.1.2. La Jolla, CA, EUA; Open Babel 3.1.1.; VIDA 5.0.6.0. OpenEye. Santa Fe, NM, EUA. BIOVIA Discovery Studios 2024.

3.2. Obtenção e preparo de banco de dados

Foram utilizados os bancos de dados NuBBE (Núcleo de Bioensaios Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais) (NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, 2017; Pilon *et al.*, 2017), e PubChem (PubChem, 2025). Como base para a pesquisa de compostos nos bancos de dados foi utilizado como modelo uma molécula cuja estrutura se assemelha ao brometo de etídio, indicador amplamente utilizado em biossensores. A Figura 1 abaixo representa a molécula de estrutura SMILES C12=CC=C3C(=C1C=CC=C2)C=CC=C3.

Figura 1 - Estrutura base para pesquisa nos bancos de dados



Fonte: Do autor

Foram baixados 1 conformero de cada composto e preparados conforme protocolo para realização de *docking* com a utilização do programa OpenBabel 3.1.1. (<http://openbabel.org>, [S. d.]; O'Boyle *et al.*, 2011). A preparação dos dados consistiu em minimizar a energia no campo de força MMFF94 e converter os compostos para pdbqt com o programa Autodock Tools.

3.3. Obtenção e preparo do receptor

O receptor utilizado neste estudo foi a estrutura cristalográfica identificada pelo código 2ROU, obtida no formato .pdb por meio do banco de dados Protein Data Bank (PDB). Essa estrutura corresponde a um complexo formado por um duplex de DNA (5'-ATCGCGCGGCATG-3'/5'-CATGCCGCGCGAT-3') associado ao agente intercalante 1R-trans-anti-Benzo[c]fenantreno, o qual se encontra posicionado na fenda menor do DNA. Sua preparação foi realizada no Autodock Tools, em que foi realizada a retirada do ligante, a deleção de H₂O, adição de hidrogênios e a adição de cargas parciais através da abordagem de Kollman. Foi então realizada a conversão do formato pdb para pdbqt para a futura realização de docking.

3.4. Docking molecular

Com todos os compostos em formato pdbqt, foi utilizado o Autodock Vina, com as configurações do Gridbox de dimensão: eixos x= 64 Å ; y= 60 Å ; z= 24 Å ; e centróide: eixos x= -0,832 Å; y= -0,448 Å; z=17,954 Å. Tais valores foram obtidos a partir de um complexo de DNA poli GC e um agente intercalante (1R-trans-anti-Benzo[c]fenantreno) localizado no *minor-groove* do receptor (Bank, 2009; Wang *et al.*, 2008). Além disso, o valor selecionado para *exhaustiveness* (intensidade da busca do espaço conformacional) foi de 8. Este experimento foi realizado em triplicata.

Após o docking ser finalizado, foram analisados os valores de menor energia (kcal/mol) para cada ligante no estudo de interação desses com o receptor. Foram realizados a média e o desvio padrão dos resultados das 3 replicatas e posteriormente foram selecionados os 17 melhores resultados para análises posteriores.

3.5. Toxicidade

A partir dos 17 melhores resultados obtidos anteriormente, foi realizada uma análise de toxicidade para sensibilização da pele e para mutagenicidade Ames, que pode indicar um potencial carcinogênico (Li, H.-H.; Aubrecht; Fornace, 2007).

3.6. Interações 2D

Utilizando as mesmas moléculas, foram observadas pelo programa BIOVIA Discovery Studios 2024, as interações intermoleculares entre o receptor e cada ligante de modo a obter o modelo 2D desses complexos.

3.7. Blind docking

Para o blind docking foram utilizados os mesmos métodos, porém com outras configurações para o gridbox, sendo de dimensão: nos eixos $x = 54 \text{ \AA}$; $y = 56 \text{ \AA}$; $z = 124 \text{ \AA}$; e centróide: nos eixos $x = 0 \text{ \AA}$; $y = 0 \text{ \AA}$; $z = 19,997 \text{ \AA}$. Porém, mantendo o mesmo valor para exhaustiveness. Através do blind docking, foi analisada a preferência das moléculas pelo sítio ativo estabelecido no docking anterior. A média e o desvio padrão foram realizados para 3 replicatas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção e preparação dos bancos de dados

A partir da pesquisa no banco de dados NuBBE foi obtido um composto com estrutura similar à apresentada na figura 1, enquanto do PubChem foram obtidos 28682 compostos. O preparo das moléculas obtidas pelos bancos de dados foi bem-sucedido para análises posteriores.

4.2. Blind docking

Foi realizado um *blind docking* com configuração de gridbox abrangendo toda a estrutura do DNA, com o intuito de avaliar se as moléculas analisadas apresentariam maior afinidade por outros sítios de ligação ou se manteriam a preferência pela *minor groove*

previamente identificada. O processo foi conduzido utilizando os 17 melhores resultados obtidos na etapa anterior. Os resultados do blind docking estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados do blind docking

Posição do ranking	Banco de dados	Código do composto	Afinidade (kcal/mol)	Desvio padrão
1°	PubChem	129804265	-9,17	0,058
2°	PubChem	123121	-8,87	0,058
3°	PubChem	132277301	-8,70	0,000
4°	PubChem	11784123	-8,60	0,000
5°	PubChem	101166693	-8,60	0,000
6°	PubChem	101166690	-8,60	0,000
7°	PubChem	14771754	-8,60	0,000
8°	PubChem	137094	-8,53	0,058
9°	PubChem	15732598	-8,50	0,000
10°	PubChem	155929954	-8,50	0,173
11°	PubChem	129804329	-8,40	0,000
12°	PubChem	12571900	-8,37	0,058
13°	NuBBE	2419	-8,30	0,000
14°	PubChem	12645968	-8,30	0,000
15°	PubChem	13868600	-8,27	0,115
16°	PubChem	139205883	-8,20	0,173
17°	PubChem	129781437	-8,20	0,265
18°	PubChem	14710	-6,80	0,000

Fonte: Do autor.

Na Tabela acima, observa-se que a primeira coluna representa a posição dos compostos no ranking. A segunda coluna corresponde ao banco de dados de origem, enquanto a terceira apresenta o código de identificação de cada composto em seu respectivo banco. A quarta coluna exibe os valores médios de afinidade (kcal/mol), calculados a partir de triplicatas e organizados em ordem crescente. Por fim, a última coluna traz os valores do desvio padrão associados a cada composto.

Das nove posições geradas pelo *blind docking* para cada ligante em interação com o receptor, observou-se que as poses de menor energia estimada localizaram-se, em maioria, no

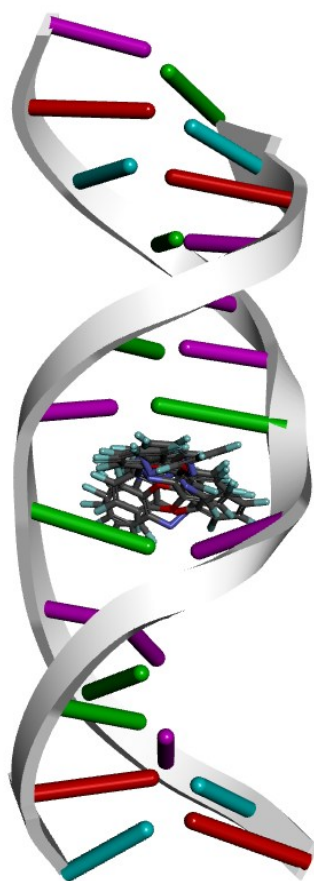
sítio previamente utilizado no *docking* molecular direcionado. Esse padrão sugere uma preferência energética por essa região, reforçando a consistência entre as abordagens de *docking*. Embora alguns ligantes tenham apresentado posições fora dessa região, a maioria se localizou dentro dele. Dessa forma, pode-se inferir que os ligantes demonstraram preferência a região utilizada no *docking* direcionado.

O *blind docking* apresentou pequenas variações nos valores de energia estimada e na orientação espacial das poses em relação ao docking molecular direcionado, embora tais alterações não tenham sido significativas. Nessa etapa, o brometo de etídio foi utilizado como agente intercalante padrão, servindo como referência. Assim como os demais ligantes, as poses de menor energia para esse composto localizaram-se predominantemente na região correspondente ao sítio de ligação utilizado no docking direcionado, sugerindo que essa área representa uma zona energeticamente favorável dentro do espaço amostral explorado pelo modelo computacional, ainda que seja necessário considerar aspectos mais dinâmicos do sistema real para uma compreensão mais abrangente (Owoloye et al., 2022).

As imagens abaixo foram obtidas a partir do AutoDock e representam as diferentes poses previstas para cada ligante pelo blind docking, coincidindo à região delimitada pela grid box no docking direcionado. As estruturas em formato de “sticks” correspondem às melhores conformações ranqueadas por energia de ligação, refletindo as possíveis orientações do mesmo composto no sítio intercalante do DNA.

A análise da distribuição espacial dessas poses permite avaliar o grau de convergência do docking. Observou-se que a molécula 14771754 apresentou elevada concentração das poses em uma mesma região da dupla hélice (Figura 2), sugerindo modo de ligação consistente e energeticamente favorecido. Esse padrão indica bom ajuste estérico e estabilidade do complexo DNA–ligante.

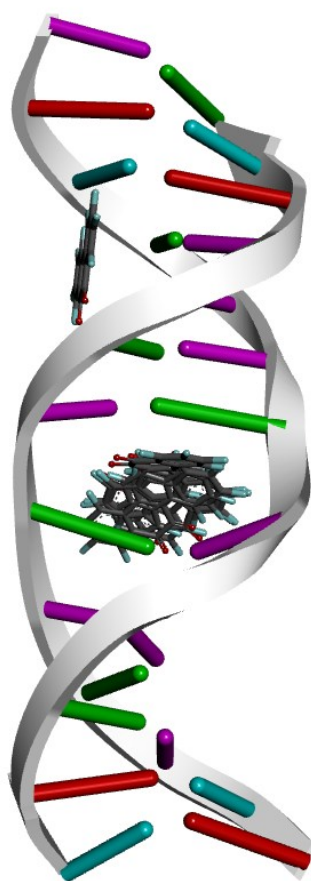
Figura 2 - Representação das posições mais bem ranqueadas da molécula 14771754 no blind docking.



Fonte: Do autor.

Para o composto 129804265 (Figura 3), verificou-se predominância de poses concentradas em um mesmo sítio, embora uma orientação alternativa tenha sido observada fora do cluster principal, o que pode indicar maior flexibilidade conformacional ou possibilidade de interação secundária.

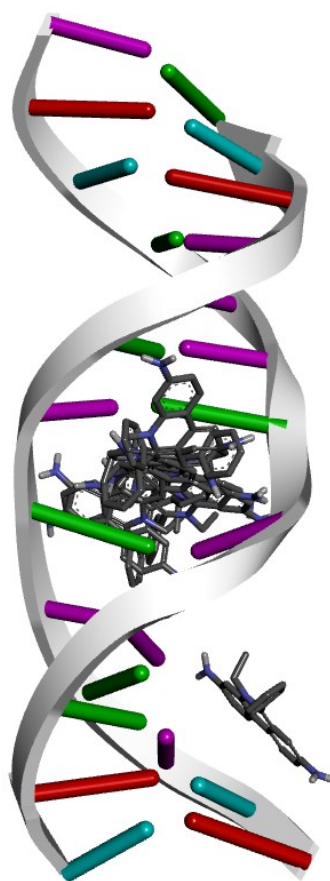
Figura 3 - Representação das posições mais bem ranqueadas da molécula 129804265 no *blind docking*.



Fonte: Do autor.

No caso do Brometo de etídio (Figura 4), as poses também se concentraram na região intercalante, porém com maior variação posicional ao longo da dupla hélice, comportamento compatível com a natureza clássica desse intercalador, que pode se acomodar entre diferentes pares de bases.

Figura 4 - Representação das posições mais bem ranqueadas do brometo de etídio no *blind docking*.

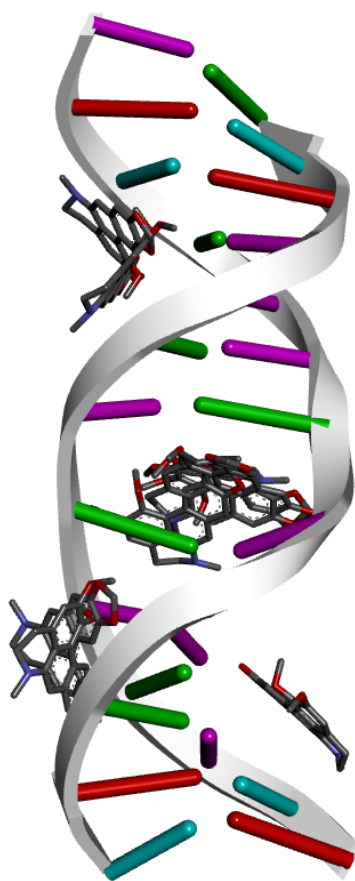


Fonte: Do autor.

Por fim, o último composto analisado apresentou maior dispersão das poses ao longo da estrutura do DNA (Figura 5), sugerindo ausência de um sítio preferencial bem definido e possível menor estabilidade do complexo formado.

Dessa forma, o padrão de convergência observado nas imagens complementa os valores energéticos obtidos, fornecendo evidências estruturais adicionais sobre a estabilidade e a especificidade do modo de ligação de cada ligante ao DNA.

Figura 5 - Representação das posições mais bem ranqueadas da molécula Nubbe, 2419 no *blind docking*.



Fonte: Do autor.

Considerando conjuntamente os resultados de docking, análise de interações e toxicidade, o composto 14771754 mostrou-se o mais promissor para aplicação como biossensor. O fator determinante para classificar esta molécula como a melhor escolha reside no seu perfil de toxicidade: ao contrário dos ligantes que ocupam o topo absoluto do ranking (como o 129804265), que apresentaram potencial mutagênico, a molécula 14771754 é negativa no teste de Ames. Isso representa um avanço estratégico fundamental, pois permite o desenvolvimento de tecnologias biotecnológicas que eliminam o risco carcinogênico associado ao manuseio de intercalantes clássicos.

4.3. Docking

O receptor original, identificado pelo código PDB 2ROU, foi utilizado como modelo neste estudo por apresentar o 1R-trans-anti-Benzo[c]fenantreno, agente intercalante, localizado na *minor groove* do DNA, mesmo sítio de ligação do biossensor brometo de etídio. Após a

remoção desse ligante, o sítio de ligação correspondente foi selecionado para a realização do *docking* direcionado.

O *docking* molecular resultou em 9 posições de interação entre cada ligante e o receptor. Para os passos seguintes da análise, foi selecionada a posição das moléculas estudadas com resultado de menor energia. Os valores de afinidade apresentados em kcal/mol correspondem à energia de ligação estimada pelo *docking* molecular. Foi possível observar que todas as moléculas apresentaram valor de Afinidade (kcal/mol) negativa na interação com o receptor. No processo, todas elas apresentaram RMSD (desvio da média quadrática) igual a 0. Foram realizados a média e o desvio padrão dos dados de afinidade obtidos em triplicata. A partir disso, os compostos foram ranqueados de acordo com os valores de Afinidade (kcal/mol) em ordem crescente, sendo considerados mais favoráveis aqueles com menores valores. A Tabela 2 abaixo representa o ranking dos resultados do *docking* molecular direcionado.

Tabela 2: Resultados do docking molecular direcionado

Posição do ranking	Banco de dados	Código do composto	Afinidade (kcal/mol)	Desvio padrão
1°	PubChem	129804265	-9,20	0,000
2°	PubChem	123121	-8,80	0,000
3°	PubChem	132277301	-8,70	0,000
4°	PubChem	13868600	-8,67	0,058
5°	PubChem	11784123	-8,60	0,000
6°	PubChem	101166693	-8,60	0,000
7°	PubChem	101166690	-8,60	0,000
8°	PubChem	14771754	-8,60	0,000
9°	PubChem	155929954	-8,57	0,058
10°	PubChem	137094	-8,53	0,058
11°	PubChem	15732598	-8,50	0,000
12°	PubChem	12571900	-8,40	0,000
13°	PubChem	129804329	-8,40	0,000
14°	PubChem	12645968	-8,40	0,000
15°	PubChem	129781437	-8,40	0,000
16°	NuBBE	2419	-8,30	0,000
17°	PubChem	139205883	-8,30	0,000
3631°	PubChem	14710	-6,80	0,000

Fonte: Do autor.

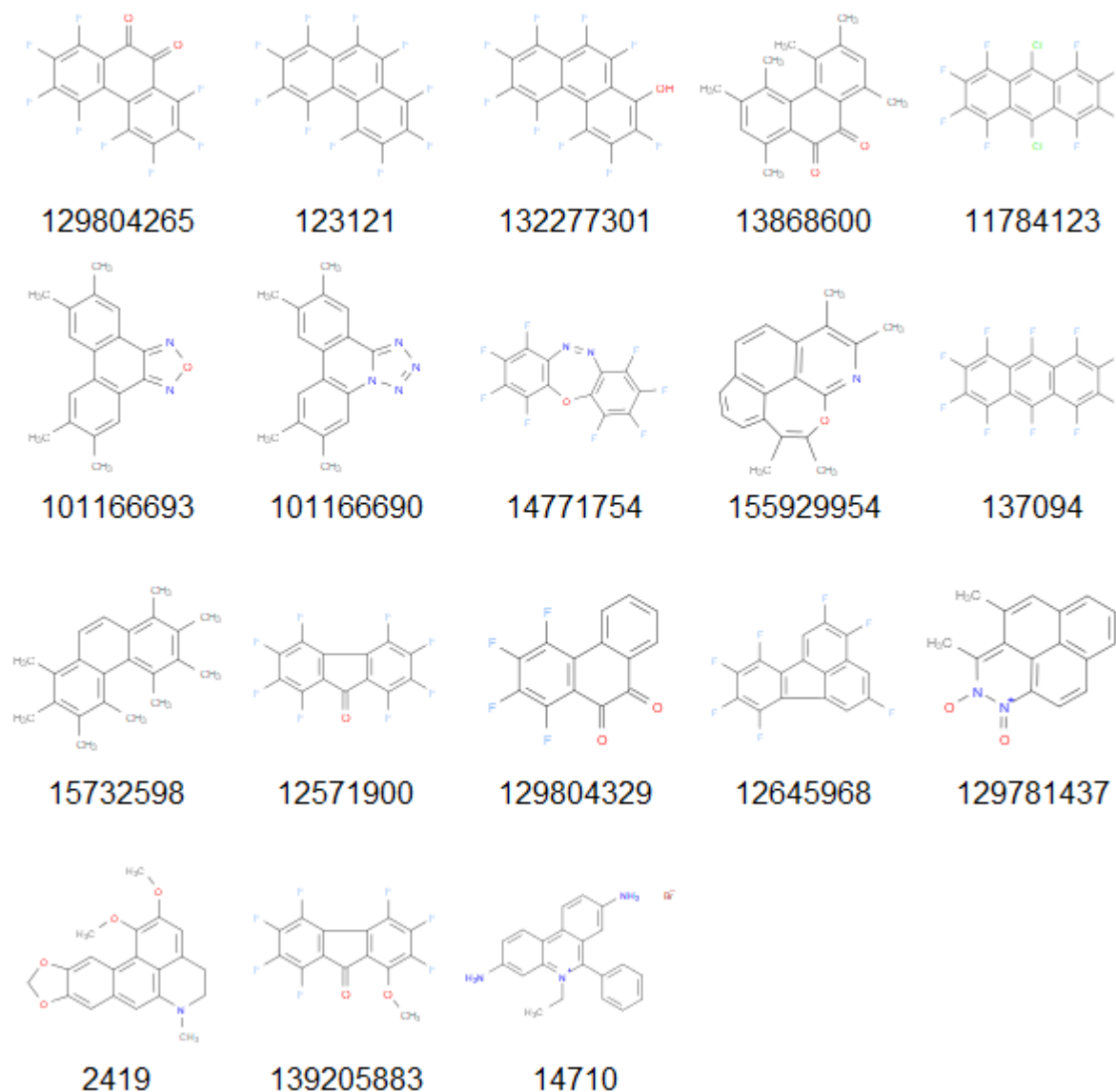
Na tabela acima é possível observar a posição do ranking dos compostos na primeira coluna, seguido do banco de dados de origem na segunda coluna, enquanto a terceira coluna indica o código do composto em seu respectivo banco de dados. Já na quarta coluna os valores da média das triplicatas de Afinidade (kcal/mol) estão dispostos do menor para o maior valor à medida que na última coluna está constatado os valores do desvio padrão do composto.

Foram selecionados os compostos com energia de ligação menor ou igual a -8,3 kcal/mol, indicando maior afinidade estimada pelo DNA, o que resultou em 17 ligantes obtidos pelos bancos de dados. Além disso, o brometo de etídio foi empregado como intercalante controle e submetido ao mesmo processo de *docking* que as demais moléculas, sob condições experimentais idênticas. O agente intercalante está representado na tabela com o código 14710 (PubChem) tendo obtido a posição 3631° no ranking de docagem e valor de Afinidade -6,80

kcal/mol. Esse resultado sugere um potencial de interação relevante das moléculas avaliadas com o sítio alvo do docking.

As estruturas das moléculas presentes na Tabela 2 estão representadas na Figura 6 abaixo.

Figura 6 - Estrutura das moléculas presentes no ranking do *docking* molecular.



Fonte: Do autor

As moléculas em questão exibem um perfil predominantemente aromático, caracterizados por sistemas policíclicos condensados ou com alta conjugação, o que lhes confere uma forma bastante rígida. Essas características são frequentemente associadas a compostos intercalantes (Mukherjee; Sasikala, 2013)

4.4. Toxicidade

A análise de toxicidade foi realizada pela plataforma pkCSM (Pires; Blundell; Ascher, 2015) que avalia o potencial mutagênico (Ames) e a sensibilização da pele dos compostos. Todos os compostos foram negativos para possível associação com sensibilização da pele, enquanto apenas três foram negativos para Ames, são esses: 14771754, 12571900 e 13868600. Sendo que o primeiro composto mencionado foi considerado para análises futuras por ser o melhor colocado no ranking. Nota-se que o brometo de etídio (14710) foi positivo para potencial mutagênico (Ames) confirmando o seu alto potencial mutagênico conhecido na literatura (Keadtidumrongkul; Chirarat; Somran, 2018; O’Neil; Beach; Gruber, 2018).

Apesar da molécula 129804265 ocupar a primeira posição no ranking do docking direcionado (Tabela 2), o resultado de potencial mutagênico do teste de Ames sugere a necessidade de cautela quanto à sua biossegurança, semelhante ao brometo de etídio. Intercalantes clássicos como proflavina, brometo de etídio e doxorrubicina ilustram como alguns compostos intercalantes com o DNA podem estar associados a efeitos citotóxicos ou mutagênicos, reforçando a importância de avaliações toxicológicas complementares (Das; Banik, 2023; Gatasheh *et al.*, 2017).

Tabela 3: Resultados da predição de toxicidade e sensibilização da pele.

Banco de dados	Código do composto	Ames	Sensibilização da pele
PubChem	129804265	Sim	Não
PubChem	123121	Sim	Não
PubChem	132277301	Sim	Não
PubChem	11784123	Sim	Não
PubChem	101166693	Sim	Não
PubChem	101166690	Sim	Não
PubChem	14771754	Não	Não
PubChem	137094	Sim	Não
PubChem	15732598	Sim	Não
PubChem	155929954	Sim	Não
PubChem	129804329	Sim	Não
PubChem	12571900	Não	Não

NuBBE	2419	Sim	Não
PubChem	12645968	Sim	Não
PubChem	13868600	Não	Não
PubChem	139205883	Sim	Não
PubChem	129781437	Sim	Não
PubChem	14710	Sim	Não

Fonte: Do autor.

4.5. Interações 2D

As interações intermoleculares entre o receptor e cada ligante foram visualizadas por meio de representações gráficas geradas no programa BIOVIA Discovery Studio. Esse processo foi realizado para todas as 17 moléculas selecionadas previamente, mas a seguir são apresentados apenas os principais resultados. São eles o melhor ranking de ambos *docking* direcionado e *blind docking* (129804265), o melhor ranking do *blind docking* negativo para os testes de toxicidade (14771754), a única proveniente do banco de dados brasileiro (NuBBE 2419) e o intercalante controle (brometo de etídio).

A primeira imagem (Figura 7) corresponde ao ligante mais bem posicionado no ranking do blind docking, o qual apresenta interações do tipo π - π , ligações de halogênio e interações de Van der Waals com o receptor. O processo de intercalação normalmente envolve interações de Van der Waals, que regulam a ligação entre átomos intercalados e o material em camadas (Petrović et al., 2013). Esse tipo de interação fraca desempenha um papel significativo na estabilização da estrutura intercalada. As forças do tipo Van der Waals, juntamente com as interações dipolo-dipolo, desempenham um papel crucial na ligação entre as camadas de materiais intercalados (Keadtidumrongkul; Chirarat; Somran, 2018).

A molécula representada como 129804265 é aromática plana, cujos anéis conjugados favorecem interações de empilhamento do tipo π - π .

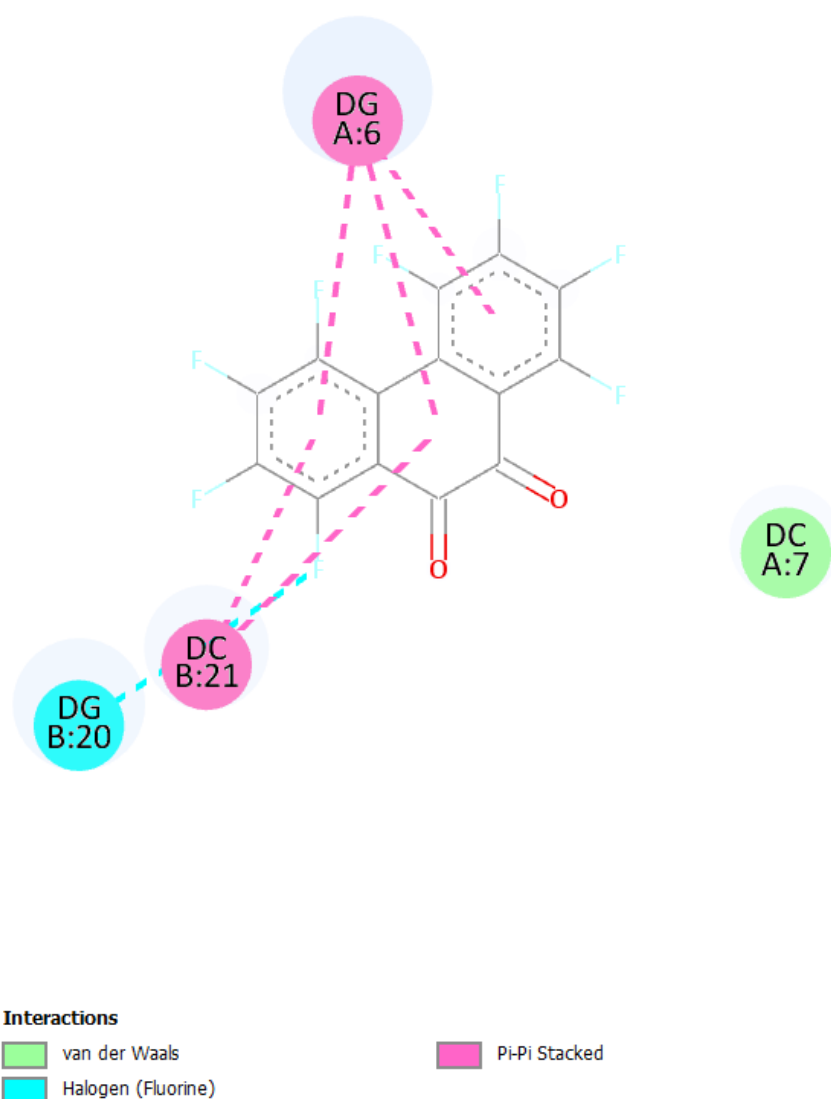
De acordo com informações disponibilizadas no PubChem, a nomenclatura segundo a IUPAC é dada por 1,2,3,4,5,6,7,8-Octafluorophenanthrene-9,10-quinone. Não possui ligações rotacionáveis, indicando uma estrutura rígida, apresenta perfil hidrofóbico e o valor Complexity = 511 indica maior densidade eletrônica (CID 129804265). Essas propriedades facilitam a inserção estável da molécula na hélice do DNA (Mukherjee; Sasikala, 2013).

Compostos quinona são frequentemente relacionados a efeitos citotóxicos e carcinogênicos, devido à sua natureza reativa e potencial de aceitação de elétrons,

desencadeando o ciclo redox (Li, P. *et al.*, 2013). Tal informação é coerente com o resultado do teste de toxicidade de Ames, indicando baixa segurança.

Interessante observar que mesmo sem estruturas classicamente reativas, o composto não passou no teste Ames. Isso sugere que o potencial mutagênico pode não estar relacionado à reatividade covalente direta, podendo considerar possíveis mecanismos alternativos, incluindo interações não covalentes com o DNA.

Figura 7: Interação Intermolecular da molécula 129804265.



Fonte: Do autor

A figura 8 abaixo apresenta as interações intermoleculares da molécula 14771754, sendo esta a molécula negativa para Ames melhor colocada no ranking de docking molecular. As interações observadas incluem ligações de hidrogênio, interações do tipo π - π e ligações de

halogênio com o receptor. Como anteriormente, as ligações de hidrogênio e interações tipo π - π são típicas do processo de intercalação.

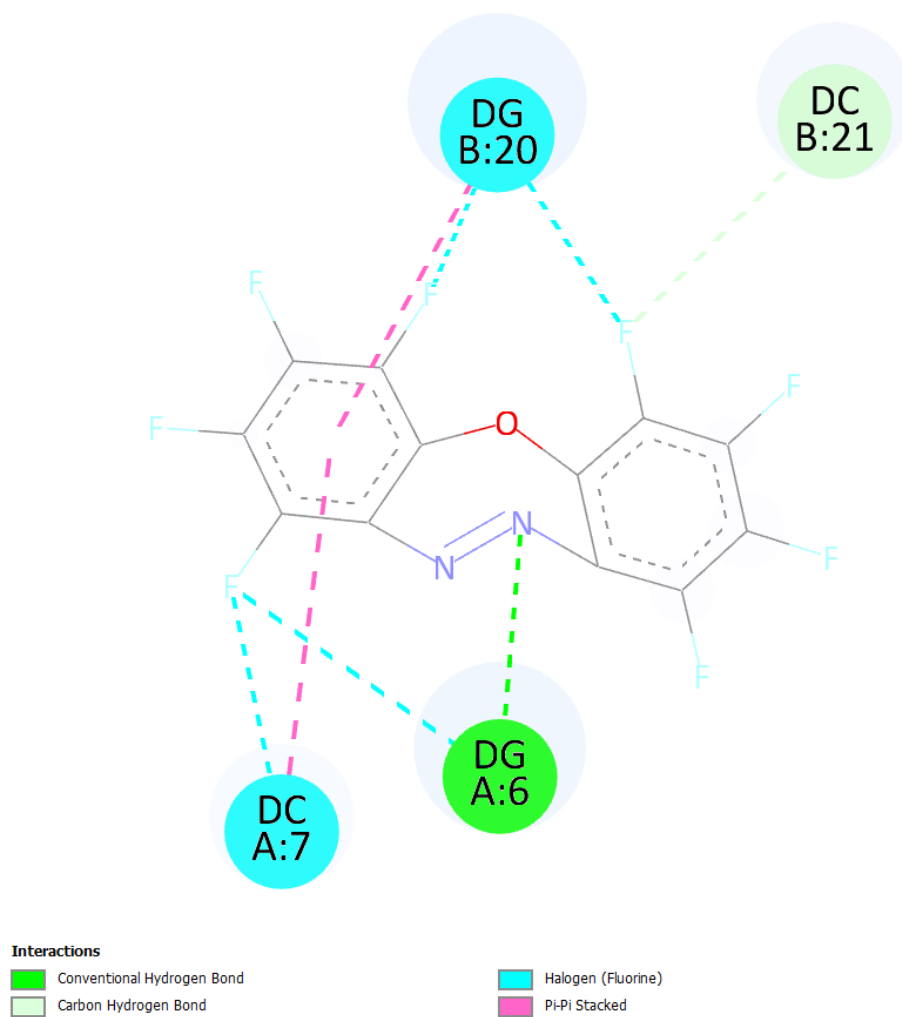
De acordo com informações disponíveis no PubChem, a nomenclatura IUPAC é dada por 1,2,3,4,7,8,9,10-Octafluorobenzo[c][5,1,2]benzoxadiazepine (CID 14771754). Não são observadas ligações rotacionáveis, o que indica rigidez estrutural, característica favorável ao empilhamento aromático e à intercalação entre pares de bases. Molécula policíclica aromática plana. Moderadamente hidrofóbica, compatível com o ambiente hidrofóbico do interior da dupla-hélice. Tem carga formal igual a 0, indicando neutralidade, o que é menos esperado já que intercaladores clássicos são frequentemente catiônicos (Mukherjee; Sasikala, 2013).

Ao comparar com o composto anterior, observam-se elementos similares em suas estruturas e interações semelhantes com o receptor. Além de aromáticas e planares, as moléculas 129804265 e 14771754 são altamente fluoradas. Ainda assim apresentam perfil mutagênico distinto, uma vez que apenas esta última teve resultado negativo no teste Ames.

O composto 129804265 apresentou a maior afinidade estimada no docking molecular, indicando uma interação energeticamente mais favorável com o sítio alvo. Embora o docking não permita inferir diretamente efeitos biológicos, interações com alta afinidade pelo DNA podem, em alguns contextos, estar associadas à interferência de processos celulares como replicação e transcrição, o que reforça a necessidade de investigação experimental adicional. Por outro lado, embora a molécula 14771754 tenha apresentado afinidade estimada relevante no *docking*, sua ausência de mutagenicidade no teste de Ames a torna particularmente interessante do ponto de vista de segurança biológica. Assim, considerando simultaneamente o potencial de interação com o DNA e o perfil toxicológico mais favorável, a 14771754 destaca-se como a candidata mais promissora para evolução em aplicações como biossensor.

A literatura reporta a busca por alternativas que mantenham eficiência semelhante à do Brometo de etídio, amplamente utilizado como marcador de ácidos nucleicos, porém com menor risco toxicológico. Nesse contexto, a molécula 14771754 pode representar um ponto de partida relevante para o desenvolvimento de sistemas biossensores mais seguros.

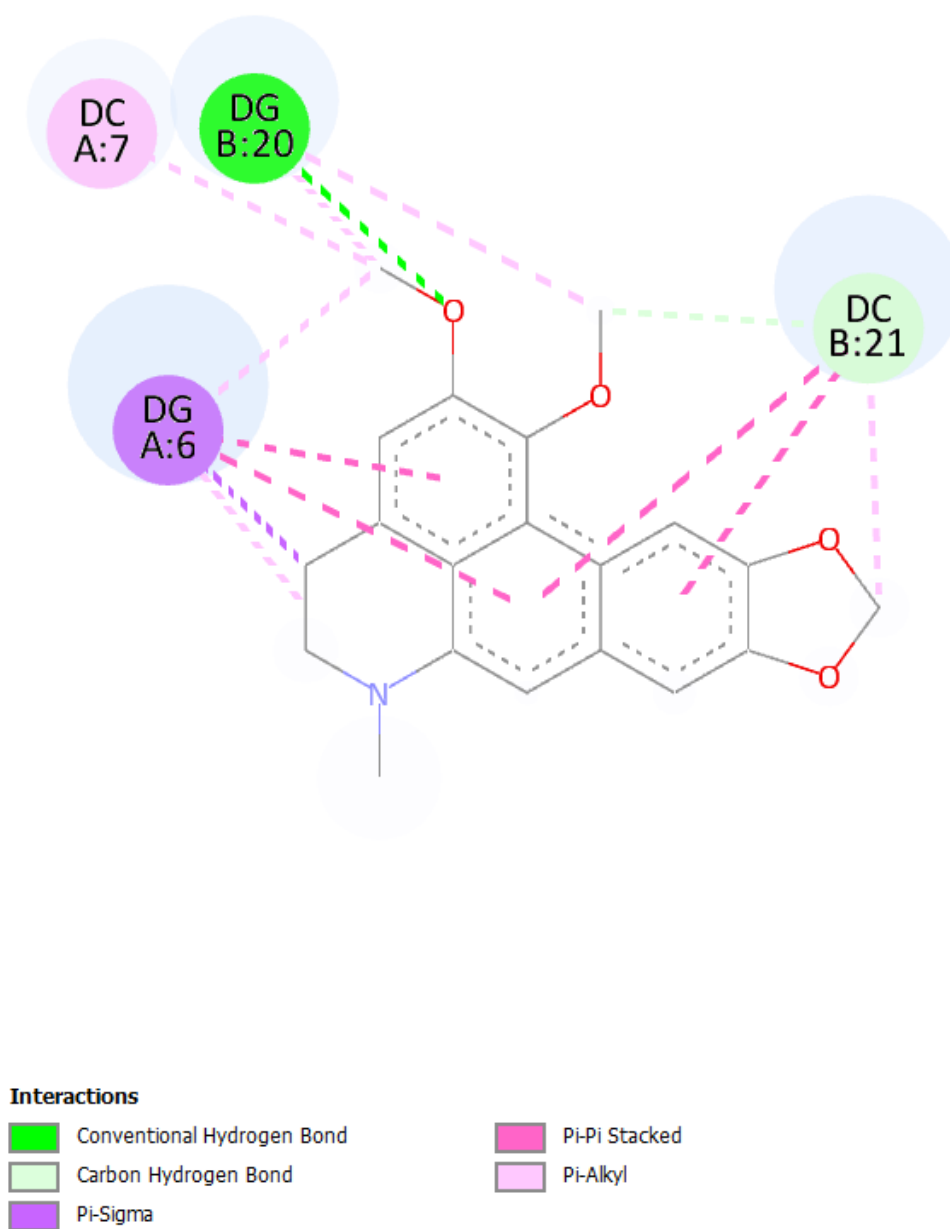
Figura 8: Interação intermolecular da molécula 14771754.



Fonte: Do autor.

A molécula da figura 9, trata-se da única proveniente do banco de dados Nubbe, banco de dados brasileiro. Esta apresenta ligações de hidrogênio, interações π - σ , interações do tipo π - π e interações π -alkyl com o receptor.

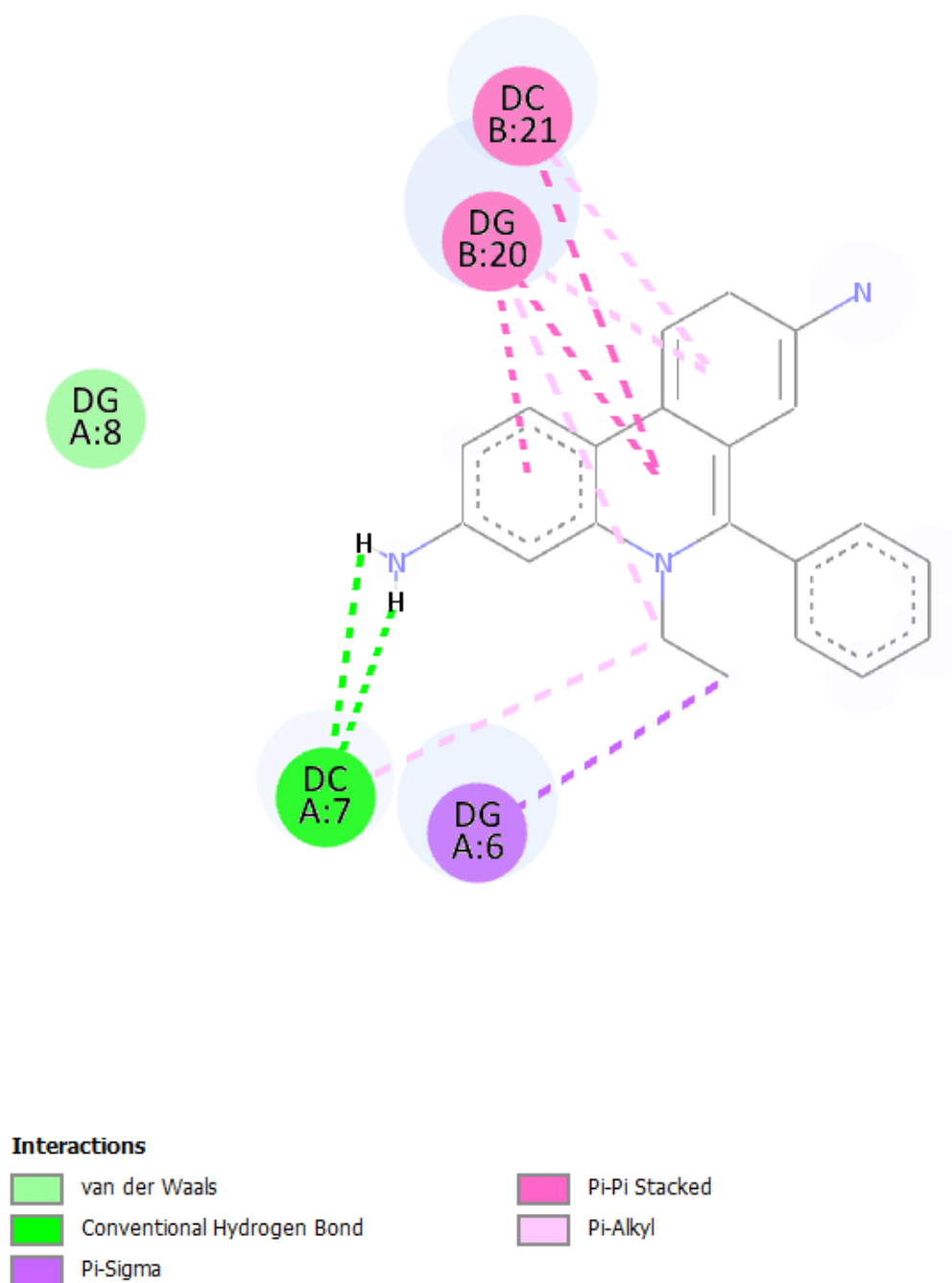
Figura 9: Interação intermolecular da molécula do banco de dados Nubbe, 2419.



Fonte: Do autor.

Abaixo a Figura 10 apresenta a interação 2D do intercalante controle brometo de etídio. Este intercalante possui interações π - σ , interações do tipo π - π e interações π -alkyl além de ligação de Van der Waals com o receptor. Esses mesmos tipos de interações aparecem nas moléculas acima, evidenciando semelhanças de comportamento com o receptor.

Figura 10: Interação intermolecular do brometo de etídio, agente intercalante controle.



Fonte: Do autor.

A análise das interações intermoleculares por meio de diagramas 2D evidenciou que os ligantes selecionados apresentam padrões de interação compatíveis com um modo de ligação intercalante ao DNA. Em todas as moléculas foram observadas as interações do tipo π - π entre os sistemas aromáticos dos ligantes e as bases nitrogenadas do DNA, interação considerada fundamental para a estabilização de compostos intercalantes (Strekowski; Wilson, 2007).

Pode-se observar a presença dominante de interações de empilhamento (π - π , π -sigma, π -alkyl) em todas apresentadas. Esse tipo de interação é clássico de intercalação, por isso evidencia um alto potencial dessas moléculas desse processo. O processo de intercalação

geralmente envolve um aumento de interações de empilhamento, o que contribui substancialmente com estabilidade do complexo ligante-DNA.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo selecionar moléculas com potencial intercalante de DNA para futura aplicação em biossensores, utilizando abordagens computacionais *in silico*. Para isso, foram realizadas etapas de obtenção e preparação dos ligantes e do receptor, seguidas por docking molecular direcionado, blind docking para validação do sítio de ligação, análise das interações intermoleculares e avaliação preliminar de toxicidade.

O docking molecular possibilitou comparar os perfis de afinidade estimada entre os ligantes avaliados, enquanto o blind docking demonstrou que as poses de menor energia concentraram-se majoritariamente na mesma região do DNA utilizada na etapa direcionada, reforçando a consistência do sítio selecionado dentro das condições do modelo computacional adotado.

A análise das interações intermoleculares revelou predominância de interações não covalentes, compatíveis com mecanismos descritos para moléculas intercalantes de DNA. Em conjunto com a avaliação toxicológica, esses resultados permitiram uma análise mais abrangente dos compostos, considerando não apenas a afinidade estimada, mas também aspectos relacionados ao perfil de segurança, essenciais para aplicações futuras em biossensores.

Entre os compostos avaliados, a molécula 129804265 apresentou a maior afinidade estimada pelo sítio alvo, porém apresentou resultado positivo na predição de mutagenicidade pelo teste de Ames. Por outro lado, o composto 14771754 apresentou afinidade relevante associada à ausência de mutagenicidade predita, destacando-se como o candidato mais promissor entre os compostos avaliados para futuras investigações envolvendo biossensores baseados em interação com DNA.

Por fim, os resultados reforçam o potencial das metodologias computacionais *in silico*, como o docking molecular, como ferramentas de triagem inicial na identificação de moléculas de interesse, permitindo reduzir o número de candidatos para etapas experimentais seguintes, especialmente quando associado à avaliação toxicológica. Além disso, os achados de predições computacionais deste estudo podem contribuir para trabalhos futuros voltados ao desenvolvimento de biossensores baseados em interação com DNA, ao indicar compostos promissores e apoiar a etapa inicial de seleção de candidatos.

REFERÊNCIAS

BANK, R. P. D. **PDB - 2ROU**. [S. l.]: [S. n.], 3 mar. 2009. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/2ROU>. Acesso em: 15 abr. 2025.

DAS, A.; BANIK, B. K. Advances in heterocycles as DNA intercalating cancer drugs. **Physical Sciences Reviews**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 2473–2521, 1 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/psr-2021-0065>.

FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [S. l.], v. 623, n. 1–2, p. 14–23, out. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.014>.

GATASHEH, M. K.; KANNAN, S.; HEMALATHA, K.; IMRANA, N. Proflavine an acridine DNA intercalating agent and strong antimicrobial possessing potential properties of carcinogen. **Karbala International Journal of Modern Science**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 272–278, dez. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2017.07.003>.

HENDRY, L. B.; MAHESH, V. B.; BRANSOME, E. D.; EWING, D. E. Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [S. l.], v. 623, n. 1–2, p. 53–71, out. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.009>.

[HTTP://OPENBABEL.ORG](http://openbabel.org). **Open Babel 3.1.1**. [S. l.]: [S. n.], [S. d.].

KEADTIDUMRONGKUL, P.; CHIRARAT, N.; SOMRAN, S. Determination of LD50 of Ethidium Bromide for Induction of Mutation in Marigolds. **Asian Health, Science and Technology Reports**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 80–88, 15 nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.14456/nujst.2018.24>.

LI, H.-H.; AUBRECHT, J.; FORNACE, A. J. Toxicogenomics: Overview and potential applications for the study of non-covalent DNA interacting chemicals. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [S. l.], v. 623, n. 1–2, p. 98–108, out. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.013>.

LI, P.; WANG, W.; SUN, Q.; LI, Z.; DU, A.; BI, S.; ZHAO, Y. Insights into the mechanism of the reaction between tetrachloro-p-benzoquinone and hydrogen peroxide and their implications in the catalytic role of water molecules in producing the hydroxyl radical. **Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 2737–2743, 26 ago. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cphc.201300395>.

MUKHERJEE, A.; SASIKALA, W. D. Drug-DNA intercalation: from discovery to the molecular mechanism. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, [S. l.], v. 92, p. 1–62, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411636-8.00001-8>.

NELSON, S. M.; FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. Non-covalent ligand/DNA interactions: Minor groove binding agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [S. l.], v. 623, n. 1–2, p. 24–40, out. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.012>.

NUBBE - NÚCLEO DE BIOENSAIOS, BIOSÍNTESE E ECOFISIOLOGIA DE PRODUTOS NATURAIS. [S. l.]: [S.n.], 2017. Disponível em: <https://nubbe.iq.unesp.br/portal/nubbe-search.html>. Acesso em: 15 abr. 2025.

O'BOYLE, N. M.; BANCK, M.; JAMES, C. A.; MORLEY, C.; VANDERMEERSCH, T.; HUTCHISON, G. R. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 33, 7 out. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>.

O'NEIL, C.; BEACH, J.; GRUBER, T. Thiazole orange as an everyday replacement for ethidium bromide and costly DNA dyes for electrophoresis. **ELECTROPHORESIS**, [S. l.], v. 39, 12 abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elps.201700489>.

OWOLOYE, A. J.; LIGALI, F. C.; ENEJOH, O. A.; MUSA, A. Z.; AINA, O.; IDOWU, E. T.; OYEBOLA, K. M. Molecular docking, simulation and binding free energy analysis of small molecules as PfHT1 inhibitors. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 17, n. 8, p. e0268269, 26 ago. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268269>.

PANDEY, P. C.; WEETALL, H. H. Detection of Aromatic Compounds Based on DNA Intercalation Using an Evanescent Wave Biosensor. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 67, n. 5, p. 787–792, 1 mar. 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac00101a003>.

PETROVIĆ, M.; ŠRUT RAKIĆ, I.; RUNTE, S.; BUSSE, C.; SADOWSKI, J. T.; LAZIĆ, P.; PLETIKOSIĆ, I.; PAN, Z.-H.; MILUN, M.; PERVAN, P.; ATODIRESEI, N.; BRAKO, R.; ŠOKČEVIĆ, D.; VALLA, T.; MICHELY, T.; KRALJ, M. The mechanism of caesium intercalation of graphene. **Nature Communications**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 2772, 11 nov. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms3772>.

PILON, A. C.; VALLI, M.; DAMETTO, A. C.; PINTO, M. E. F.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPULO, A. D.; BOLZANI, V. S. NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 7215, 3 ago. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07451-x>.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 14 maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>.

PUBCHEM. **PubChem**. [S. l.]: [S.n.], 2025. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 15 abr. 2025.

SNYDER, R. D. Assessment of atypical DNA intercalating agents in biological and in silico systems. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [S. l.], v. 623, n. 1–2, p. 72–82, out. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.006>.

STREKOWSKI, L.; WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: An overview.

Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, [S. l.], v. 623, n. 1–2, p. 3–13, out. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.008>.

WANG, Y.; SCHNETZ-BOUDAUD, N. C.; KROTH, H.; YAGI, H.; SAYER, J. M.; KUMAR, S.; JERINA, D. M.; STONE, M. P. 3'-Intercalation of a N2-dG 1R-trans-anti-Benzo[c]phenanthrene DNA Adduct in an Iterated (CG)₃ Repeat. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 1348–1358, 21 jul. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/tx7004103>.

O'NEIL, Casey S.; BEACH, Jacie L.; GRUBER, Todd D. Thiazole orange as an everyday replacement for ethidium bromide and costly DNA dyes for electrophoresis. *Electrophoresis*, 2018, 39.12: 1474-1477.

OWOLOYE, Afolabi J., et al. Molecular docking, simulation and binding free energy analysis of small molecules as Pf HT1 inhibitors. *PloS one*, 2022, 17.8: e0268269.