



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Pós-Graduação em Química

PATRÍCIA CARDOSO SEVERINO

ATIVIDADE DE MODELOS BIOMIMÉTICOS
DE FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS SOBRE
ÁCIDOS NUCLEICOS

Florianópolis – SC

2007

PATRÍCIA CARDOSO SEVERINO

**ATIVIDADE DE MODELOS BIOMIMÉTICOS
DE FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS SOBRE
ÁCIDOS NUCLEICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal da Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Hernán Terenzi

Florianópolis – SC

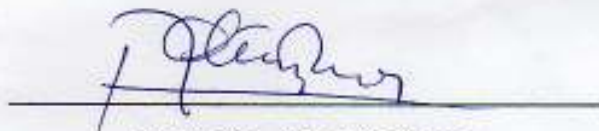
2007

PATRÍCIA CARDOSO SEVERINO

**ATIVIDADE DE MODELOS BIOMIMÉTICOS DE
FOSFATASES ÁCIDAS PÚRPURAS SOBRE ÁCIDOS
NUCLEICOS**





Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutor em
Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade
Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 26 setembro de 2007.



Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Hernán Terenzi
Orientador – UFSC
Prof. Dr. Mauricio Lanznaster
Relator – UFF-RJ
Prof. Dr. Marcus Mandolesi Sá
UFSC
Prof. Dr. Ademir Neves
UFSC
Prof. Dra. Rosmari Horner
UFSM - RS
Prof. Dr. José Carlos Gesser
UFSC

*Aos meus pais João e Sonia e aos
meus dois amores Davi e Felipe.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais João e Sonia, por tudo que me ensinaram, pelo amor e dedicação e pela confiança e esperança que sempre depositaram em mim.

Ao meu companheiro Davi, seu amor e paciência nas horas de desespero durante esta jornada foram fundamentais para a conclusão de mais esta etapa.

Aos meus irmãos Sérgio e Thaise, mesmo longe, estamos mais unidos do que nunca. Obrigada pelo carinho e incentivo.

Ao Professor Hernán Terenzi pela orientação e discussões entusiasmadas e por acreditar que eu era capaz....

Ao Professor Ademir Neves, por sua paciência, incentivo e pelos ensinamentos que contribuíram imensamente para meu crescimento profissional.

Aos colegas do LABEXGEN, Maurício Bof, Guilherme Razera, Javier Vernal pelo apoio técnico, científico e principalmente emocional.

Aos “Pinkys” Franciele, Tassiele, Carolina, Viviane por terem me aturado, pelo apoio e amizade.

Aos colegas do LABINC, Rosely, Anelise, Maurício, Rafael por terem a paciência de esclarecer minhas dúvidas e pela ajuda indispensáveis na realização deste trabalho.

Ao Departamento de Química e a Pós-Graduação em Química da UFSC pela oportunidade.

À CAPES e demais órgãos de fomento pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
SUMÁRIO.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Estrutura do Ácido Desoxirribonucléico (DNA).....	14
1.1.1. DNA Plasmidial.....	17
1.2 Nucleases.....	19
1.3 Fosfatase Ácida Púrpura	22
1.4 Nucleases Químicas – Modelos de Fosfatases.....	28
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivo específico.....	30
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
3.1. MATERIAIS.....	32
3.1.1. Complexos FeZnOH e FeZnOAc.....	34
3.1.2. Complexos FeCuOH e FeCuOAc.....	37
3.1.3. Complexos FeNiOAc.....	38
3.1.4. Complexos FeMnOH.....	39
3.2. MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO.....	40
3.2.1. Preparação do DNA plasmidial.....	40
3.2.2. Eletroforese em gel de agarose.....	40
3.2.3. Teste de clivagem em diferentes pHs.....	41
3.2.4. Cinética de clivagem do DNA plasmidial.....	41
3.2.5. Captadores de radicais livres.....	42
3.2.6. Reação em condições anaeróbias.....	42
3.2.7. Espectrofotometria UV-Vis.....	43
3.2.8. Teste com Distamicina.....	44

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1.	Teste de clivagem em diferentes pHs e concentração do complexo.....	47
4.2.	Cinética de clivagem do DNA plasmidial.....	53
4.3.	Teste de mobilidade e ligação do complexo FeNiOAc ao DNA	60
4.4.	Efeito de captadores de radicais livres.....	63
4.5.	Reação em condições anaeróbicas.....	67
4.6.	Espectrofotometria UV-Vis.....	72
4.7.	Teste com Distamicina.....	81
5.	CONCLUSÕES.....	85
6.	PERSPECTIVAS.....	87
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
	ANEXOS.....	100
	ANEXO 1.....	101
	ANEXO 2.....	102
	ANEXO 3.....	103
	ARTIGOS PUBLICADOS.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Desenho esquemático mostrando a estrutura de dupla-hélice do DNA.....	14
Figura 2.	Diagrama mostrando a composição de um nucleotídeo.....	15
Figura 3.	Diagramas estruturais das quatro bases nitrogenadas.....	15
Figura 4.	O pareamento de bases da dupla-fita de DNA.....	16
Figura 5.	As três diferentes formas do DNA plasmidial.....	18
Figura 6.	Representação em fita da estrutura global da PAP de batata doce (A) e de porco (B).....	24
Figura 7.	Estruturas cristalinas dos sítios ativos das PAPs: (a) kbPAP (b) ufPAP.....	25
Figura 8.	Representação esquemática para o sítio ativo das PAPs.....	25
Figura 9.	Três possíveis mecanismos de reação para fosfatases.....	27
Figura 10.	Mecanismo de reação proposto para a hidrólise do BDNPP pelos complexos Fe—Zn e Fe—Cu.....	29
Figura 11.	Representações esquemáticas para o sítio ativo das fosfatases ácidas púrpuras PAPs (acima) e da estrutura do ligante H₂BPBPMP	32
Figura 12.	Diagramas ORTEP e esquemático para os cátions (A) [Fe ^{III} Zn ^{II} L1(OAc) ₂] ⁺ ; e (B) [Fe ^{III} Zn ^{II} L1(OH)(H ₂ O)] ⁺	34
Figura 13.	Proposta para os equilíbrios observados nos complexos FeZnOAc, FeCuOAc e FeNiOAc em solução, onde M = Zn ^{II} , Cu ^{II} e Ni ^{II}	35
Figura 14.	Proposta para os equilíbrios observados para complexos [Fe ^{III} Zn ^{II} L1(OH)(H ₂ O)](ClO ₄) ₂ e [Fe ^{III} Cu ^{II} L1(OH)(H ₂ O)](ClO ₄) ₂ em solução.....	36
Figura 15.	ORTEP e desenho esquemático para o cátion [Fe ^{III} Cu ^{II} L1(OAc) ₂] ⁺	37
Figura 16.	ORTEP para o cátion [Fe ^{III} Ni ^{II} L1(OAc) ₂] ⁺	38
Figura 17.	ORTEP para o cátion [Fe ^{III} Mn ^{II} L1(OAc) ₂] ⁺	39
Figura 18.	A: Estrutura Química da distamicina. B: Ligação específica da distamicina (vermelho) ao sulco menor do DNA.....	45

Figura 19.	Clivagem do DNA pelo complexo FeCuOAc em diferentes pHs.	48
Figura 20.	Clivagem do DNA em diferentes pHs pelo complexo FeCuOH.	48
Figura 21.	Clivagem do DNA em diferentes pHs pelo complexo FeZnOAc.	49
Figura 22.	Clivagem do DNA em diferentes pHs pelo complexo FeZnOH.	50
Figura 23.	Teste de clivagem do DNA em diferentes pHs.....	51
Figura 24.	Teste de atividade do DNA em diferentes pHs pelo complexo FeNiOAc.	53
Figura 25.	Análise cinética da clivagem do DNA promovida pelo complexo FeCuOAc.....	54
Figura 26.	Análise cinética da clivagem do DNA promovida pelo complexo FeZnOAc.....	55
Figura 27.	Cinética de atividade do complexo sobre o DNA plasmidial visualizada em gel de agarose 1%.....	59
Figura 28.	Teste de interação do DNA pBSK II com o complexo FeNiOAc.	60
Figura 29.	Estrutura e modo de ligação do Brometo de Etídio ao DNA.	62
Figura 30.	Experimento utilizando DMSO e Glicerol como captadores de radicais livres nas reações do complexo FeCuOAc.....	64
Figura 31.	Experimento utilizando DMSO e Glicerol como captadores de radicais livres nas reações do complexo FeCuOH.	64
Figura 32.	Experimento utilizando DMSO e Glicerol como captadores de radicais livres nas reações do complexo FeZnOAc.....	65
Figura 33.	Experimento utilizando DMSO e Glicerol como captadores de radicais livres nas reações do complexo FeZnOH.....	65
Figura 34.	Experimento utilizando DMSO e Glicerol como captadores de radicais livres em reações com o complexo FeNiOAc.....	66
Figura 35.	Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeCuOAc em condições anaeróbicas.....	68
Figura 36.	Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeCuOH em condições anaeróbicas.....	68
Figura 37.	Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeZnOAc em condições anaeróbicas.....	69
Figura 38.	Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeZnOH em condições anaeróbicas.....	70

Figura 39.	Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeMnOH em condições anaeróbicas.....	71
Figura 40.	Titulação espectrofotométrica do complexo FeCuOAc com DNA plasmidial pBSK II.....	73
Figura 41.	Titulação espectrofotométrica do complexo FeCuOH com DNA plasmidial pBSK II.....	74
Figura 42.	Espectro de absorvância corrigido do complexo FeNiOAc na ausência (R1) e na presença (R2 e R3) de concentrações crescentes de DNA plasmidial.	75
Figura 43.	Espectro UV-Vis do complexo FeZnOAc com DNA plasmidial pBSK II.	77
Figura 44.	Titulação espectrofotométrica UV-Vis do complexo FeZnOH com DNA plasmidial pBSK II.	78
Figura 45.	Titulação espectrofotométrica do complexo FeMnOH com CT-DNA.	79
Figura 46.	Teste de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo FeCuOAc na ausência e na presença do reagente intercalante Distamicina.	81
Figura 47.	Teste de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo FeCuOH na ausência e na presença do intercalante Distamicina.....	82
Figura 48.	Estudo de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo FeZnOAc na ausência e na presença de Distamicina.	83
Figura 49.	Estudo de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo FeZnOH na ausência e na presença de Distamicina.	83
Figura 50.	Análise de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo FeMnOH na ausência e na presença do reagente intercalante Distamicina.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Fórmula molecular dos complexos a serem utilizados e sua designação neste trabalho.....	33
Tabela 2.	Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem do DNA, catalisada pelos complexos FeCuOAc, FeCuOH, FeZnOAc, FeZnOH e FeMnOH.....	56
Tabela 3.	Constante de ligação intrínseca (K_b) e constante de associação cinética (K_{ass}) dos complexos metálicos $Fe^{III}M^{II}$ e comparação com outros compostos.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-BDNPP	bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
A	adenina
bsPAP	Fosfatase Ácida Púrpura de Baço de Bovinos
C	citossina
CH ₃ CN	Acetonitrila
CT-DNA	DNA de timo de bezerro “ <i>Calf Thymus DNA</i> ”
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
E	Eficiência catalítica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
f	Fator catalítico
F I	forma superenovelada do plasmídeo
F II	forma circular aberta do plasmídeo
F III	forma linear do plasmídeo
FeCuOAc	Complexo [Fe ^{III} Cu ^{II} L1(OAc) ₂]ClO ₄
FeCuOH	Complexo [Fe ^{III} Cu ^{II} L1(OH)(H ₂ O)]ClO ₄
FeMnOH	Complexo [Fe ^{III} Mn ^{II} L1(OH)(H ₂ O)]ClO ₄
FeNiOAc	Complexo [Fe ^{III} Ni ^{II} L1(OAc) ₂]ClO ₄
FeZnOAc	Complexo [Fe ^{III} Zn ^{II} L1(OAc) ₂]ClO ₄
FeZnOH	Complexo [Fe ^{III} Zn ^{II} L1(OH)(H ₂ O)](ClO ₄) ₂
G	guanina
H ₂ BPBPMP	ou 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-
L1	hidroxibenzil)(2-piridilmetil) aminometil]fenol
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
K _{ass}	Constante de associação

kbPAP	Fosfatase Ácida Púrpura de feijão vermelho tipo “kidney bean”
k_{cat}	Constante catalítica
kDa	Quilo Daltons
K_m	Constante de Michaelis-Menten
k_{obs}	Constante de velocidade
kpb	Quilobase – 1 Kpd corresponde a 1000 pares de base
M^{II}	Metal divalente
M^{III}	Metal trivalente
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
pBSK II	Plasmídeo Bluescript SK II
PAP	Fosfatase Ácida Púrpura
pb	pares de bases de DNA
PIPES	Piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etano sulfônico)
ratTRAP	Fosfatase Ácida Púrpura Resistente ao Tartarato de Ratos
rbPAP	Fosfatase Ácida Púrpura de Ossos de Ratos
ufPAP	Fosfatase Ácida Púrpura de Útero de Suínos
T	timina
TBE	tampão Tris/borato/EDTA
TRAP	Fosfatase Ácida Púrpura Resistente ao Tartarato Humana do Tipo 5
TRIS	tris(hidroximetil) aminometano
UV-Vis	ultravioleta-visível

RESUMO

As Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs) pertencem a um grupo de metaloenzimas da classe das hidrolases atuando na clivagem de ésteres de fosfato, promovem a hidrólise de fosfoproteínas, nucleotídeos e arilfosfatos. Complexos biomiméticos do sítio ativo das PAPs foram sintetizados com o objetivo de elucidar o papel das PAPs nos sistemas vivos e simultaneamente encontrar novas aplicações para estes complexos como nucleases sintéticas. Com este intuito, foi testada a atividade de uma série de complexos heterodinucleares $Fe^{III}M^{II}$, usando o ligante assimétrico $H_2BPBPMP$ (L1). Os complexos são: $FeCuOAc$, $FeCuOH$, $FeZnOAc$, $FeZnOH$, $FeMnOH$ e $FeNiOAc$.

O DNA plasmidial foi utilizado como modelo para testar a clivagem da ligação fosfato pelos complexos. Foram testadas diferentes condições de pH e concentração dos complexos. As reações também foram realizadas na presença de captadores de radicais livres e na ausência de oxigênio. Para verificar a interação complexo/DNA foram realizados experimentos com Distamicina e titulação espectrofotométrica UV-Vis.

Todos os complexos, exceto $FeNiOAc$, foram capazes de clivar DNA por um mecanismo hidrolítico em baixas concentrações do complexo (2,5 μM) a 37 °C em pH próximo ao fisiológico (faixa de 6,0 a 7,0). O complexo $FeNiOAc$ não cliva o DNA, mas pode se ligar ao DNA e alterar significativamente sua mobilidade. O complexo $FeCuOAc$ é o mais ativo da série apresentando uma aceleração de $2,71 \times 10^7$ vezes quando comparado com o valor do DNA não catalisado, seguido por, $FeMnOH$, $FeZnOAc$, $FeCuOH$ e $FeZnOH$.

Palavras chave: complexo metálico, clivagem DNA, nucleases sintéticas, PAPs.

ABSTRACT

Purple Acid Phosphatases (PAPs) are members of a group of metalloenzymes included in the class of hydrolases acting in the cleavage of phosphate esters, promote hydrolysis of phosphoproteins, nucleotides and arilphosphates. Biomimetic complexes for the active site of PAPs were synthesized in order to elucidate the role of PAPs in living systems and simultaneously find new applications for these complexes as chemical nucleases. In view of this we tested the activity of a series of hetero-dinuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ complexes by using the unsymmetrical H_2BPBPMP ligand (L1). The complexes were: FeCuOAc , FeCuOH , FeZnOAc , FeZnOH , FeMnOH and FeNiOAc .

Plasmid DNA were used as a model to test the cleavage of phosphate bond by the complexes. Different conditions of pH and complex concentration were tested. The reactions were also cared out in the presence of radical scavengers and in the absence of oxygen. To verify the interaction complex/DNA experiments with Distamicin and spectrophotometric titration were performed.

All the complexes, except FeNiOAc , were able to cleave DNA by a hydrolytic mechanism even at low complex concentration ($2,5 \mu\text{M}$) at 37°C and near physiological pH (range 6,0 to 7,0). FeNiOAc complex did not cleave DNA, but can bind DNA and change its mobility. FeCuOH complex is the most active of this series with rate enhancement $2,71 \times 10^7$ times over uncatalyzed double-stranded DNA cleavage, follow by FeMnOH , FeZnOAc , FeCuOH , FeZnOH .

Key words:metallic complex, DNA cleavage, synthetic nuclease, PAPs.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estrutura do Ácido Desoxirribonucléico (DNA)

O ácido desoxirribonucléico (DNA) é o responsável pelo armazenamento e transmissão da informação genética e a descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick, em 1953, ^[1] foi um evento grandioso na ciência que originou disciplinas inteiramente novas e influenciou o curso de muitas outras. O modelo mostrou que o DNA é uma dupla-hélice e que as duas fitas se enrolam em torno do eixo da hélice. As desoxirriboses ficam externas em relação às bases nitrogenadas (Figura 1).^[2] As ligações fosfodiéster que unem os nucleotídeos nas duas fitas são antiparalelas: uma na direção 5' PO – 3' OH e a outra na direção 3' OH – 5' PO (Figura 4).

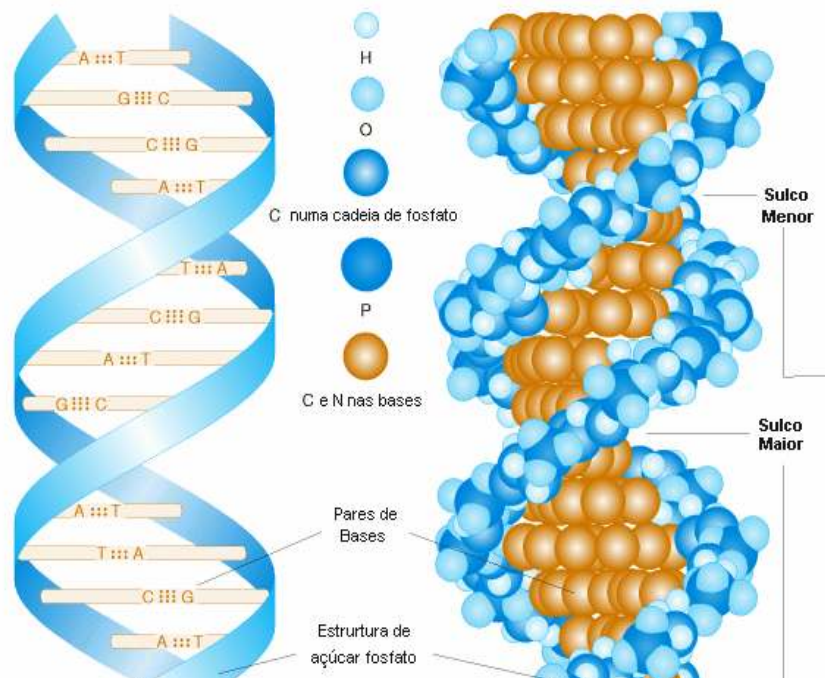


Figura 1. Desenho esquemático mostrando a estrutura de dupla-hélice do DNA. (www.biomol.org/historia/propduplahelice.shtml)

O DNA é formado de **ácido desoxirribonucléico**. As fitas de DNA são longos polímeros formados por milhões de nucleotídeos ligados uns aos outros por ligações fosfodiéster. Individualmente, nucleotídeos consistem de três partes distintas: Uma das quatro bases nitrogenadas, desoxirribose (um açúcar de 5 carbonos) e um grupo fosfato (Figura 2).^[2, 3]

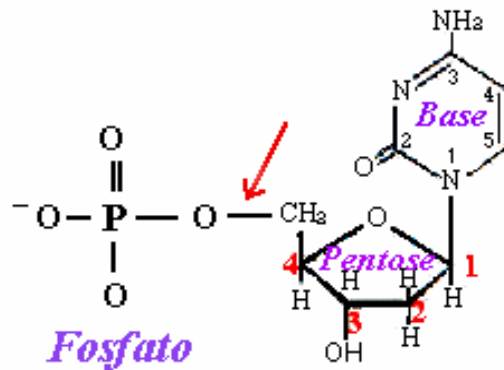


Figura 2. Diagrama mostrando a composição de um nucleotídeo.

As bases nitrogenadas podem ser bases purínicas, adenina (A) e guanina (G) ou bases pirimidínicas, citosina (C) e timina (T). (Figura 3)

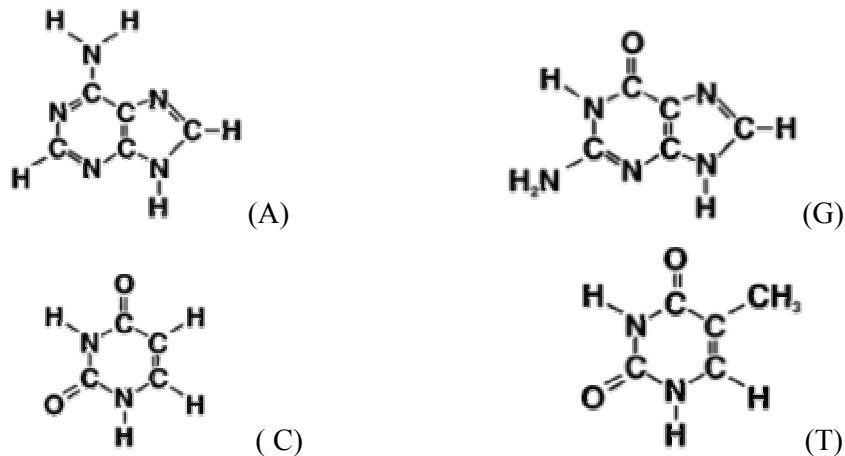


Figura 3. Diagramas estruturais das quatro bases nitrogenadas.

Duas características das bases nitrogenadas são importantes: sua estrutura química e seu tamanho. A presença dos grupos carbonílico (C=O) e amino (C-NH₂) permitem as formações das ligações de hidrogênio entre

as bases. Assim, T que contém o grupo carbonílico pode parear com A que contém um grupo amino, através de uma ligação de hidrogênio e C e G que possuem tanto grupos carbonílicos quanto grupos amino podem formar duas ligações de hidrogênio. Uma ligação de hidrogênio adicional é formada entre os nitrogênios dos anéis aromáticos (Figura 4). [2, 4]

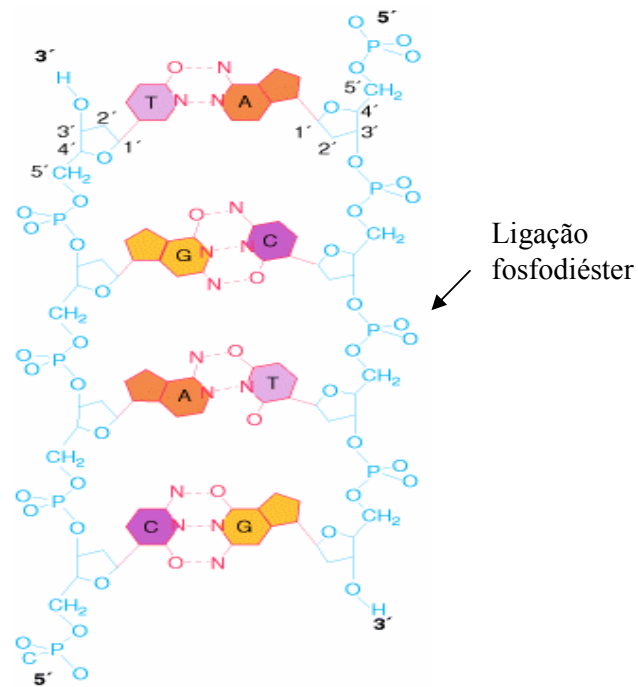


Figura 4. O pareamento de bases da dupla-fita de DNA.

Nas células a molécula de DNA está altamente compactada, superenovelada, que consiste no enrolamento da dupla-hélice sobre si mesma.

1.1.1. DNA Plasmidial

Os mecanismos de replicação do genoma, recombinação, transcrição, reparo e condensação envolvem estados de superenovelamento do DNA. Por isso, é bastante pertinente a escolha do DNA superenovelado plasmidial como sistema modelo, uma vez que o superenovelamento do DNA existe em vírus, animais e células humanas. [5, 6]

Os plasmídeos são moléculas circulares duplas de DNA que estão separadas do DNA cromossômico. Geralmente ocorrem em bactérias e por vezes também em organismos eucarióticos (ex: o anel de 2-micra em *Saccharomyces cerevisiae*). O seu tamanho varia entre 1 e 250 kbp (milhares de pares de bases). Existem entre uma, até cinquenta cópias de um mesmo plasmídeo numa única célula. São ferramentas importantes nos laboratórios de genética e bioquímica, onde são usados rotineiramente para multiplicar (fazer muitas cópias de) ou *expressar* genes específicos. Outro uso importante dos plasmídeos é a produção de grandes quantidades de proteínas, por exemplo, a insulina, ou até mesmo antibióticos. [2, 4]

Além disso, as propriedades das diferentes formas do DNA plasmidial tornam os plasmídeos excelentes modelos para estudos de interação e clivagem do DNA. Primeiramente, o superenovelamento faz com que a molécula de DNA esteja tensionada (Forma I ou F I) e que ao sofrer um corte em uma das fitas tenda a perder esta tensão, “desenrolando” a super-hélice e passando para a forma circular aberta (Forma II ou F II). Um segundo corte na fita oposta, leva à abertura do DNA circular gerando a forma linear do plasmídeo (forma III ou F III) (Figura 5). Em segundo lugar, as três diferentes formas do DNA plasmidial (F I, F II e F III) apresentam mobilidades distintas umas das outras numa eletroforese em gel de agarose. Esta distinção de mobilidade (F I > F III > F II), devido ao diferente grau de compactação das moléculas, torna possível a completa

separação, e posterior quantificação, das formas do DNA plasmidial (Figura 5).^[7, 8]

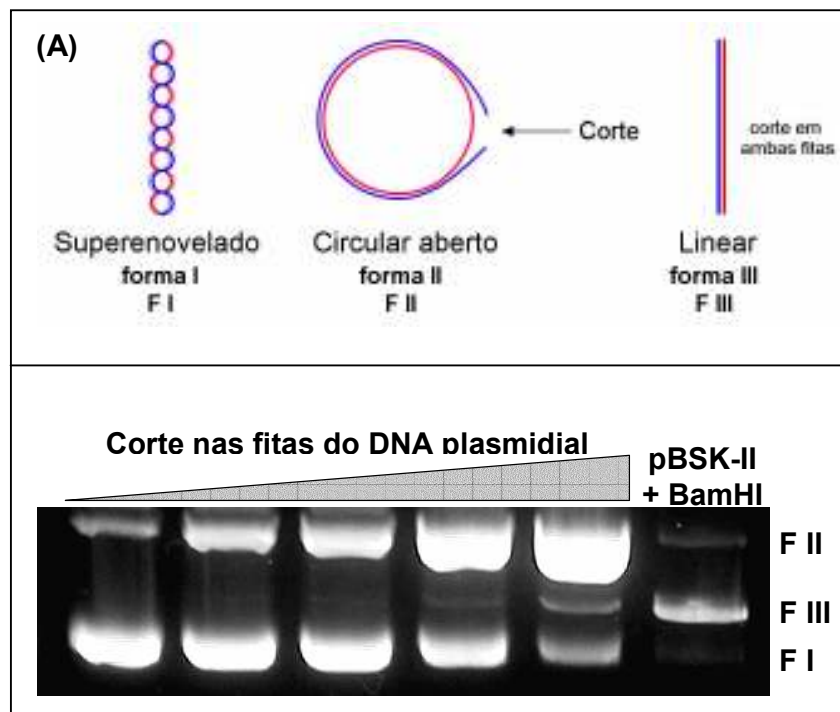


Figura 5 – As três diferentes formas do DNA plasmidial. (A) representação esquemática das três diferentes formas das moléculas de DNA plasmidial. (B) foto ilustrativa de um gel de agarose de amostras do plasmídeo pBSK-II, expostas a um complexo metálico capaz de gerar cortes nas fitas do DNA. A última amostra se refere ao plasmídeo pBSK-II digerido com a enzima de restrição BamHI.^[8]

1.2. Nucleases

A excitação causada pela descrição da estrutura da dupla hélice do DNA atraiu a atenção de muitos pesquisadores, particularmente por causa das implicações biológicas do modelo e não tanto pelo modelo em si. A importante questão que surgiria então era como ocorreria a transformação da informação genética, contida no gene, em proteínas. Para se responder às questões fundamentais de como funcionaria um gene seria necessário quebrar o DNA em pedaços menores, mais manipuláveis, de um modo específico e previsível.^[3]

A descoberta veio em 1968 quando Menelson e Yuan isolaram uma enzima de restrição da bactéria *Escherichia coli*. Esta enzima, uma **nuclease**, que poderia reconhecer uma seqüência definida no DNA e cortá-lo especificamente.^[3]

As nucleases são enzimas capazes de clivar, ou cortar, a ligação fosfodiéster na molécula de ácido nucléico (DNA), são de importância fundamental e grande utilidade. Um exemplo da utilidade das nucleases em síntese orgânica é o uso na resolução de isômeros ópticos. Em biotecnologia, utilizadas como endonucleases de restrição, desempenham um papel chave na manipulação de genes, por sua capacidade de se ligar especificamente ao DNA. A descoberta das nucleases de restrição resultou no desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, em técnicas de sequenciamento de DNA, técnicas de mapeamento genético e mapeamento dos cromossomos humanos.^[9-12]

Todas estas metodologias, onde as nucleases desempenham um papel importante, representam uma grande promessa para o futuro da humanidade através do desenvolvimento da ciência, tecnologia e indústria. Por esta e muitas outras razões, as nucleases têm recebido atenção tanto na pesquisa básica como na aplicada.^[9]

Um aspecto comum da maioria dos trabalhos nesta área é a convergência de estudos químicos e biológicos, através da utilização de substratos “reais” como DNA e proteínas, analisando a atividade de modelos de nucleases e peptidases.^[9, 13]

Os modelos de nucleases podem contribuir para nosso entendimento nos mecanismos de reação e também podem ser utilizados como catalisadores, atuando como enzimas. Por esta razão, químicos tanto da área de orgânica quanto inorgânica têm se envolvido ativamente no desenvolvimento e síntese de modelos de enzimas.^[9]

Nuclease P1^[14], Nuclease S1 de *Aspergillus oryzae*, fosfatase alcalina^[15], carboxipeptidase A^[13], anidrase carbônica, catalase^[16], catecol oxidase^[17] e fosfatase ácida púrpura^[15, 18-20], são algumas das enzimas que inspiraram pesquisadores a sintetizar modelos biomiméticos de enzimas.^[9, 21, 22]

Diversos complexos modelo já sintetizados tiveram sua atividade sobre biomoléculas descrita e são discutidas em algumas revisões na literatura.^[9, 21-25] Muitos destes complexos ajudaram a entender não somente os mecanismos envolvidos em reações catalisadas por enzimas, mas também demonstraram possuir propriedades como agentes antitumorais^[26-29], antimicrobianos^[7] ou atuando como nucleases e peptidases.^[30-34]

Estes modelos são pequenas moléculas que são chamadas nucleases artificiais ou **nucleases químicas** ou ainda, quimioenzimas.^[10]

Pelo fato de muitas enzimas que catalisam a hidrólise da ligação fosfodiéster do DNA possuírem no seu sítio ativo íons metálicos, atualmente existem cada vez mais **nucleases químicas** baseadas em complexos di ou multi metálicos que incluem Fe, Zn, Cu, Co, Ln, Mn entre outros.^[14, 35-40]

Uma das classes mais estudadas de nucleases são as Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs) ^[22], sendo que diversas nucleases químicas que mimetizam o seu sítio ativo já foram sintetizadas.

Como Hamilton e Kirby citam em seu artigo: “*Virtualmente tudo que entendemos sobre os sistemas biológicos é derivado do trabalho em sistemas modelos*”.^[41]

1.3. Fosfatases Ácidas Púrpuras

As fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) compreendem uma família de hidrolases ácidas binucleares que contém metais em seu sítio ativo. São fosfomonoesterases e fofodiesterases não específicas que já foram descritas em mamíferos, plantas, fungos e em algumas bactérias.^[42-45]

As PAPs em mamíferos já foram isoladas de fígado, baço de bovinos (bsPAP), fluido alantóico de porco (uteroferrina - ufPAP) (Figura 6B), e de vários outros tecidos.^[46-49] As PAPs de mamíferos descritas até agora são proteínas monoméricas com massa molecular de aproximadamente 35-40 kDa contendo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ no seu sítio ativo. O centro binuclear de ferro pode apresentar dois estados de oxidação acessíveis: um $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ cataliticamente ativo, conhecido como “forma rosa” e outro $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ inativo, conhecido como “forma púrpura”. A cor púrpura característica é resultado da transferência de carga tirosinato- Fe^{III} a 560 nm.^[44-46]

Pesquisas médicas caracterizaram uma fosfatase ácida de tecidos humanos, resistente a inibição por tartarato, que foi denominada fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) humana do tipo 5. A fosfatase ácida humana (TRAP), isolada de macrófagos e osteoclastos por Hayman e Cox, é uma proteína lisossomal que apresenta duas isoformas, sendo que uma delas é biologicamente inativa e possui peso molecular de aproximadamente 38 kDa. Contém em seu sítio catalítico “clusters” di-ferro-oxo, determinado por estudos de ressonância paramagnética eletrônica. Homóloga a uteroferrina, em humanos, sua função é desconhecida, porém proteínas desta classe estão envolvidas na catálise de reações oxigênio dependentes.^[49] Estudos demonstraram que os níveis de fosfatase no soro humano podem ser medidos para diagnosticar e estabelecer o estágio de câncer de próstata. Recentemente, também foi

demonstrado que os níveis de PAPs são extremamente elevados em células de câncer de mama e em tumores de origem neuroendócrina.^[50]

As fosfatases ácidas púrpuras são expressas diferencialmente em plantas dependendo do estágio de desenvolvimento e já foram isoladas de uma grande variedade de plantas como feijão vermelho tipo “kidney bean”, sementes de soja, batata doce (Figura 6A), arroz e folhas de espinafre.^[45, 47, 48] No feijão vermelho, apresenta-se como um homodímero de massa molecular 110 kDa contendo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ e teve sua estrutura determinada por Sträter e refinada por Klabunde e colaboradores.^[45]

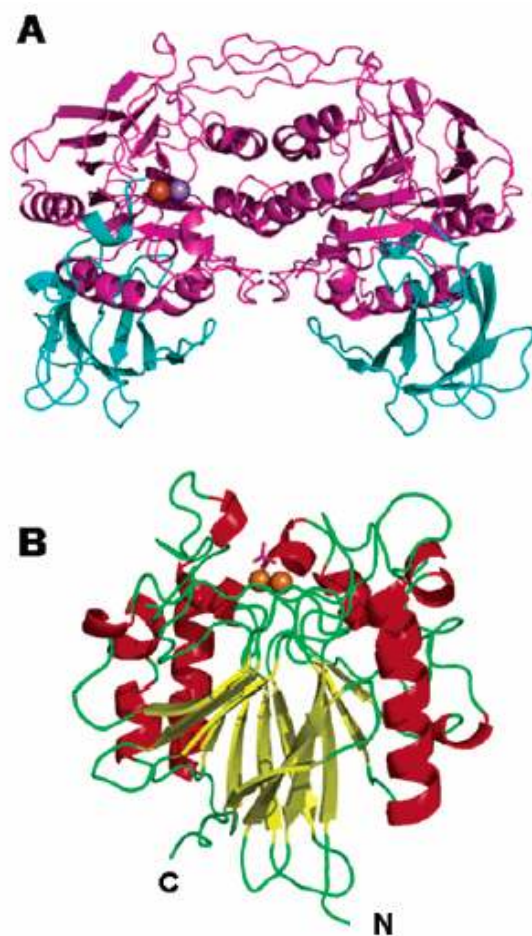


Figura 6. Representação em fita da estrutura global da PAP de batata doce (A) e de porco (B). A PAP de batata doce é um homodímero; cada subunidade contém dois domínios um N-terminal (em azul) de função desconhecida e um domínio catalítico (em magenta). Os íons metálicos estão representados na cor laranja para Fe^{III} e azul para Mn^{II}. As PAPs de mamíferos são monoméricas e possuem somente um domínio. Em B, os dois íons Fe são mostrados como esferas laranjas.^[51]

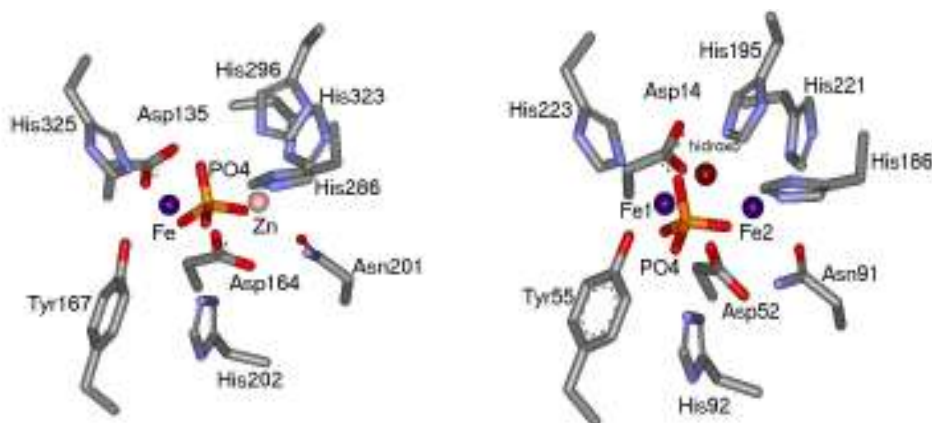


Figura 7. Estruturas cristalinas dos sítios ativos das PAPs: (a) kbPAP (b) ufPAP.

A elucidação das estruturas cristalinas da ufPAP (1,55 Å) e da TRAP de ratos (ratTRAP (2,7 Å) e rbPAP (2,2 Å)) permitiram constatar a similaridade dos sítios ativos das PAPs de mamíferos e da kbPAP, sugerindo que a catálise da reação de hidrólise de fosfatos deva ocorrer através de um mecanismo similar (Figura 7). Um desenho esquemático representando a composição de um sítio ativo comum para a forma ativa das PAPs de mamíferos e de vegetais é mostrado na Figura 8.^[19]

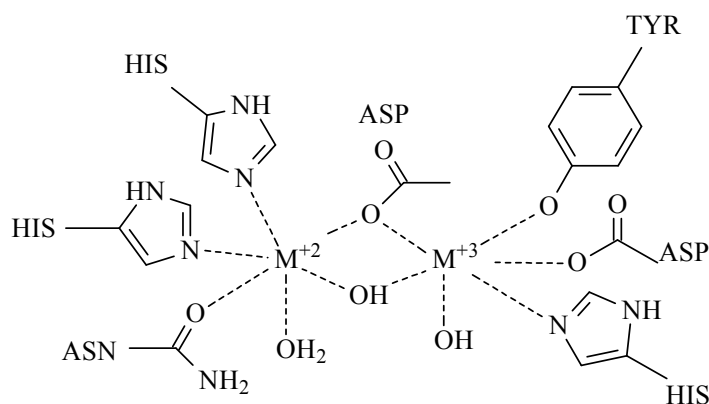


Figura 8. Representação esquemática para o sítio ativo das PAPs.

As PAPs promovem a hidrólise de fosfoproteínas, nucleotídeos, arilfosfatos.^[49] Testes *in vitro* demonstraram que esta proteína pode servir como catalisadora em reações de peroxidação levando a formação de íons superóxido e íons hidroxila.^[47, 49] Em plantas as PAPs são responsáveis pela assimilação e manutenção dos níveis de fosfato, liberando fosfato de esterres de fosfato e anidridos.^[47, 48]

Fosfatases ácidas púrpuras contendo centro $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}$ (onde M pode ser Fe ou Zn) em seu sítio ativo catalisam a hidrólise de éster de ácido fosfórico ativado e anidridos, como ATP.^[45, 47, 51] Mas o mecanismo de ação destas enzimas ainda não está totalmente esclarecido. Por isso as PAPs têm sido extensamente estudadas com o intuito de investigar o papel dos metais e do tipo de mecanismo envolvido. Três mecanismos já foram propostos. No primeiro mecanismo (Figura 9a) o fosfato preferencialmente, se liga ao M^{II} (Fe ou Zn). Subseqüentemente o fosfato é atacado pelo OH^- ligado ao Fe^{III} . No segundo mecanismo (Figura 9b), o éster de fosfato faz uma ponte entre Fe^{III} e M^{II} . A ponte $\mu\text{-OH}$, convenientemente orientada, atua como um nucleófilo e ataca o fosfato em ponte por trás. Em outro mecanismo (Figura 9c), o hidróxido ligado ao Fe^{III} inerte atua como uma base geral para deprotonar uma segunda molécula de água, que ataca o fosfato ligado ao M^{II} .^[15, 45, 52] Recentemente, um quarto mecanismo foi descrito por Schenk e colaboradores ao analisarem uma PAP de batata doce com centro metálico FeMn. Neste mecanismo, um $\mu\text{-oxo}$ ponte, e não hidróxido é responsável pelo ataque nucleofílico ao fosfato.^[47]

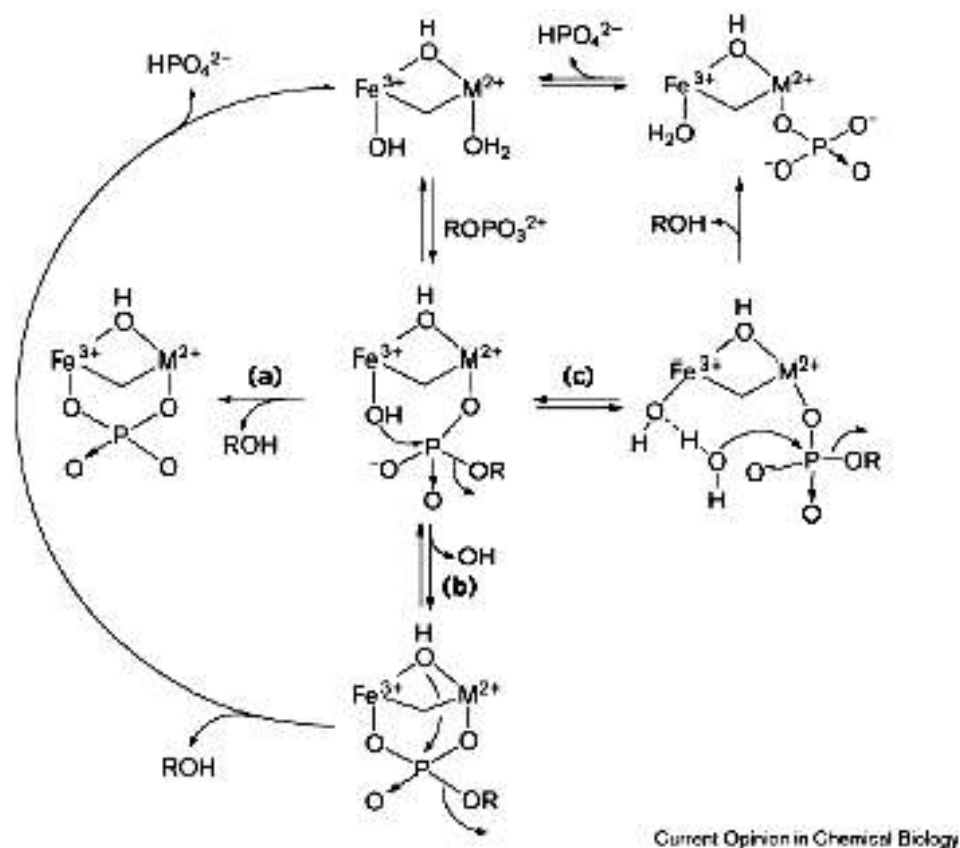


Figura 9. Três possíveis mecanismos de reação para fosfatases. (a) O substrato monoéster de fosfato preferencialmente se liga ao M^{II} . O fosfato é subsequentemente atacado pelo OH^- ligado ao Fe^{III} . (b) Neste mecanismo, o éster de fosfato faz uma ponte entre os dois centros metálicos e o $\mu-OH$ então ataca nucleofílicamente o fosfato em ponte. (c) O hidróxido ligado ao Fe^{III} atua como uma base geral para deprotonar a molécula de água, que ataca o fosfato ligado ao M^{II} .^[15]

1.4. Nucleases Químicas – Modelos de Fosfatases

Para avaliar os mecanismos conflitantes propostos para a atividade das PAPs, é de grande interesse que se desenvolvam modelos binucleares contendo Fe^{III} e M^{II} para que possamos entender os diferentes aspectos envolvidos na hidrólise de ligações fosfodiéster, além verificar o potencial de utilização destes modelos de PAPs como nucleases químicas.

Para mimetizar os aminoácidos presentes no sítio ativo das PAPs têm sido utilizados grupos imidazólicos, benzimidazólicos, piridínicos, fenólicos, imínicos, amínicos e amídicos. Os grupos aromáticos podem ainda possuir substituintes diversos em seus anéis.

O primeiro complexo descrito como modelo para as PAPs foi publicado em 1995 por Sadler e colaboradores. Neves e colaboradores têm apresentado complexos homo e heterobinucleares, com base no ligante não simétrico H_2BPBPMP capazes de atuar na hidrólise do substrato modelo bis (2,4-dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP).^[37, 39, 53-59]

Outros modelos, utilizando ligantes diferentes e com centros bimetálicos também mostraram atividade sobre o 2,4-BDNPP^[18, 56, 60] e também sobre o monoéster.^[61]

Alguns modelos biomiméticos de PAPs demonstraram eficiência na hidrólise do substrato ativado 2,4-BDNPP, mas também foram capazes de clivar o DNA, atuando como nucleases químicas.^[37, 39, 51, 61, 62]

A atividade catalítica de complexos modelo de PAPs contendo FeMn , FeZn , FeCu e FeNi foi medida com o substrato ativado 2,4-BDNPP.^[51] Para o complexo FeZn , foi postulado que a hidrólise do diéster ocorre por um mecanismo similar ao proposto para a kbPAP, onde o substrato (ligado como monodentado) é ativado pelo íon metálico divalente, seguido pelo ataque nucleofílico intra-molecular do grupo OH^- ligado ao Fe^{III} no átomo de fósforo (Figura 10A). (2) No entanto estudos realizados com o

complexo de FeCu, mostram que o sítio férrico pode estar pentacoordenado, com ausência de uma molécula de água/hidróxido terminal ligado ao Fe^{III}.^[59] Observações similares foram reportadas para a PAP de porco. Então, similarmente as PAPs de porco e batata doce, o complexo de FeCu utiliza o hidróxido/oxo ponte como um nucleófilo (Figura 10B).^[51]

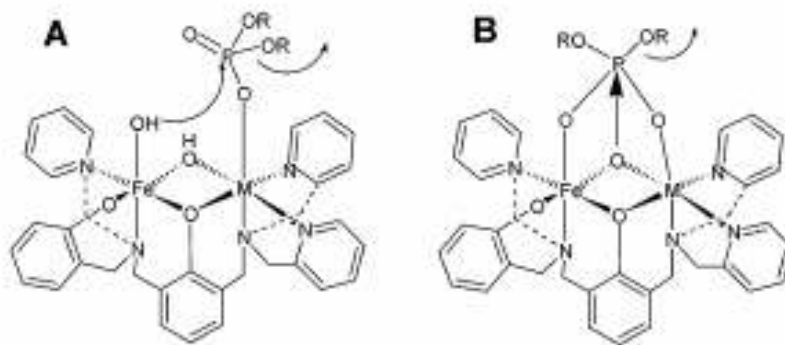


Figura 10. Mecanismo de reação proposto para a hidrólise do 2,4-BDNPP pelos complexos FeZn e FeCu, respectivamente. No complexo FeZn, o nucleófilo proposto está terminalmente coordenado ao Fe^{III} (A), enquanto no complexo FeCu, o nucleófilo proposto é o oxigênio da ponte ligando os metais.^[51, 59]

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo analisar e caracterizar a atividade de complexos biomiméticos do sítio ativo de Fosfatases Ácidas Púrpuras sobre o ácido desoxirribonucléico (DNA).

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a capacidade de clivagem de ácidos nucleicos por complexos que mimetizam as PAPs.
- Determinar o tipo de interação entre os complexos e moléculas de DNA.
- Identificar os locais de corte e/ou ligação dos complexos sobre ácidos nucleicos.
- Determinar parâmetros cinéticos da reação de clivagem de DNA.
- Estudar os possíveis mecanismos envolvidos nas reações dos complexos metálicos com DNA.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS

Experimentos envolvendo ácidos nucleicos requerem certos cuidados especiais para evitar a quebra ou degradação das fitas de DNA pela presença de nucleases ou outro contaminante qualquer nos reagentes, vidraria ou plásticos utilizados nos testes. Por isso, todos os **materiais** (tubos, ponteiras, vidraria) foram esterilizados por autoclavação ou foram utilizados tubos e ponteiras, adquiridos comercialmente, estéreis com certificado DNase, RNase “free”.

Os **reagentes** utilizados (TRIS, agarose, azul de bromofenol, brometo de etídio, ácido bórico, EDTA, NaCl) eram específicos para utilização em biologia molecular.

Os **tampões biológicos** (PIPES, MES, MOPS, HEPES) foram esterilizados por filtração em filtros de 0,22 µm. Os **solventes** (etanol, acetonitrila, DMSO, isopropanol) foram adquiridos de fontes comerciais e apresentavam alto grau de pureza (para HPLC).

A **água** utilizada no preparo das soluções foi água ultrapura (filtro Milli Q) ou água destilada autoclavada.

Os **complexos** utilizados neste trabalho foram sintetizados por alunos do Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia do Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação do Prof. Dr. Ademir Neves. Estes complexos foram desenvolvidos buscando-se mimetizar o sítio ativo de Fosfatases Ácidas Púrpuras. A série de complexos utilizada, foi sintetizada a partir do ligante, **H₂BPBPMP ou L1**, 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil) aminometil]fenol, mostrado na Figura 11.^[53] Nos complexos

modelos testados, foi mantido o mesmo metal trivalente (Fe^{III}) e variando o metal divalente (Zn^{II} , Ni^{II} , Mn^{II} ou Cu^{II}).

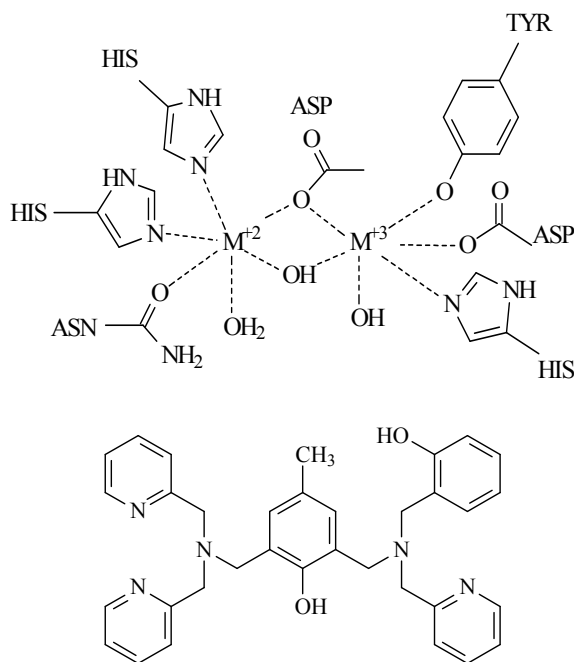


Figura 11. Representações esquemáticas para o sítio ativo das fosfatases ácidas púrpuras PAPs (acima) e da estrutura do ligante **H₂BPBPMP**.

O ligante binucleante possui como braços pendentes os grupos amina, piridina e fenol, que buscam mimetizar, respectivamente, os resíduos de aminoácidos asparagina, histidina e tirosina presentes no sítio ativo das fosfatases ácidas púrpuras.^[19]

Todos os complexos apresentam um arranjo heterodinuclear onde cada íon metálico encontra-se coordenado por uma das metades do ligante heptadentado **L1** e ponteados pelo grupo fenolato 2,4,6-substituído. Os metais divalentes (Zn^{II} , Ni^{II} ou Cu^{II}) estão coordenados por dois átomos de nitrogênio piridínicos e um nitrogênio da amina terciária, enquanto que o íon Fe^{III} encontra-se coordenado a um nitrogênio piridínico, um nitrogênio da amina terciária e pelo oxigênio do fenolato terminal. Nos complexos

$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$, $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ e $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$, as duas posições de coordenação restantes dos metais são ocupadas por pontes do tipo μ -acetato exógenas.^[19]

Os complexos descritos neste trabalho foram caracterizados através de espectroscopia de infravermelho (IR), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H NMR) e carbono (^{13}C NMR), no caso do ligante, e análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) e determinação da estrutura por Raio X. Os resultados da análise elementar encontram-se descritos na literatura juntamente com o procedimento experimental de síntese de cada complexo.^[19, 55-57] Ainda não foram publicados os dados referentes ao complexo FeMnOH e para este trabalho nos baseamos nos dados obtidos através do estudo do complexo FeMnOAc.^[55] Para simplificar a designação dos complexos para este trabalho, será utilizada a seguinte nomenclatura mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Fórmula molecular dos complexos a serem utilizados, e sua designação neste trabalho.

Complexo (fórmula molecular)	Nomenclatura
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$	FeZnOAc
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$	FeZnOH
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$	FeCuOAc
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$	FeCuOH
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$	FeNiOAc
$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$	FeMnOH

3.1.1- Complexos FeZnOH e FeZnOAc

Os complexos de fórmula molecular $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ e $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ foram sintetizados pelo Doutor Maurício Lanznaster (Figura 12).^[19, 56] Os complexos contendo Zn como M^{II} apresentam-se como modelos biomiméticos de Fosfatase Ácida Púrpura de Feijões do Tipo “Red Kidney Bean”.^[45, 56]

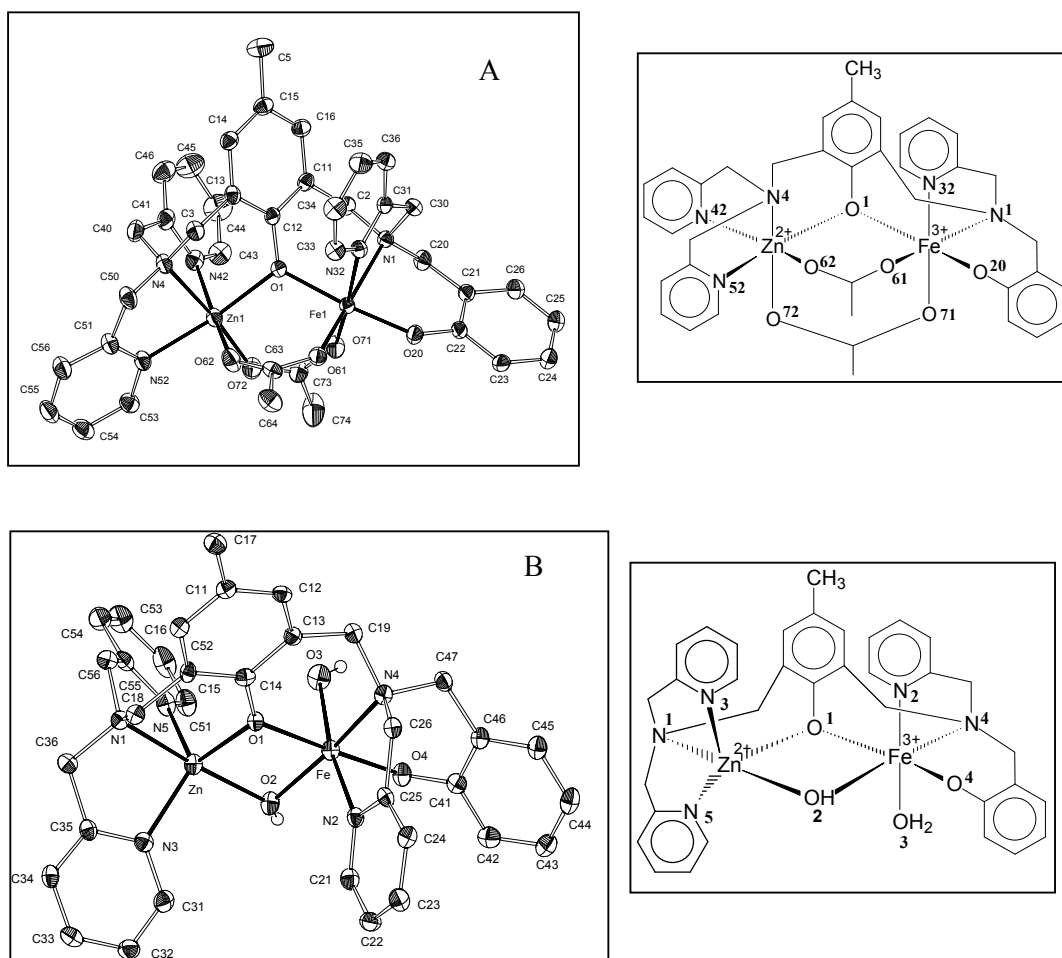


Figura 12. Diagramas ORTEP e esquemático para os cátions (a) $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OAc})_2]^+$; e (b) $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^+$.^[45, 56]

As curvas de equilíbrio potenciométrico obtidas para os complexos FeZnOAc e FeCuOAc apresentam uma região tampão entre pH 4 e 9, que corresponde à neutralização de três prótons. Esse fato indica a hidrólise dos complexos em meio aquoso, onde as duas pontes μ -acetato são substituídas por moléculas de água, as quais foram tituladas fornecendo três constantes de protonação. Para o complexo FeZnOAc os valores de pKa são 4,84; 5,99 e 7,97. O complexo FeCuOAc tem valores de pKa 5,25; 6,20 e 7,82.

Em pH \sim 5 observa-se o primeiro pKa, correspondente a desprotonação da molécula de água ligada ao íon Fe^{III} com a formação da espécie (HO)Fe^{III}(μ -OAc)M^{II}(OH₂). Em pH \sim 6 é observado o segundo pKa, atribuído a desprotonação de uma molécula de água para a formação da ponte μ -hidróxido, imediatamente após a saída da segunda ponte acetato. Finalmente, o terceiro pKa corresponde à desprotonação da molécula de água ligada ao Zn^{II} e é determinado em pH $>$ 7, onde a espécie (HO)Fe^{III}(μ -OH)M^{II}(OH) é formada (Figura 13). [19, 56, 57]

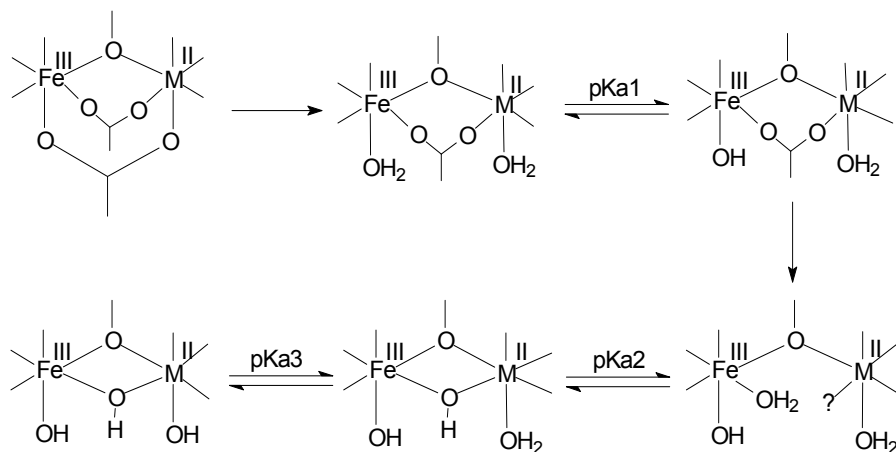


Figura 13. Proposta para os equilíbrios observados nos complexos FeZnOAc, FeCuOAc e FeNiOAc em solução, onde $M = \text{Zn}^{\text{II}}, \text{Cu}^{\text{II}}$ e Ni^{II} .

Os complexos contendo pontes do tipo μ -acetato, apresentaram um comportamento similar aos complexos FeZnOH e FeCuOH, além da determinação de um pKa intermediário em torno de 6,0, associado a hidrólise da ponte μ -acetato para formação de uma ponte μ -hidróxido. Estudos potenciométricos mostram que o complexo FeZnOH apresenta dois prótons tituláveis, com valores de pKa = 4,66 e 8,25 que correspondem, respectivamente, a desprotonação de duas moléculas de água ligadas aos sítios de Fe^{III} e Zn^{II}. O mesmo comportamento foi observado para o complexo FeCuOH, para o qual foram obtidos valores de pKa = 5,23 e 7,82 (Figura 14).^[19, 56, 57]

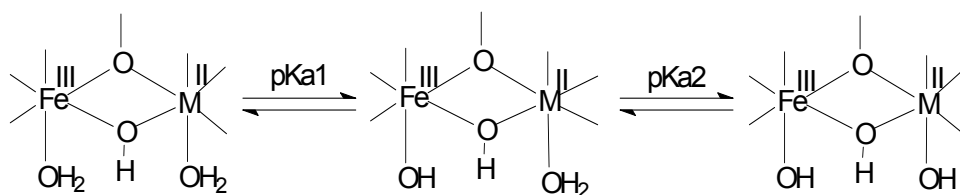


Figura 14. Proposta para os equilíbrios observados para complexos $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$ em solução, onde $\text{M}^{\text{II}} = \text{Zn}^{\text{II}}, \text{Cu}^{\text{II}}$.

3.1.2- Complexos FeCuOH e FeCuOAc

Os complexos de fórmula molecular $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$, foram sintetizados pelo Doutor Maurício Lanznaster (Figura 15).^[19, 56, 59] Os complexos contendo Cu como M^{II} apresentam-se como modelos biomiméticos de Fosfatase Ácida Púrpura de Feijões do Tipo “Red Kidney Bean”.^[45, 56, 59]

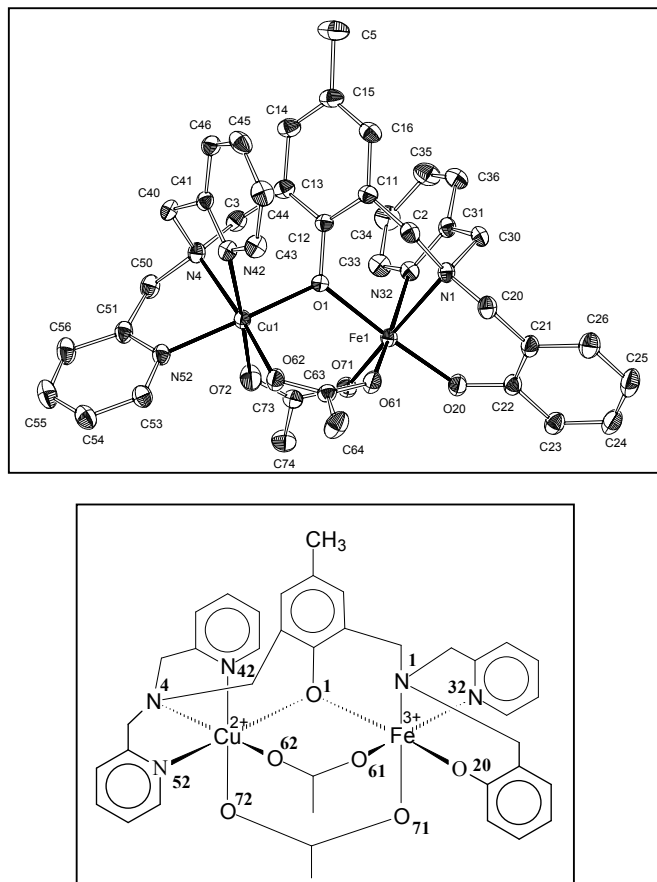


Figura 15. ORTEP e desenho esquemático para o cátion $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OAc})_2]^+$.

3.1.3- Complexo FeNiOAc

O complexo FeNiOAc foi sintetizado pela Doutora Suzana Cimara Batista (Figura 16). Estudos de titulação potenciométrica mostraram as seguintes constantes de desprotonação pK_{a1} 5,3; pK_{a2} 6,8 e pK_{a3} 8,61. A proposta para os equilíbrios observados pode ser vista na Figura 13. A atividade catalítica sobre o substrato ativado 2,4-BDNPP foi máxima em pH 6,0.^[57]

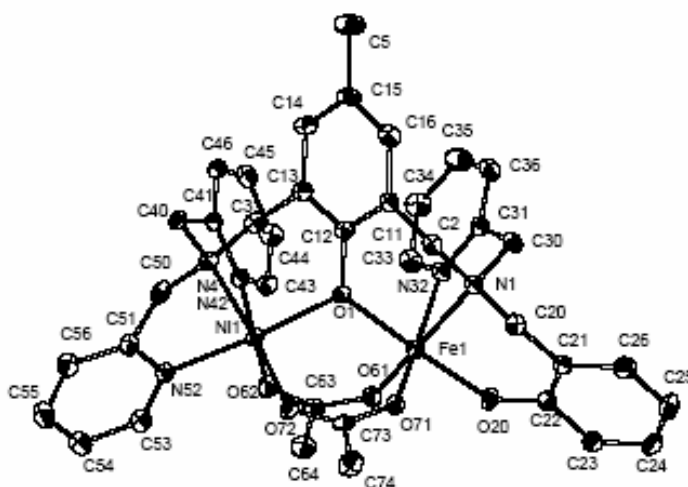


Figura 16. ORTEP para o cátion $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OAc})_2]^+$.^[57]

3.1.4- Complexo FeMnOH

O complexo de fórmula molecular $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$, foi sintetizado pelo Doutor Peter Karsten, como modelo biomimético para Fosfatase Ácida Púrpura de batata doce (comunicação pessoal Laboratório de Bioinorganica e Cristalografia-UFSC). Estudos anteriores com o complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ para demonstrar a atividade catalítica foram realizados experimentos com o substrato ativado 2,4-bis(dinitrofenil)fosfato. ^[45, 48, 63] Este complexo demonstrou uma atividade catalítica máxima em pH 6,7 e ainda foram determinados valores de pKa 5,8 e outro pKa 7,6, revelando que a reação depende da desprotonação da molécula de água coordenada nas espécies cataliticamente ativa (Figura 17).^[55]

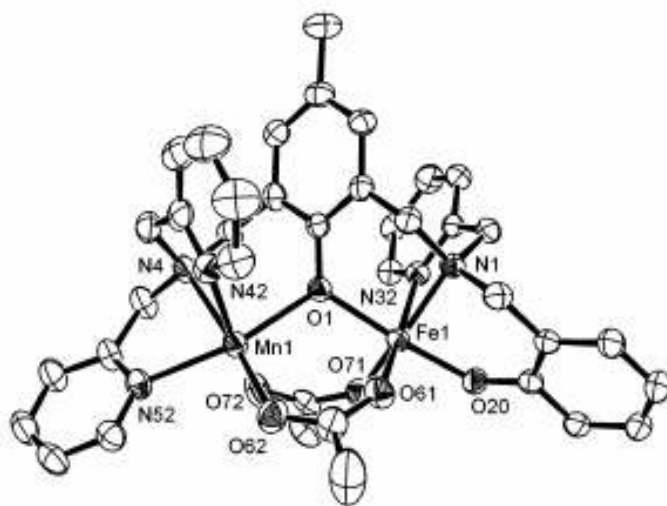


Figura 17. ORTEP para o cátion $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}\text{L1}(\text{OAc})_2]^+$.

3.2. MÉTODOS E INSTRUMENTAÇÃO

3.2.1. Preparação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o sistema comercial Concert High Purity Plasmid Purification System (Life Technologies) ou HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen) que utilizam a técnica de extração de DNA por lise alcalina. Foram seguidas as recomendações descritas pelo fabricante. As amostras foram observadas em gel 0,8 % (p/v). O DNA foi quantificado em um espectrofotômetro (Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience) e congelado até o uso.

3.2.2. Eletroforese em gel de agarose

Para as eletroforeses de DNA plasmidial, foram preparados géis de agarose de diferentes concentrações, podendo variar de 0,8 a 1%, utilizando agarose NA (Amersham Pharmacia) ou Agarose Ultrapure (Promega) e brometo de etídio para visualização do DNA (solução 10 mg/ml, concentração final no gel 3 µg/ml).^[64] A cada amostra de DNA, foi adicionado tampão de amostra (50 mM Tris pH 7,5, 50 mM EDTA, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01%), para aplicação no gel. Neste tampão o Tris tem a função de tamponamento; glicerol ajuda a dar densidade a amostra para que seja aplicada em um gel submerso; o azul de bromofenol, permite que a distância percorrida pela amostra durante a eletroforese seja monitorada a olho nu, uma vez que dá cor azul a amostra e o EDTA (agente quelante de metais) interrompe a reação e ajuda a preservar contra o ataque de nucleases.

As eletroforeses foram realizadas a 3 V/cm, em cubas horizontais (Mini Gel Electrophoresis System – Mupid2, Cosmo Bio Co ou na cuba Life Technologies 11x 14 cm), em tampão de corrida TBE 0,5x (TBE 10x: 0,89 M Tris pH 8,0; 0,89 M ácido bórico; 0,02 M EDTA).^[64]

Os géis foram visualizados e digitalizados num sistema de fotodocumentação DigiDoc.It System (UVP), composto por um transiluminador UV ($\lambda = 302$ nm) e uma câmara digital acoplada a um microcomputador. Em seguida foram analisados (quantificação das bandas resultantes) com o software LabWorks 4.0, UVP.

3.2.3. Teste de clivagem em diferentes pHs

Foram testadas, inicialmente as melhores condições para as reações de clivagem. Os valores de pH testados foram baseados nos dados de titulação potenciométrica dos complexos utilizados. O DNA plasmidial foi incubado com diferentes concentrações de complexo por um período de tempo fixo em diferentes condições de pH.

As amostras foram analisadas em gel de agarose e as bandas resultantes quantificadas.

3.2.4. Cinética de clivagem de DNA plasmidial

Para a reação foi utilizado o DNA plasmidial de pBSK II que foi incubado com concentrações variadas do complexo. A intervalos determinados de tempo foi retirada uma alíquota da mistura reacional, que foi adicionada a um tubo contendo tampão de corrida concentrado e então a amostra foi congelada (- 20°C). Posteriormente as amostras foram aplicadas em um gel de agarose 0,8%. Ao final da corrida as bandas foram visualizadas no sistema de fotodocumentação e as bandas referentes às

formas superenovelada, circular e linear do plasmídio quantificadas utilizando-se o programa LabWorks 4.0, UVP.^[4, 35, 65, 66]

O tratamento dos dados foi realizado através do método de Lineweaver-Burke para a obtenção da *constante catalítica* (k_{cat}) e *constante de Michaelis-Menten* (K_m), além do *fator catalítico*, definido pela razão entre a constante catalítica e a constante da reação não catalisada ($f = k_{\text{cat}} / k_{\text{não catalisada}}$), *eficiência catalítica* ($E = k_{\text{cat}} / K_m$) e *constante de associação* ($K_{\text{ass}} = 1 / K_m$).^[65]

3.2.5. Captadores de radicais livres

Alguns complexos metálicos, já descritos na literatura, clivam o DNA através de um mecanismo oxidativo no qual radicais hidroxilas são produzidos.^[67] Foram realizadas reações por tempo fixo, na presença de captadores de radicais livres, para verificar a presença de um provável mecanismo oxidativo. Foram utilizados DMSO e glicerol em concentrações variadas, e as amostras analisadas em gel de agarose e quantificadas, como já descrito.^[37, 68]

3.2.6. Reação em condições anaeróbicas

Em reações de clivagem de DNA por complexos metálicos, podem atuar tanto mecanismos hidrolítico como oxidativo. Para verificar o tipo de mecanismo envolvido nas reações de clivagem DNA, e de como a presença de oxigênio afeta a porcentagem de clivagem do DNA plasmidial foram realizados testes sob atmosfera de argônio.^[67]

Os tampões, água, solução de DNA e solução de complexo foram deaerados em uma bomba de vácuo, sob agitação. Após o processo, os reagentes colocados em câmara de polietileno ou “glove bags” com luvas

acopladas onde foi borbulhado Argônio por cerca de 1 hora. A reação foi preparada dentro da câmara, obedecendo às condições (tampão, pH) estabelecidas nas reações de clivagem para cada complexo. Foram utilizadas concentrações variadas do complexo. Os tubos lacrados, foram colocados em um dessecador selado e colocado em uma estufa a 37°C. Após a incubação por um tempo fixo, as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8%, como descrito anteriormente para reações na presença de oxigênio.^[38, 58, 69]

3.2.7. Espectrofotometria UV-Vis

A ligação através de intercalação, de complexos com a hélice de DNA tem sido caracterizada classicamente por titulações espectrofotométricas, acompanhando-se modificações na absorbância (hipocromismo) e de deslocamento no comprimento de onda (deslocamento para o vermelho).^[4, 70-72]

Para verificar como os complexos testados interagem com o DNA foram realizadas titulações com DNA de timo de bezerro (CT DNA) ou DNA plasmidial pBSK II. A reação foi preparada com tampão apropriado (determinado nos estudos cinéticos) e concentração fixa do complexo em uma cubeta, onde foram adicionadas quantidades crescentes de DNA. Após um minuto de cada adição foi feita a medida espectrofotométrica. Esta técnica permitiu, além de mostrar o tipo de interação, o cálculo da constante de associação intrínseca (K_b) do complexo com o DNA.^[57]

Neste experimento foi utilizado o espectrofotômetro Lambda-19 (Perkin-Elmer) no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, UFSC ou Ultrospec 2100 Pro (Amersham Bioscience) no Laboratório de Expressão Gênica para obtenção de espectros na faixa de 300 a 800 nm.^[36, 71, 72]

3.2.8. Teste com Distamicina

O entendimento preciso das propriedades de ligação de complexos metálicos ao DNA é importante por vários motivos, que incluem abordagem terapêutica, estudo da conformação de ácidos nucleicos e novas ferramentas para nanotecnologia.^[73] Estudos de interação com DNA/complexos ou fatores transcrição/DNA tem sido realizados utilizando Distamicina.^[74]

A Distamicina é um ligante específico do sulco menor do DNA (figura 18 A), pertence a uma classe de antibióticos de ocorrência natural que atuam como antivirais e antitumorais. É um dos agentes mais ativos e liga-se a dupla fita de DNA em regiões ricas em A/T, interagindo com o sulco menor e cobrindo de quatro a cinco bases (Figura 18 B).^[74, 75]

Para observar se a clivagem de DNA ocorre preferencialmente no sulco menor ou no sulco maior, a distamicina foi pré-incubada com o DNA plasmidial do pBSKII . Se a clivagem do plasmídeo ocorre através do sulco menor, com a adição do complexo, devido à presença da distamicina esta clivagem deve ser inibida.^[73, 76]

Reações de inibição foram realizadas com a incubação prévia do DNA plasmidial (50 μ M pb) com distamicina (100 μ M) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado o complexo e a reação foi incubada por 4 horas a 37 °C. Após este período, as amostras foram analisadas em gel de agarose e as bandas de DNA quantificadas.

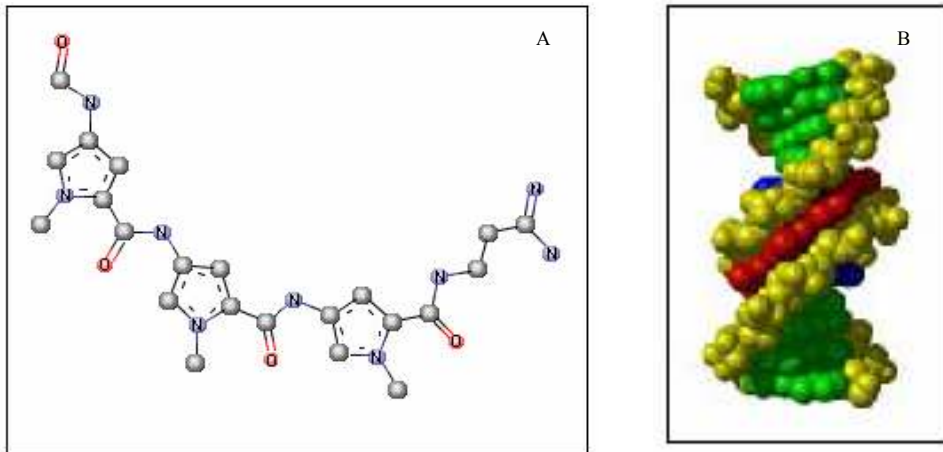


Figura 18. A: Estrutura Química da distamicina. B: Ligação específica da distamicina (vermelho) ao sulco menor do DNA (figura extraída do sítio:http://www.pharmacy.umaryland.edu/courses/PHAR531/lectures_old/fig/dna_fig8a.gif - acessada em 25/04/2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anteriormente à realização dos experimentos para clivagem de DNA pelos complexos metálicos, foram efetuados uma série de testes para verificar a solubilidade dos complexos. Devido a baixa solubilidade dos complexos em água, esta possibilidade foi descartada. Outros solventes como DMSO, Etanol foram capazes de solubilizar os complexos, no entanto, estes solventes poderiam interagir com a molécula de DNA interferindo nas reações. O DMSO poderia se ligar ao DNA, alterando sua conformação e o Etanol na concentração necessária para solubilizar o complexo impossibilitava a aplicação das amostras no gel de agarose, não fornecendo densidade suficiente para as amostras submergirem nos poços do gel.

Assim, como solvente foi utilizado acetonitrila em diferentes porcentagens nas reações pois além de não interagir com a molécula de DNA, segundo comunicação pessoal do Laboratório de Bioinorganica e Cristalografia, os complexos em concentrações pequenas, seriam solúveis em acetonitrila. Foi então padronizado para cada reação 25% (v/v) de acetonitrila, o que impossibilitou a utilização de concentrações maiores dos complexos. Abaixo da concentração de 25% os complexos precipitavam e em concentrações maiores (50 e 75%) as amostras ao serem aplicadas no gel de agarose não tinham densidade suficiente para entrar nos poços do gel. Desta forma, todas as reações realizadas neste trabalho contem 25% de acetonitrila.

4.1. Teste de clivagem em diferentes pHs e concentração do complexo

Para determinar as condições ideais para a reação de clivagem do DNA pelos complexos metálicos, foram testados diferentes pHs e concentração dos complexos.^[77]

A Figura 19 mostra o resultado obtido da clivagem do DNA plasmidial em pH 6,0, 6,5 e 7,0 pelo complexo FeCuOAc. Em pH 7,0 ocorre maior clivagem da Forma I (superenovelada), resultando em um aumento proporcional da Forma II (circular); porém não ocorre o aparecimento da Forma III (linear). Isto mostra que o complexo FeCuOAc corta somente uma das fitas do DNA gerando a perda do superenovelamento. Neste pH, segundo a curva de distribuição de espécies (Anexo 1), existe a maior porcentagem da espécie $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$. Já em pH 6 e 6,5 há uma diminuição na proporção desta espécie e conseqüente diminuição da atividade de clivagem do DNA.

Os testes com complexo FeCuOH mostraram que o corte de uma única fita de DNA ocorre de modo mais eficiente em pH 6,0 (Figura 20). Isto, segundo a curva de distribuição de espécies (Anexo 2), indica que a espécie, B $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, é responsável por esta atividade. Em pH 7,0 a atividade é bastante reduzida, o que pode indicar que nestas condições de reação já esteja ocorrendo uma diminuição da porcentagem da espécie B pela desprotonação da molécula de água ligada ao Cu^{II} .

Estes resultados corroboram o mecanismo proposto para estes complexos no qual o hidróxido ligado ao Fe^{III} deve atuar como nucleófilo durante a catálise.^[59]

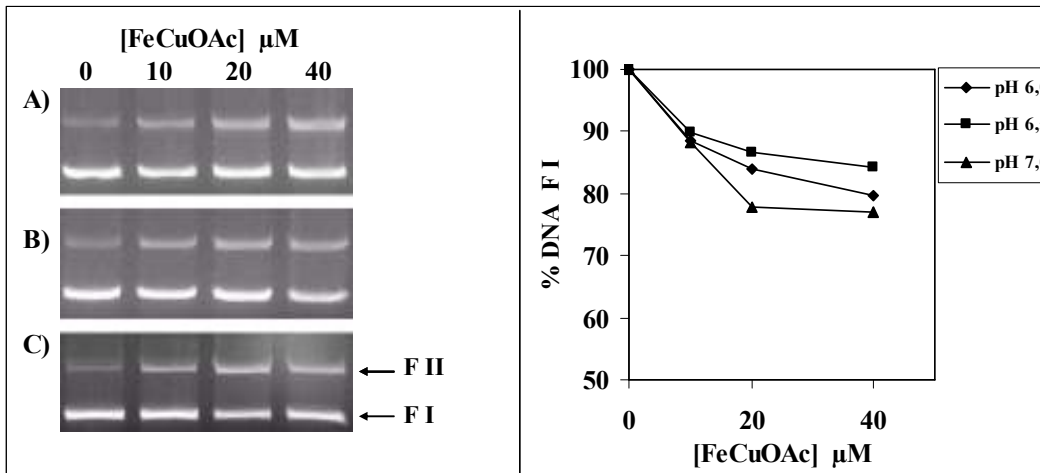


Figura 19. Clivagem do DNA pelo complexo FeCuOAc em diferentes pHs. As reações foram realizadas com 50 μM pb de plasmídio pBSK II por 6 horas a 37°C variando-se a concentração do complexo conforme indicado na figura. A) 25 mM PIPES pH 6,0; B) 25 mM PIPES pH 6,5 e C) 25 mM MOPS pH 7,0 . Ao lado, gráfico da quantificação da Forma I.

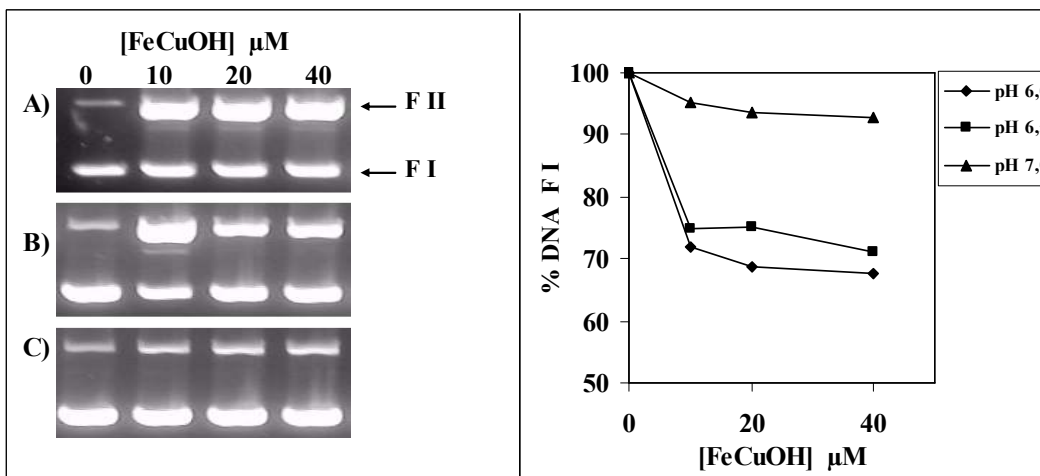


Figura 20. Clivagem do DNA em diferentes pHs pelo complexo FeCuOH. As reações foram realizadas no volume final de 20 μl, 50 μM pb de plasmídio pBSK II por 8 horas a 37°C variando-se a concentração final do complexo. A) 10 mM PIPES pH 6,0; B) 10 mM PIPES pH 6,5 e C) 10 mM PIPES pH 7,0 . Em pH 6,0 observa-se maior desaparecimento do DNA superenovelado (F I) como mostrado no gráfico ao lado.

Na Figura 21 estão as fotos dos géis de agarose mostrando as reações realizadas com o complexo FeZnOAc em diferentes pHs. Nesta figura a maior atividade de clivagem do DNA ocorre em pH 6,5 enquanto em pH 7,0 a atividade está bastante reduzida. Nos dois pHs, segundo a curva de distribuição de espécies (Anexo I) obtidas por Lanznaster, a espécie $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$ é predominante. ^[19]

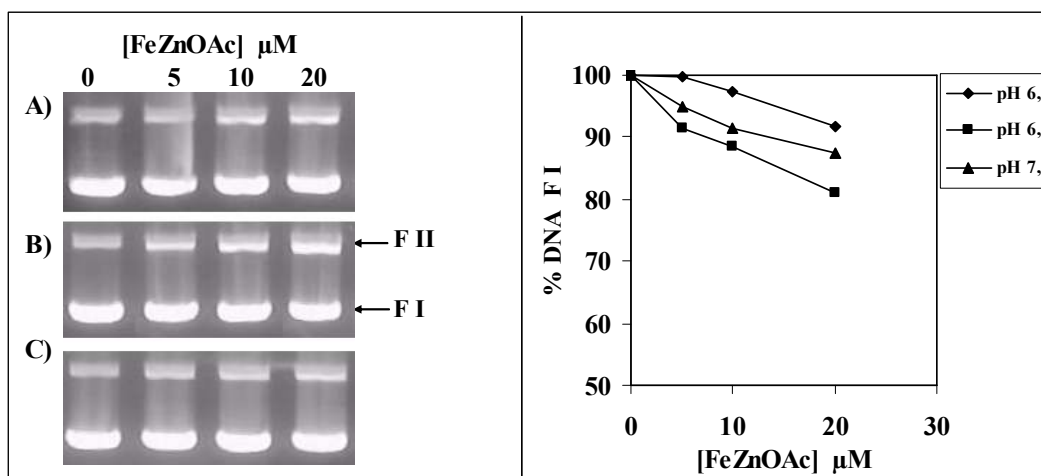


Figura 21. Clivagem do DNA em diferentes pHs pelo complexo FeZnOAc. As reações foram realizadas em volume final de 20 μl, com 50 μM pb de plasmídeo pBSK II por 6 horas a 37°C variando-se a concentração final do complexo. A) 10 mM PIPES pH 6,0; B) 10 mM PIPES pH 6,5 e C) 10 mM PIPES pH 7,0 . Ao lado, gráfico da quantificação das bandas da Forma I.

O complexo FeZnOH apresentou uma atividade maior em pH 6,5 (Figura 22), demonstrando que a espécie gerada $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$ (Anexo 2) é a mesma necessária para que ocorra a clivagem do DNA pelo complexo FeZnOAc. Este resultado está de acordo com os dados obtidos para os complexos de zinco testados previamente por Lanznaster na degradação do 2,4-BDNPP. ^[19, 56]

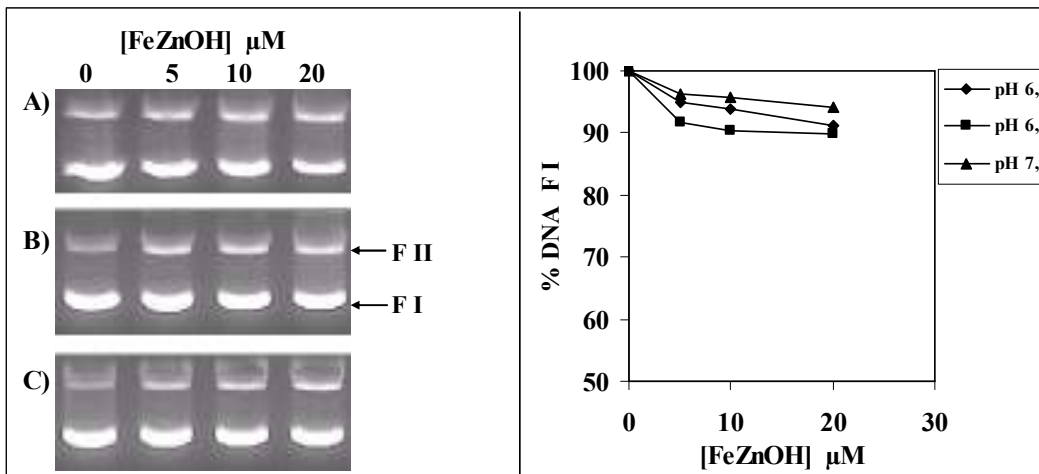


Figura 22. Clivagem do DNA em diferentes pHs pelo complexo FeZnOH. As reações foram realizadas com 50 μM de plasmídeo pBSK II por 6 horas a 37°C variando-se a concentração do complexo. A) 10 mM PIPES pH 6,0; B) 10 mM PIPES pH 6,5 e C) 10 mM PIPES pH 7,0 . Em pH 6,5 observa-se maior desaparecimento do DNA superenovelado (F I) .

Recentemente, Neves e colaboradores demonstraram que o complexo FeZnOH apresenta um mecanismo similar ao proposto para PAP onde o ataque nucleofílico é feito pelo OH terminal ligado ao Fe^{III}.^[78] No complexo modelo de PAP [Fe₂O(bipy)₄(OH₂)₂](NO₃)₄ descrito por Verge e colaboradores^[60] o nucleófilo proposto para degradação do BDNPP é o OH ligado ao Fe enquanto o substrato permanece coordenado Fe(OH₂). Além disso, é importante salientar que segundo a estrutura de Raio X obtida para a espécie ativa da enzima PAP de feijão vermelho tipo “kidney bean” a esfera de coordenação dos íons Fe e Zn resultou no sítio ativo (HO)Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(OH₂).^[45, 78]

A Figura 23 mostra os resultados dos testes de clivagem do DNA plasmidial em diferentes concentrações do complexo FeMnOH, variando o pH da reação. Neste experimento foram utilizadas as seguintes concentrações finais: 50 μM pb DNA pBSK II; 5, 10, 20 e 40 μM FeMnOH; 25 mM tampão (PIPES pH 6,0 e pH 6,5 e HEPES pH 7,0) a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 6 horas. Após a corrida em gel de agarose 0,8%, a diferença da intensidade das bandas mostra que em tampão HEPES pH 7,0 há uma atividade maior do complexo indicada pelo desaparecimento da Forma I do DNA plasmidial e aumento da Forma II (DNA circular).

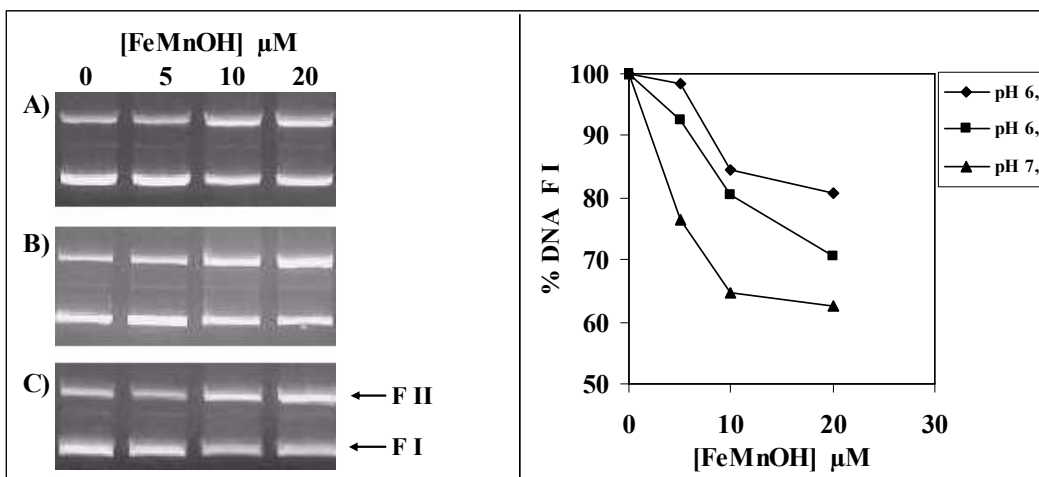


Figura 23. Teste de clivagem do DNA em diferentes pHs. As reações foram realizadas com DNA pBSK II por 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ variando-se a concentração do complexo. A) 25 mM PIPES pH 6,0; B) 25 mM PIPES pH 6,5 e C) 25 mM HEPES pH 7,0. O gráfico ao lado, representa a quantificação da bandas da Forma I.

Para o complexo FeMnOH não foi determinada a curva de distribuição de espécies, porém, como trata-se de uma forma isoestrutural em relação aos complexos anteriores, a atividade deste complexo está dentro da faixa de pH esperada.

Nas figuras 21, 22 e 23 pode ser observada a diminuição da intensidade da Forma I com um aumento proporcional da Forma II. Porém, assim como os complexos de FeCu, não foram observados o aparecimento da Forma linear do plasmídeo, indicando um único corte no DNA ou o segundo corte está ocorrendo muito distante do primeiro. Isto porque para que ocorra a passagem da Forma II (circular) para forma III (linear) é necessário que haja um segundo corte na fita oposta do DNA a uma distância de até 12 pares de base do primeiro corte.^[37]

Nos gráficos referentes à quantificação das bandas dos experimentos foi demonstrada a dependência da clivagem do DNA em função do aumento da concentração dos complexos. Para todos os complexos ocorre a diminuição da intensidade da Forma I conforme aumenta a concentração do complexo. As concentrações mostradas, correspondem às concentrações finais na reação.

Todos os complexos, exceto FeNiOAc, foram capazes de clivar o DNA em baixas concentrações em condições próximas as fisiológicas.

Os testes em diferentes pHs com o complexo FeNiOAc mostraram maior atividade em pH 6,5 (Figura 24) que segundo os dados da curva de distribuição de espécies (Anexo III) obtido por Batista e colaboradores^[57], corresponde a maior proporção da espécie $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})\text{Ni}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$. Este resultado sugere que a atividade depende da desprotonação da molécula de água coordenada ao Fe^{III} para que ocorra a interação com o DNA. Possivelmente a manutenção da ponte acetato seja um fator importante para a ligação com o DNA, já que em pH 7,0 onde há um aumento da espécie $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Ni}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$ ocorre uma diminuição da atividade.

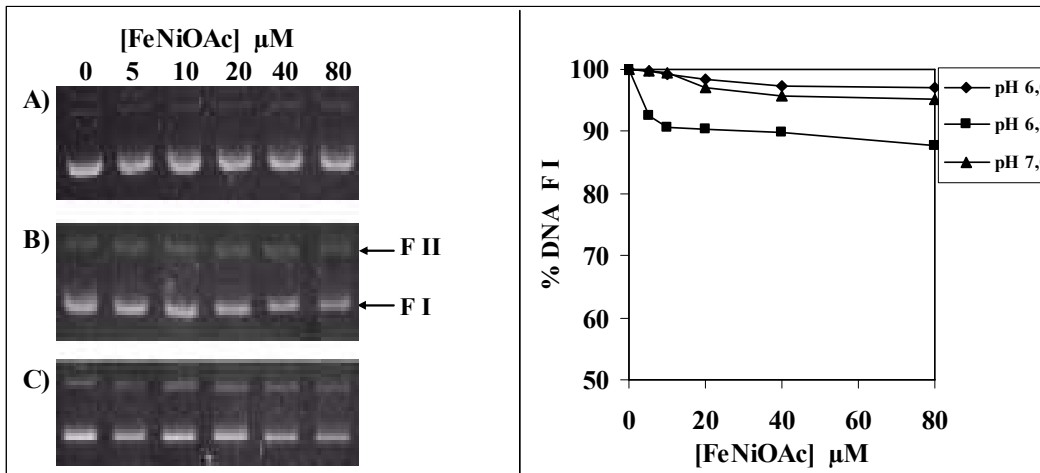


Figura 24. Teste de atividade do complexo FeNiOAc em diferentes pHs. As reações foram realizadas com 50 μM pb plasmídeo pBSK II por 16 horas a 37°C variando-se a concentração do complexo. A) PIPES 25 mM pH 6,0; B) PIPES 25 mM pH 6,5 e C) MOPS 25 mM pH 7,0 . Em pH 6,5 foi observado maior desaparecimento do DNA superenovelado (F I) mostrado no gráfico ao lado.

É importante ressaltar que apesar da diminuição da intensidade das bandas da Forma I, não ocorre o aparecimento proporcional da Forma II, indicando que algum outro tipo de interação está ocorrendo entre o complexo FeNiOAc e o DNA plasmidial.

4.2. Cinética de clivagem do DNA plasmidial

Após a determinação da melhor condição de pH para as reações foi testada a clivagem do DNA em função do tempo e da variação da concentração do complexo para obtenção dos parâmetros cinéticos da reação. As reações foram realizadas com excesso de complexo em relação ao substrato . O gráfico do logaritmo natural da intensidade da Forma I em um determinado tempo dividido pela intensidade da Forma I no tempo

inicial ($\ln S/S_0$) em função do tempo mostrou-se linear o que é indicativo de uma reação de pseudo-primeira ordem com relação ao DNA.

Os resultados de k_{obs} obtidos foram corrigidos levando-se em consideração a hidrólise espontânea do DNA plasmidial pBSK II para cada uma das condições de reação analisadas. As constantes de clivagem (k_{obs}) foram obtidas em várias concentrações e o gráfico de k_{obs} versus a concentração do complexo mostraram um comportamento de saturação exemplificado aqui pelos gráficos obtidos com os complexos FeCuOAc (Figura 25) e FeZnOAc (Figura 26).

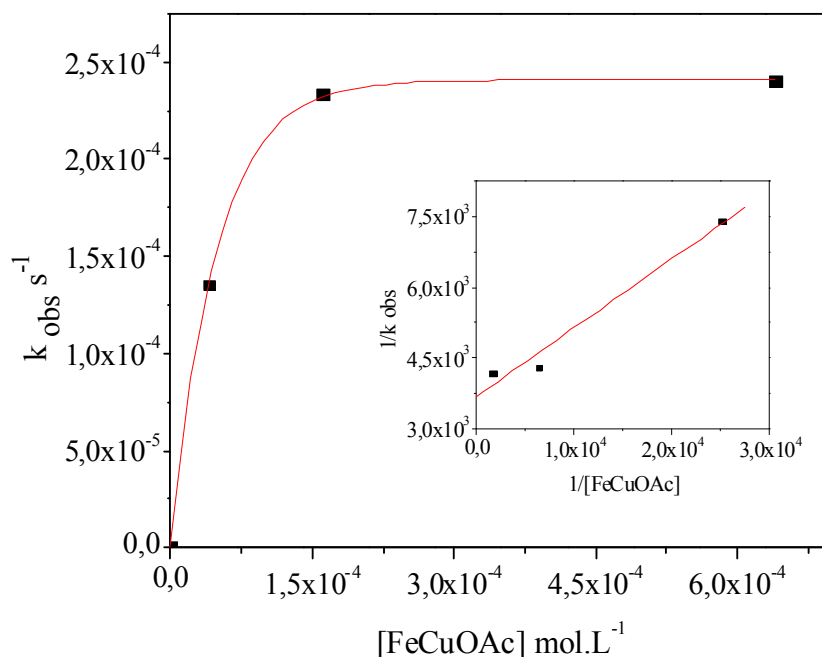


Figura 25. Análise cinética da clivagem do DNA promovida pelo complexo FeCuOAc. A concentração final do complexo variou de 10 a 160 μM . A reação foi realizada em 25 mM MOPS pH 7,0, 37 °C e o k_{obs} determinado para cada concentração.

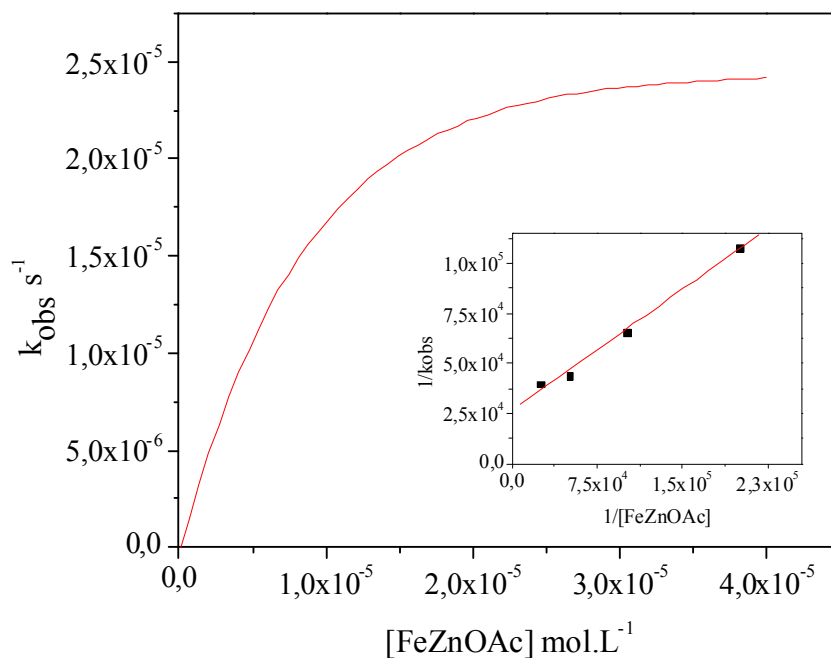


Figura 26. Análise cinética da clivagem do DNA promovida pelo complexo FeZnOAc. A concentração final do complexo variou de 5 a 40 μM . A reação foi realizada em 10 mM PIPES pH 6,5, 37 °C e o k_{obs} determinado para cada concentração.

Os estudos cinéticos da clivagem do DNA revelaram uma diminuição da intensidade da Forma I e sob estas condições experimentais (pseudo Michaelis-Menten) os parâmetros cinéticos foram obtidos. Na Tabela 2 estão apresentados os resultados dos parâmetros cinéticos obtidos para os complexos FeCuOAc, FeCuOH, FeZnOAc, FeZnOH e FeMnOH.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem do DNA, catalisada pelos complexos FeCuOAc, FeCuOH, FeZnOAc, FeZnOH e FeMnOH.

	FeCuOAc	FeCuOH	FeZnOAc	FeZnOH	FeMnOH
k_{obs}	$3,69 \times 10^3$	$4,08 \times 10^4$	$2,64 \times 10^4$	$1,59 \times 10^5$	$1,61 \times 10^4$
$k_{cat} \text{ s}^{-1}$	$2,71 \times 10^{-4}$	$2,45 \times 10^{-5}$	$3,79 \times 10^{-5}$	$6,30 \times 10^{-6}$	$6,19 \times 10^{-5}$
$k_{ass} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$	$2,53 \times 10^4$	$3,36 \times 10^4$	$6,79 \times 10^4$	$3,81 \times 10^4$	$1,53 \times 10^4$
$K_m \text{ mol L}^{-1}$	$3,96 \times 10^{-5}$	$2,98 \times 10^{-5}$	$1,47 \times 10^{-5}$	$2,63 \times 10^{-5}$	$6,55 \times 10^{-5}$
$E_{(k_{cat}/K_m)}$	6,80	0,825	2,57	0,240	0,945
$f_{(k_{cat}/k_{nc})}$	$2,7 \times 10^7$	$2,45 \times 10^6$	$3,79 \times 10^6$	$6,30 \times 10^5$	$6,19 \times 10^6$

Condições da reação incubada a 37 °C em alíquotas de 20 µl, concentração final foi:
 FeCuOAc: 90 µM pb DNA pBSK II; 25 mM MOPS pH 7,0; 10 a 320 µM [FeCuOAc];
 FeCuOH: 50 µM pb DNA pBSK II; 10 mM PIPES pH 6,0; 5 a 80 µM [FeCuOH];
 FeZnOAc: 50 µM pb DNA pBSK II; 10 mM PIPES pH 6,5; 5 a 80 µM [FeZnOAc];
 FeZnOH: 50 µM pb DNA pBSK II; 10 mM PIPES pH 6,5; 5 a 80 µM [FeZnOH];
 FeMnOH: 50 µM pb DNA pBSK II; 25 mM HEPES pH 7,0; 2,5 a 40 µM [FeMnOH].

Conforme observado na Tabela 2, o complexo FeCuOAc é o mais efetivo na clivagem do DNA plasmidial entre os complexos da série analisados, apresentando uma aceleração de $2,71 \times 10^7$ vezes quando comparado com o valor do DNA não catalisado ($k_{nc} = 1,0 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$) podendo ser considerado um dos complexos modelos mais efetivos mimetizando a função de uma nuclease.^[35, 59, 61, 65] Em contraste, o complexo FeCuOH apresentou uma atividade muito menor, de aproximadamente 11 vezes, quando comparado com o homólogo FeCuOAc.

O mesmo comportamento foi observado para os complexos de FeZn, onde FeZnOH foi capaz de clivar o DNA com aceleração da reação de apenas $6,30 \times 10^5$ que é seis vezes menor que o obtido para o complexo FeZnOAc em relação a clivagem do DNA não catalisado. O complexo FeZnOH se mostrou o menos eficiente da série de complexos analisados neste trabalho. Porém ao compararmos os valores obtidos da constante catalítica dos complexos FeZn estes valores estão próximos as constantes obtidas por Boseggia e colaboradores^[79] para dois complexos de Zinco ($3,2 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$).

Interessante observar que em estudos realizados com o substrato 2,4-BDNPP foram encontrados resultados similares de atividade sendo o complexo FeCuOAc mais ativo que FeZnOAc.^[56, 59]

O complexo FeMnOH mostrou uma atividade intermediária quando comparado a seus homólogos isoestruturais FeCuOAc e FeZnOAc por outro lado entre os complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}\text{OH}$ foi o mais ativo.

Existe uma diferença considerável de atividade entre os complexos com FeCuOAc e FeZnOAc sugerindo que a composição do centro metálico é importante na determinação da velocidade da reação. Também quando comparados os valores de k_{cat} para os complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}\text{OH}$, o complexo FeMnOH cliva mais eficientemente o DNA que os complexos FeCuOH e FeZnOH, onde a atividade pode ser relacionada como $\text{Mn} > \text{Cu} > \text{Zn}$, indicando a influência do M^{II} na velocidade de reação. Segundo Schenk e colaboradores a enzima PAP com centro $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$ demonstra uma atividade catalítica maior que as isoformas FeZn, FeFe.^[47]

No entanto, ao compararmos a atividade entre os complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}\text{OAc}$ e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}\text{OH}$ é evidente que a atividade não está relacionada somente a composição do centro metálico, mas também com estrutura dos complexos que possuem pontes acetato (FeCuOAc e FeZnOAc) uma vez que, são mais ativos que os complexos homólogos (FeCuOH e

FeZnOH).^[80] Isto talvez seja devido a pequenas diferenças na estrutura entre os complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}\text{OAc}$ e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}\text{OH}$. Uma das hipóteses é que pode estar ocorrendo um deslocamento na curva de distribuição de espécies para os complexos $\text{Fe}^{\text{III}}\text{M}^{\text{II}}\text{OAc}$ nas condições testadas neste trabalho e a espécie envolvida na hidrólise do DNA ainda mantenha a ponte $\mu\text{-OAc}$. A presença da ponte OAc pode estar proporcionando uma maior “rigidez” ao centro metálico^[81] mantendo principalmente a orientação cis da água coordenada ao M^{II} e do OH (nucleófilo) ligado ao Fe^{III} .

No experimento de cinética da atividade do DNA pelo complexo FeNiOAc, as amostras foram analisadas em um gel de agarose mais concentrado (1% p/v) para possibilitar a melhor separação e a visualização das bandas de DNA circular (Forma II). Surpreendentemente foi observada uma diferença no padrão da migração do DNA superenovelado, com retardamento da migração da banda no decorrer do tempo (Figura 27). Desta forma não foi possível a quantificação das bandas de DNA para obtenção dos padrões cinéticos uma vez que não está ocorrendo clivagem do DNA

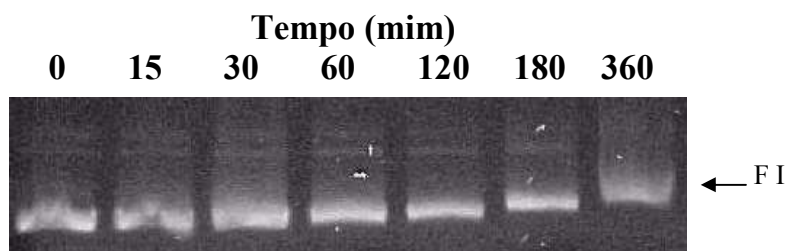


Figura 27. Cinética da atividade do complexo sobre o DNA plasmidial visualizada em gel de agarose 1%. A reação foi realizada com 100 μ M pb de plasmídio pBSK II a 37°C com 160 μ M de complexo em tampão 25 mM PIPES pH 6,5. A partir de 30 minutos de incubação observa-se uma diferença na migração da Forma I do plasmídio (F I).

Este padrão de migração, onde a banda da Forma I migra mais lentamente que o normal, que pode estar ocorrendo pela ligação do complexo com o DNA e já foi observado em uma série de complexos metálicos^[72, 79, 82] e drogas antitumorais^[27, 83] e antimicrobianas descritos na literatura. . Estudos envolvendo a atividade de íons Ni^{II} mostraram que este metal é capaz de ligar ao DNA alterando sua conformação de B para Z-DNA.^[84]

4.3. Teste de mobilidade e ligação do complexo FeNiOAc ao DNA

Com o intuito de verificar o tipo de interação entre o complexo FeNiOAc e o DNA plasmidial foi preparada uma reação com volume final de 240 μl (concentrações finais: 100 μM pb DNA, 320 μM FeNiOAc em tampão 25 mM PIPES pH 6,5). A reação foi incubada a 37 °C e a intervalos de tempo determinados (indicados na Figura 28) foram retiradas duas alíquotas de 20 μl cada. À primeira alíquota foi adicionado 5 μl de tampão de corrida e imediatamente congelada (Figura 28 A); outra alíquota de 20 μl , foi precipitada com acetato de amônia e etanol (Figura 28 B).^[85] Neste último tratamento, ao se adicionar um sal concentrado, se a interação entre os complexos e o DNA é fraca (tipo eletrostática) o complexo irá se dissociar do DNA.

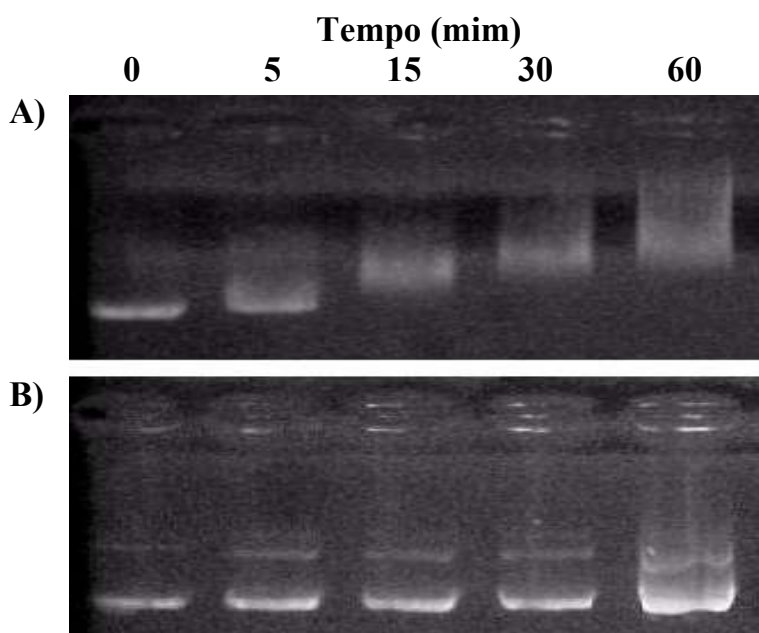


Figura 28. Teste de interação do DNA pBSK II com o complexo FeNiOAc. A) Gel de agarose 1% mostrando alíquotas retiradas por 1 hora observa-se a alteração na migração do DNA. B) Após a retirada de cada alíquota a amostra foi precipitada e o padrão de migração do DNA plasmidial restabelecido.

Observando o gel A fica evidente o retardamento da migração da banda da Forma I, como mostrado anteriormente. No gel B das amostras precipitadas o padrão de migração do DNA plasmidial é restabelecido sugerindo que a interação ocorra de modo não covalente.

Como não ocorreu diminuição na intensidade das bandas no gel B, podemos afirmar que o complexo FeNiOAc não é capaz de cortar o DNA plasmidial nas condições testadas. A diminuição da intensidade das bandas de DNA pode estar sendo ocasionada pela competição com a ligação do brometo de etídio presente no gel sugerindo um possível mecanismo de intercalação do FeNiOAc com o DNA.^[82, 86] Wang e colaboradores demonstraram que complexos de Ni competem ativamente com o brometo na ligação ao DNA.^[87]

Este fato também explicaria a alteração no padrão de migração das bandas do DNA, uma vez que no modelo de intercalação clássico ocorre um alongamento das hélices do DNA conforme os pares de bases são separados para acomodar o agente intercalante.^[72]

O brometo de etídio (Figura 29), por exemplo, um corante policíclico aromático, quando intercala no DNA dupla fita a intercalação alonga a hélice e altera a densidade de carga, alterando a mobilidade eletroforética.^[88] O brometo de etídio não é capaz de deslocar o complexo FeNiOAc do DNA apesar de possuir uma constante de ligação maior (Kb) como mostrado mais adiante na Tabela 3.

Mesmo não clivando o DNA, o complexo FeNiOAc se mostra promissor no que diz respeito a sua utilização como uma molécula capaz de se ligar ao DNA podendo ser utilizadas como sonda molecular para o estudo da estrutura de ácidos nucléicos.

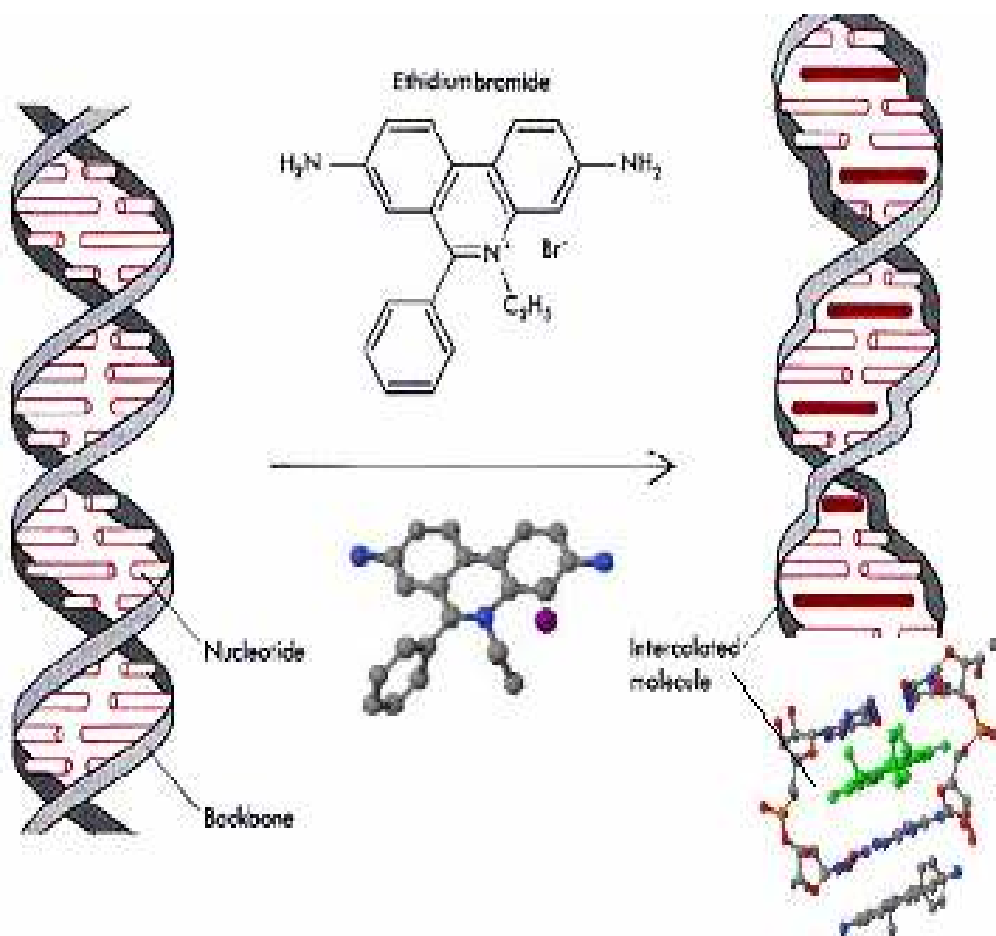


Figura 29. Estrutura e modo de ligação do Brometo de Etídio ao DNA.

4.4. Efeito de captadores de radicais livres

Como a participação de radicais livres na hidrólise do DNA por complexos metálicos têm sido constantemente documentada na literatura [7, 11, 67, 68, 89-94] para verificar o tipo de mecanismo (hidrolítico ou oxidativo) envolvido nas reações dos complexos analisados neste trabalho foram realizados experimentos na presença de captadores de radicais OH.

Nas Figuras 30 e 31 estão mostrados os resultados da clivagem do DNA pelos complexos FeCuOAc e FeCuOH, respectivamente. Os captadores de radical hidroxila, dimetil sulfoxido (DMSO) e glicerol não interferem com a atividade de clivagem dos complexos, sugerindo que radicais hidroxila difusos não estão envolvidos na reação de clivagem do DNA plasmidial.

Resultados semelhantes foram encontrados com os complexos FeZnOAc (Figura 32) e FeZnOH (Figura 33). Tanto o complexo FeZnOAc, quanto o complexo FeZnOH mantiveram as porcentagens de clivagem do DNA superenovelado na presença dos captadores de radicais livres. Isto sugere que os dois complexos atuem hidroliticamente na clivagem do DNA.

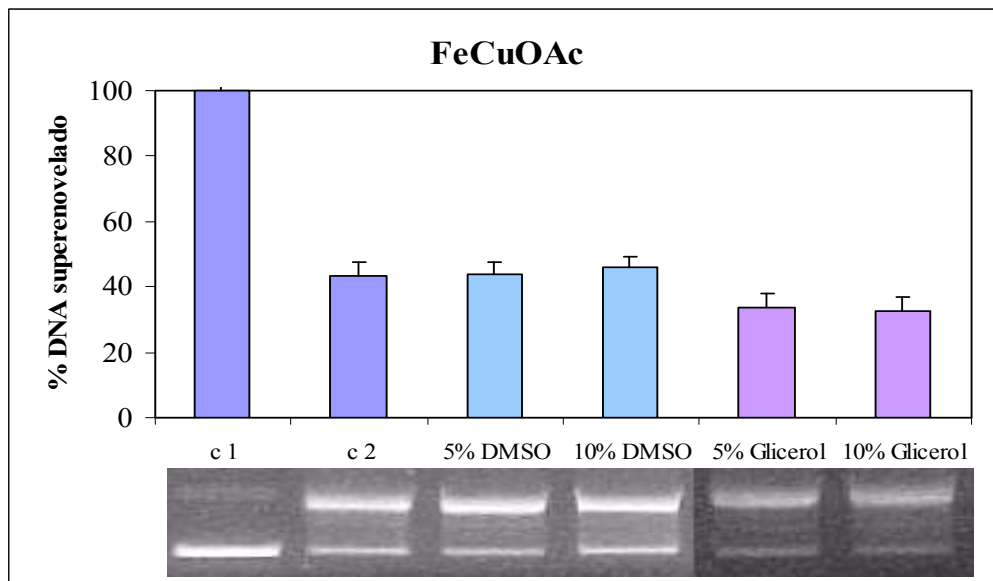


Figura 30. Experimento utilizando DMSO e Glicerol como captadores de radicais livres nas reações do complexo FeCuOAc. Foram utilizadas as concentrações de captadores indicadas na figura, controle de DNA sem o complexo (c1), controle com 80 μ M de complexo (c2) por 6 horas 37 °C. Abaixo, gel de agarose 0,8% do experimento.

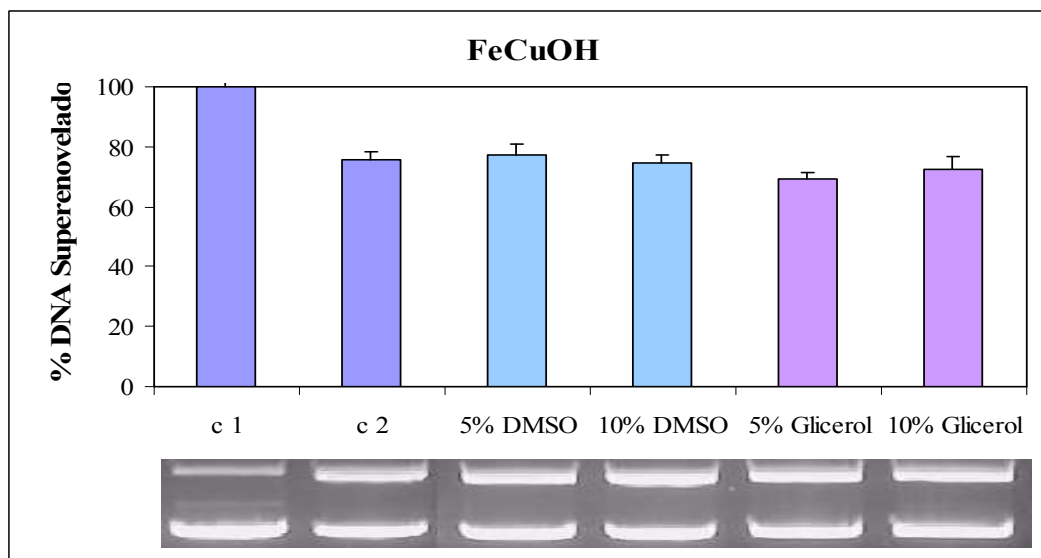


Figura 31. Experimento utilizando DMSO e Glicerol como captadores de radicais livres nas reações do complexo FeCuOH. Foram utilizadas as concentrações finais de captadores indicadas na figura, controle de DNA sem o complexo (c1), controle com 40 μ M de complexo (c2). As reações foram incubadas a 37 °C por 6 horas. Abaixo, gel de agarose 0,8% do experimento.

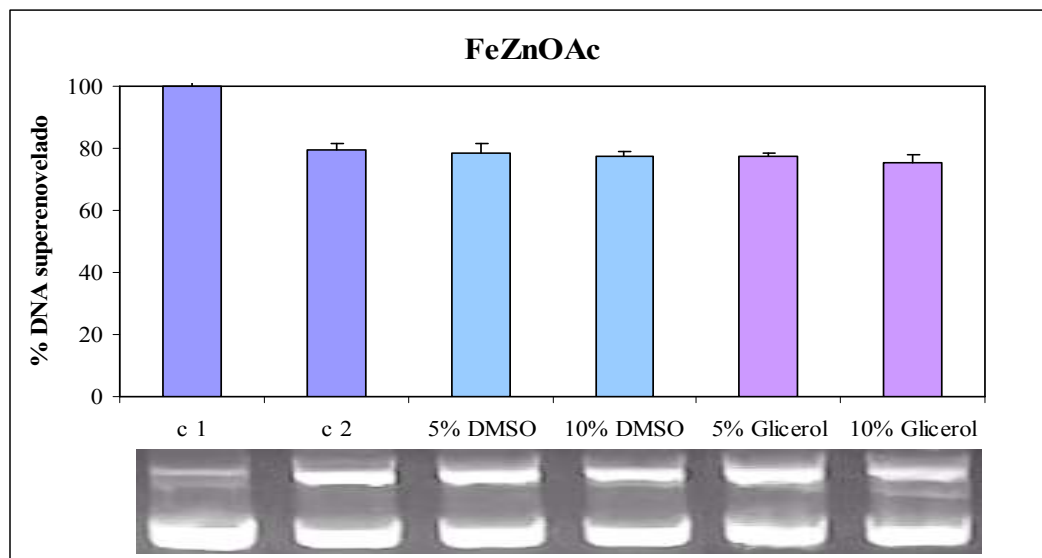


Figura 32. Experimento utilizando DMSO e Glicerol como captadores de radicais livres nas reações do complexo FeZnOAc. Foram utilizadas as concentrações de captadores indicadas na figura, controle de DNA sem o complexo (c1), controle com 20 μ M de complexo (c2) incubado por 4 horas 37 °C. Abaixo, gel de agarose 0,8% do experimento.

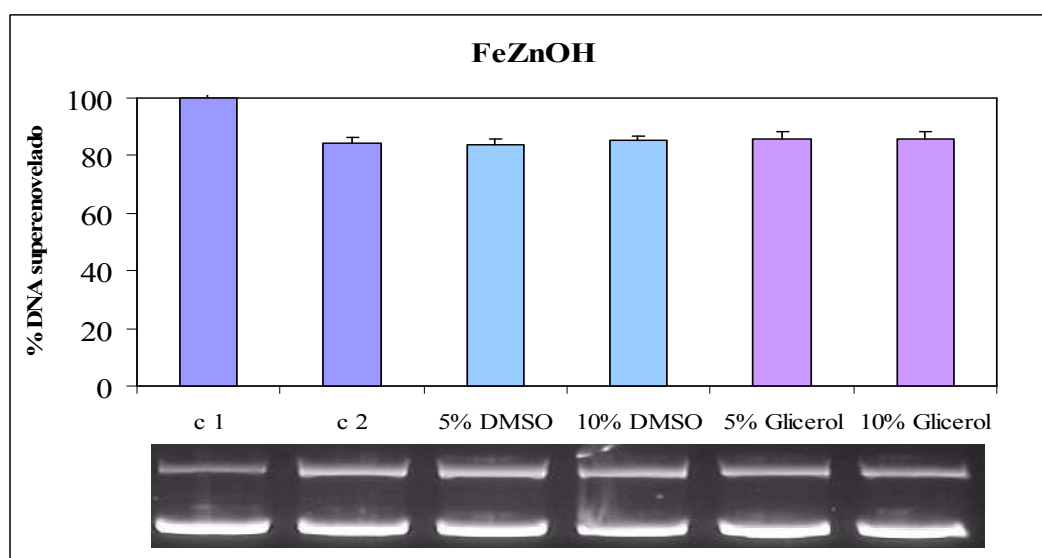


Figura 33. Experimento utilizando DMSO e Glicerol como captadores de radicais livres nas reações do complexo FeZnOH. Foram utilizadas as concentrações de captadores indicadas na figura, controle de DNA sem o complexo (c1), controle com 20 μ M de complexo (c2) incubado por 4 horas 37 °C.

A ligação do DNA ao complexo FeNiOAc não é afetada pela adição de captadores de radicais livres, como mostra a Figura 34, onde é visível o desaparecimento da Forma I com um pequeno retardamento de migração. Esta redução da intensidade da Forma I do DNA no entanto se dá exclusivamente pela interação do complexo com DNA sem ocorrer corte nas fitas uma vez que não há aparecimento da Forma II ou III como já demonstrado em experimentos anteriores.

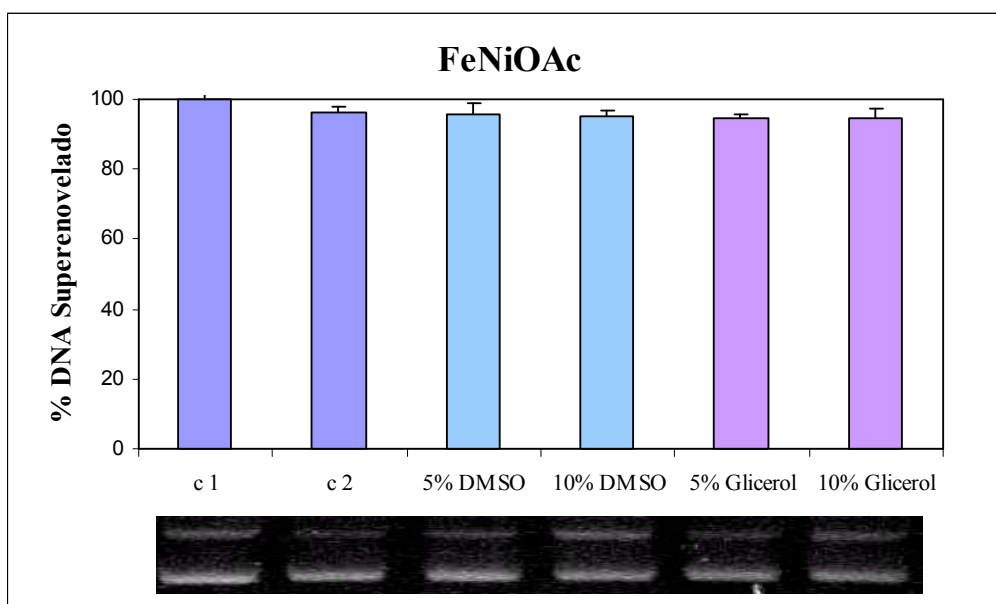


Figura 34. Experimento utilizando DMSO e Glicerol como captadores de radicais livres em reações com o complexo FeNiOAc. Foram utilizadas as concentrações de captadores indicadas na figura, controle de DNA sem o complexo (c1), controle com 40 μ M de complexo (c 2). Abaixo, gel de agarose 0,8% do experimento.

4.5. Reação em condições anaeróbicas

Para confirmar que os complexos atuam na clivagem do DNA por um mecanismo hidrolítico e para demonstrar que não existe participação do oxigênio molecular, foram realizados testes em condições anaeróbicas e como controle foram realizadas reações semelhantes na presença de oxigênio. A possibilidade da presença de oxigênio residual sob condições anaeróbicas foi monitorada pela realização de experimentos paralelos com o sistema $\text{Fe}(\text{EDTA})^{-2}$ /ditiotreitol.^[89]

Os resultados obtidos com os complexos FeCuOAc e FeCuOH (Figuras 35 e 36, respectivamente) vêm confirmar os resultados do experimento anterior. Estes dois complexos devem atuar via mecanismo hidrolítico uma vez que não foram observadas alterações na clivagem do DNA quando comparados os valores obtidos na presença (linhas 2 e 5) e na ausência de oxigênio (linhas 8 e 11). A adição de DMSO nas reações não influenciou a clivagem do DNA pelos complexos como mostrado nas linhas (5 e 8).

Os controles realizados com o sistema $\text{Fe}(\text{EDTA})^{-2}$ /ditiotreitol (linhas 3, 6, 9 e 12) demonstram que não há presença de oxigênio residual uma vez que a degradação do DNA plasmidial foi totalmente inibida na ausência de oxigênio (linhas 9 e 11).

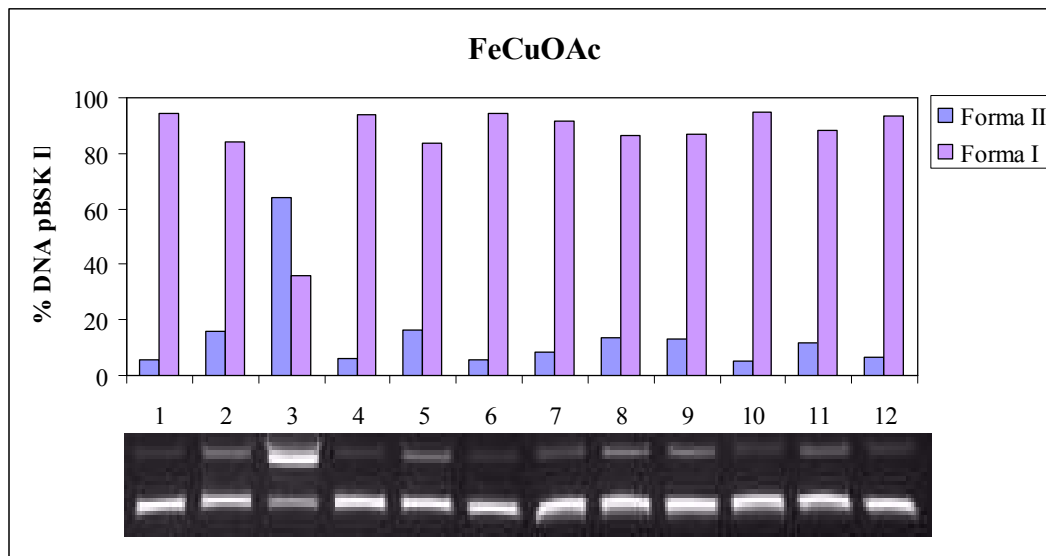


Figura 35. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeCuOAc em condições aeróbicas (linhas 1-6) e anaeróbicas (linhas 7-12); na ausência (1-3 e 7-9) e na presença (4-6 e 10-12) de DMSO. Linhas 1, 4, 7 e 10 DNA plasmidial; linhas 2, 5, 8 e 11 DNA na presença do complexo (40 μ M final); 3, 6, 9 e 12 na presença de Fe(EDTA)²⁻/ditiotreitól. Todas as reações foram incubadas a 37 °C por 4 horas.

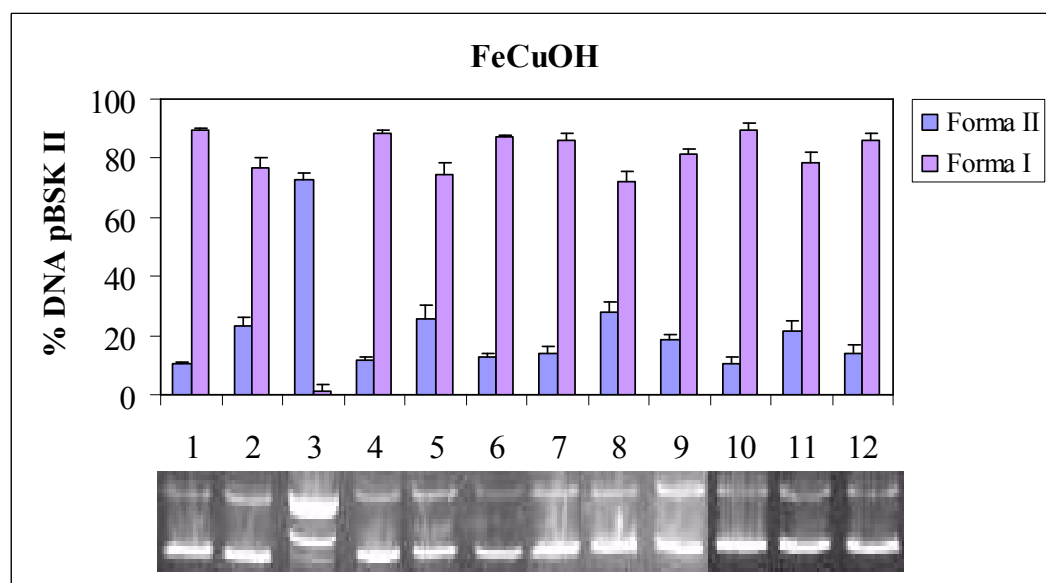


Figura 36. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeCuOH em condições aeróbicas (linhas 1-6) e anaeróbicas (linhas 7-12); na ausência (1-3 e 7-9) e na presença (4-6 e 10-12) de DMSO. Linhas 1, 4, 7 e 10 DNA plasmidial; linhas 2, 5, 8 e 11 DNA na presença do complexo (40 μ M final); 3, 6, 9 e 12 na presença de Fe(EDTA)²⁻/ditiotreitól. Todas as reações foram incubadas a 37 °C por 4 horas.

Nas Figuras 37 e 38 estão representados os gráficos obtidos da quantificação das bandas de DNA após a corrida em gel de agarose. Na presença de DMSO não ocorreu inibição da clivagem do DNA pelos complexos FeZn (linhas 5 e 11). Os complexos FeZn clivaram o DNA na ausência de oxigênio (linhas 8 e 11) praticamente na mesma proporção que o observado na presença de oxigênio (linha 2 e 5).

A degradação do DNA plasmidial observada pelo sistema $\text{Fe}(\text{EDTA})^{-2}$ /ditiotretitol na presença de oxigênio foi claramente reduzida em condições anaeróbicas.

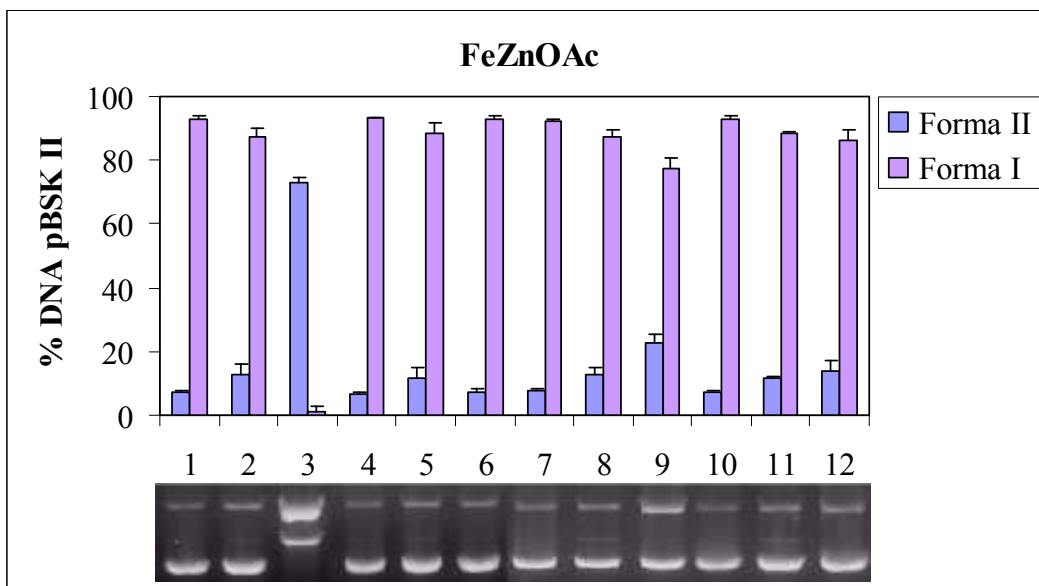


Figura 37. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeZnOAc em condições aeróbicas (linhas 1-6) e anaeróbicas (linhas 7-12); na ausência (1-3 e 7-9) e na presença (4-6 e 10-12) de DMSO. Linhas 1, 4, 7 e 10 DNA plasmidial; linhas 2, 5, 8 e 11 DNA na presença do complexo (10 μM final); 3, 6, 9 e 12 na presença de $\text{Fe}(\text{EDTA})^{-2}$ /ditiotretitol. Todas as reações foram incubadas a 37 °C por 4 horas.

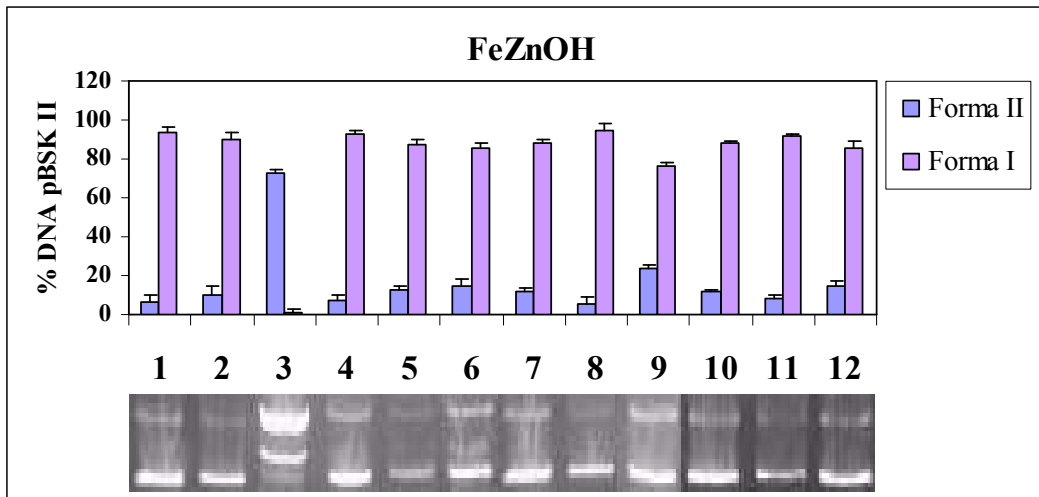


Figura 38. Clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeZnOH em condições aeróbicas (linhas 1-6) e anaeróbicas (linhas 7-12); na ausência (1-3 e 7-9) e na presença (4-6 e 10-12) de DMSO. Linhas 1, 4, 7 e 10 DNA plasmidial; linhas 2, 5, 8 e 11 DNA na presença do complexo (10 μ M final); 3, 6, 9 e 12 na presença de Fe(EDTA)²⁻/ditiotreitól. Todas as reações foram incubadas a 37 °C por 4 horas.

O complexo FeMnOH, assim como os demais complexos da série, atua por um mecanismo hidrolítico conforme indicam os resultados mostrados na Figura 39. No experimento realizado na ausência de oxigênio (linhas 8 e 11) o aumento da intensidade da Forma II (circular) devido o corte de uma das fitas da Forma I (superenovelada) não apresentou diferença significativa quando comparado à mesma reação em condições aeróbicas (linhas 2 e 5).

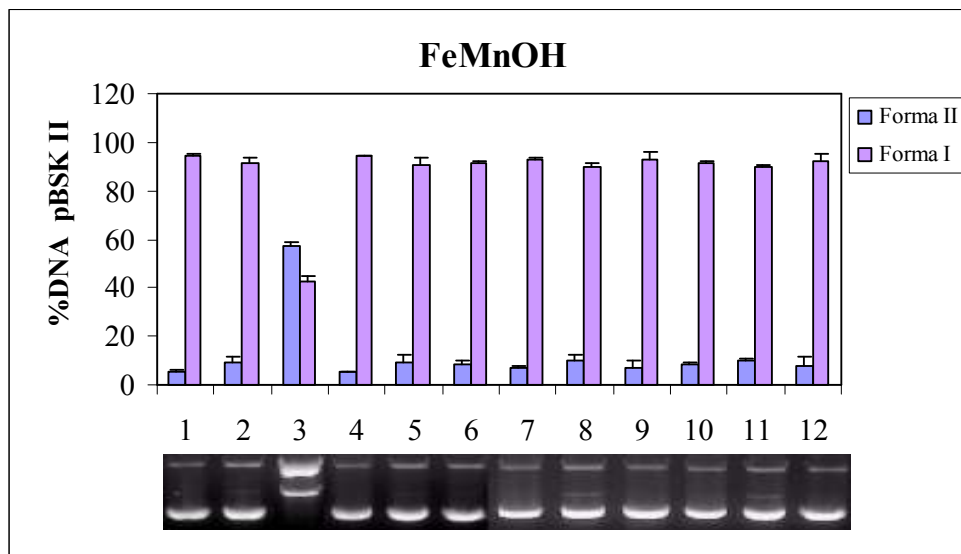


Figura 39. Clivagem do DNA plasmidial em condições aeróbicas (linhas 1-6) e anaeróbicas (linhas 7-12); na ausência (1-3 e 7-9) e na presença (4-6 e 10-12) de DMSO. Linhas 1, 4, 7 e 10 DNA plasmidial; linhas 2, 5, 8 e 11 DNA na presença do complexo FeMnOH (10 μ M final); 3, 6, 9 e 12 na presença de Fe(EDTA)⁻²/ditiotreitól. Todas as reações foram incubadas a 37 °C por 4 horas.

4.6. Espectrofotometria UV-Vis

A caracterização da interação de complexos metálicos com o DNA é uma área de pesquisa em crescimento. Além do potencial terapêutico, estes complexos têm sido considerados como ferramentas em bioquímica e biologia molecular. Os complexos metálicos são capazes de interagir (covalentemente ou não) com o DNA através das bases nitrogenadas e dos grupos fosfatos estabelecendo interações inter ou intra-fitas do DNA.^[26, 82, 95] Estas interações podem ser: por interação eletrostática externa, por interação direta do ligante através dos sulcos do DNA, intercalação ou através de ligações de hidrogênio dos ligantes coordenados ao átomo do oxigênio dos fosfatos do DNA e coordenação com íons metálicos.^[4, 29]

Para verificar o tipo de interação do complexo com o DNA foi realizada titulação espectrofotométrica dos complexos na presença de concentrações crescentes de DNA plasmidial.

A equação linear é dada por Pyle e colaboradores $[DNA]/(\epsilon A - \epsilon_{livre}) = [DNA]/(\epsilon_{ligado} - \epsilon_{livre}) + 1/Kb(\epsilon_{ligado} - \epsilon_{livre})$, onde ϵA , ϵ_{livre} e ϵ_{ligado} correspondem a $Abs_{observada}/[Fe^{III}M^{II}]$, ao coeficiente de extinção molar do complexo $Fe^{III}M^{II}$ totalmente livre ($R = 0$) e ao coeficiente de extinção molar do complexo $Fe^{III}M^{II}$ na forma totalmente ligada, respectivamente.^[7, 96] No gráfico de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) \times [DNA]$, a constante de ligação intrínseca Kb é dada pela razão entre o coeficiente angular e linear.^[7]

A Figura 40 mostra o espectro UV-Vis do complexo $FeCuOAc$ na ausência ($R = 0$) e na presença de concentrações crescentes de DNA plasmidial ($R = 0,59$ a $6,6$). A adição crescente de DNA ocasionou a diminuição da absorvidade molar da banda $p\pi - d\pi^*$ com um pequeno deslocamento de λ_{max} de 498 a 504 nm indicando uma forte ligação do

complexo ao DNA ($K_b 2,94 \times 10^4 M^{-1}$) possivelmente por um mecanismo de intercalação.^[26, 72]

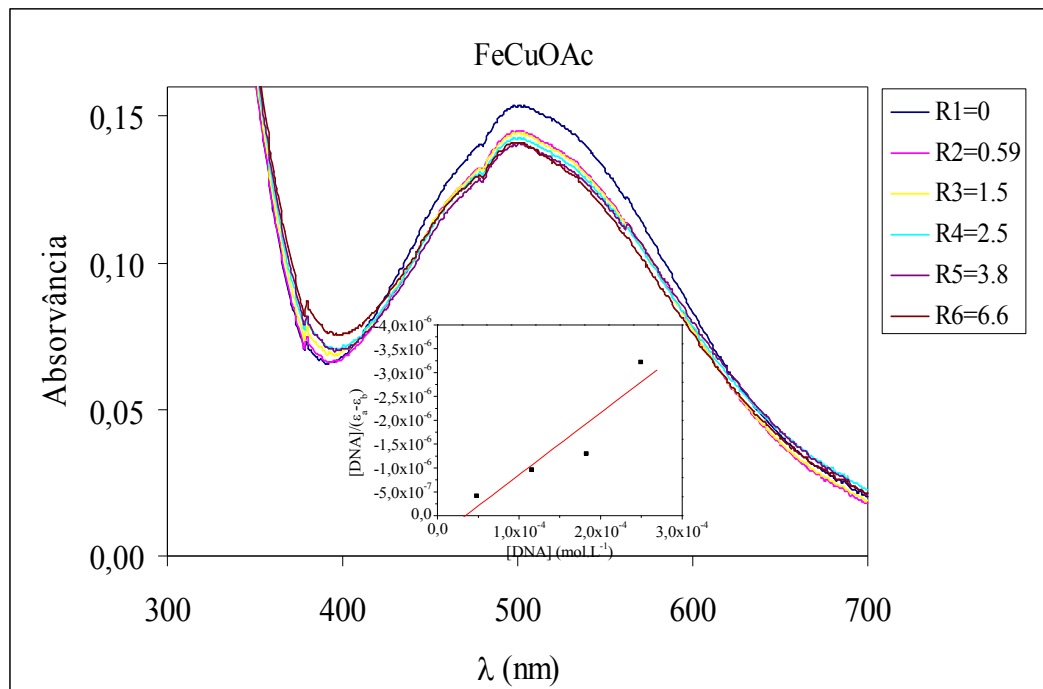


Figura 40. Titulação espectrofotométrica do complexo FeCuOAc com DNA plasmidial pBSK II. A figura mostra o espectro de absorção corrigido do complexo na ausência ($R=0$) e na presença ($R= 0.59$ a 6.6) de quantidades crescentes de DNA. Os valores de R correspondem a relação $[DNA]/[FeCuOAc]$, 25 mM MOPS pH 7,0 a temperatura ambiente com uma concentração do complexo de $80 \mu M$. Gráfico inserido na figura mostra a relação $[DNA]/(\epsilon_a-\epsilon_f) \times [DNA]$.

A análise da titulação espectrofotométrica do complexo FeCuOH (Figura 41) apresentou um deslocamento do λ_{max} (488 a 521 nm) e intensa diminuição da absorvidade molar característica de complexos intercalantes.^[97] O valor da constante de ligação foi quase o dobro ($4,4 \times 10^4 M^{-1}$) do valor para o complexo FeCuOAc . Além disso, ao serem adicionadas quantidades maiores de DNA na reação com FeCuOH o espectro mostrou um padrão irregular de absorção (dados não apresentados) tornando inviável a análise de valores de R maiores.

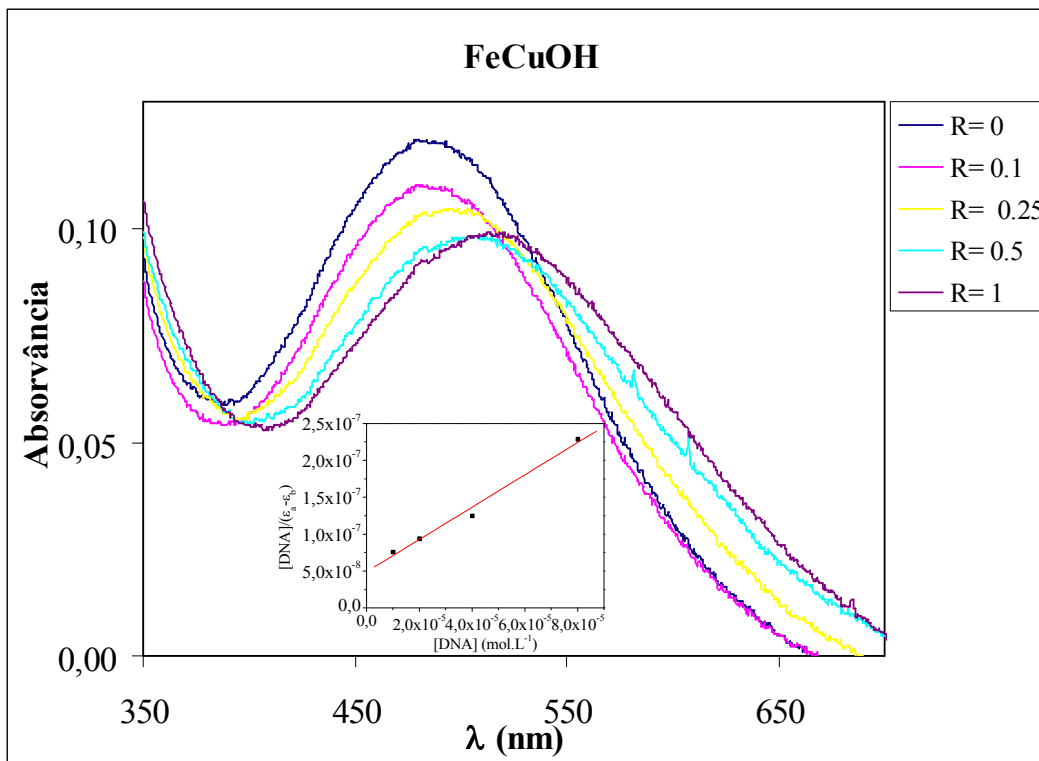


Figura 41. Titulação espectrofotométrica do complexo FeCuOH com DNA plasmidial pBSK II. A figura mostra o espectro de absorção corrigido do complexo na ausência (R=0) e na presença (R= 0.1 a 1) de quantidades crescentes de DNA. Os valores de R correspondem a relação $[DNA]/[FeCuOH]$, 25 mM PIPES pH 6,0 a temperatura ambiente com uma concentração do complexo de 80 μM . Gráfico inserido na figura mostra a relação $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) \times [DNA]$.

A absorção máxima do complexo FeNiOAc livre foi observada a 486 nm, após a adição de concentrações crescentes de DNA foi observada uma alteração significativa no espectro de absorção, resultando num deslocamento para o vermelho ($\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$) e no decaimento significativo da absorvidade molar (hipocromismo) (Figura 42).

A constante de ligação intrínseca de $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Tabela 3) e o deslocamento para o vermelho sugerem uma fraca interação do FeNiOAc com o DNA possivelmente por um mecanismo intercalativo envolvendo interação por empilhamento do fenolato aromático do complexo entre os

pares de base do DNA.^[29, 57, 72] Este resultado confirma que o retardamento da corrida da banda do DNA é devido a intercalação com o complexo FeNiOAc. Complexos metálicos contendo Ni em sua estrutura, que são capazes de intercalar com o DNA^[98] mesmo sem clivá-lo foram descritos recentemente.^[87, 99]

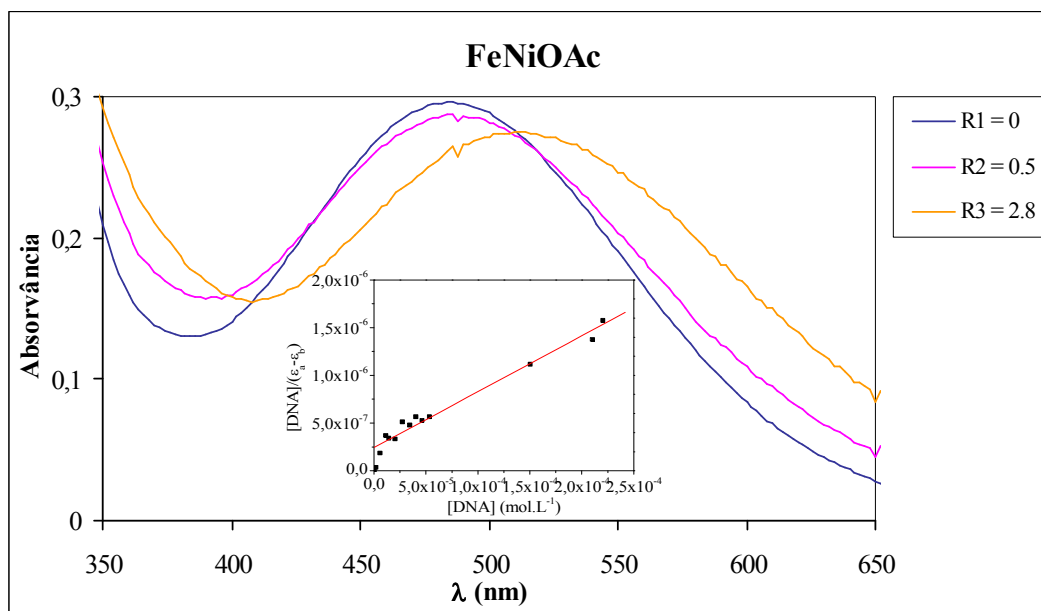


Figura 42. Espectro de absorvância corrigido do complexo FeNiOAc na ausência (R1) e na presença (R2 e R3) de concentrações crescentes de DNA plasmidial. Os valores de R correspondem a razão [DNA em pares de base]/[FeNiOAc]. A reação foi realizada em PIPES pH 6,5 a 37 °C e a concentração FeNiOAc foi 100 μM. Gráfico inserido na figura $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) \times [DNA]$

Nos experimentos com os complexos FeZnOAc, FeZnOH e FeMnOH foi demonstrado um comportamento diferente no espectro de absorção dos complexos anteriores. Em vez da diminuição da absorvidade molar houve um aumento (hipercromismo) e um pequeno deslocamento para a região do vermelho. Este padrão descrito para complexos de Cu^[8, 70] e em certas porfirinas^[100] porém não está bem esclarecido.

Na Figura 43, o espectro UV-Vis mostra as alterações provocadas no padrão de absorção do complexo FeZnOAc ($R=0$) à medida que foram adicionadas quantidades crescentes de DNA plasmidial ($R=0.0125$ a $R=1.5$). Um aumento na absorvidade molar (hipercromismo) deslocamento de 17 nm ($\lambda_{\max} = 492,5$ para 509,5 nm). Este perfil dos espectros de absorção também pode ser visto da Figuras 44 e 45 dos complexos FeZnOH e FeMnOH, respectivamente.

O valor da constante intrínseca de ligação do complexo FeZnOH de $7,0 \times 10^4$ foi o maior valor obtido para os complexos da série (Tabela 3). O complexo FeMnOH, como mencionado anteriormente, apresenta as mesmas alterações no espectro que os complexos FeZn. Como pode ser visto na Figura 45, o complexo FeMnOH apresentou um pequeno hipercromismo e o menor deslocamento do λ_{\max} (492 a 495) dos complexos da série refletindo no menor valor de K_b ($1,98 \times 10^4 M^{-1}$).

O comportamento observado na titulação espectrofotométrica dos complexos FeZnOAc, FeZnOH e FeMn pode indicar uma interação eletrostática ou de uma intercalação parcial do complexo no DNA.^[101] Mas como os valores de K_b obtidos para os complexos FeZn são os mais elevados pode estar ocorrendo os dois tipos de interação fortalecendo a ligação ao DNA.

Uma tabela comparativa dos valores da constante intrínseca de ligação dos complexos está mostrada na Tabela 3.

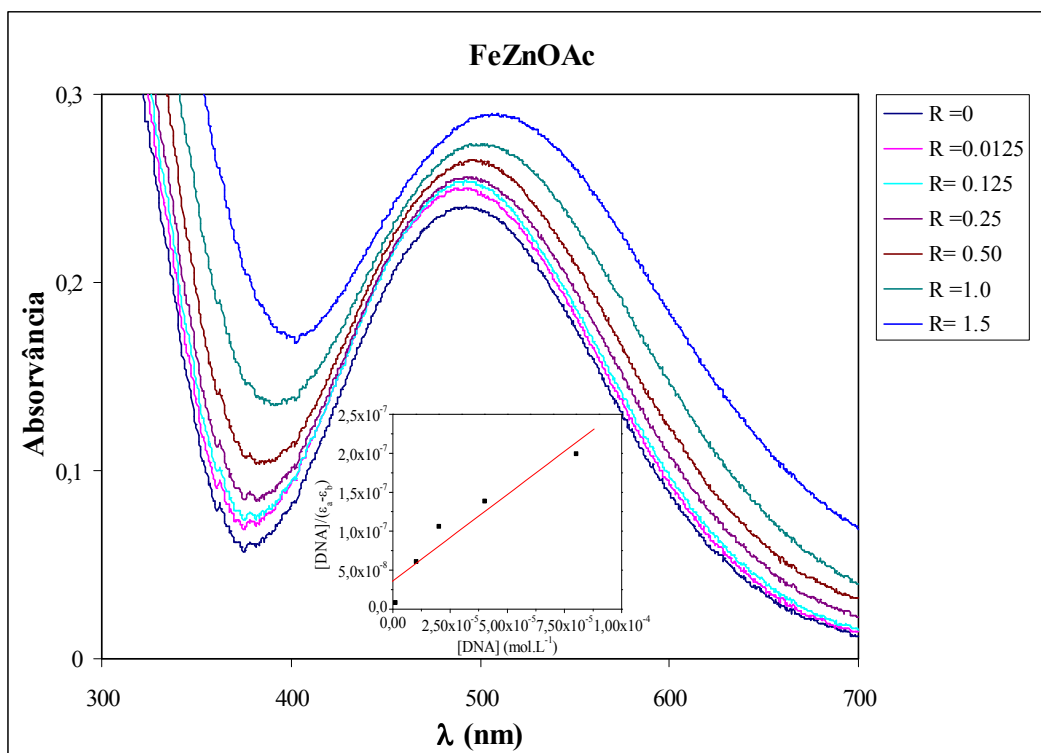


Figura 43. Espectro UV-Vis do complexo FeZnOAc com DNA plasmidial pBSK II. A figura mostra o espectro de absorção corrigido do complexo na ausência ($R=0$) e na presença ($R= 0.0125$ a 1.5) de quantidades crescentes de DNA. Os valores de R correspondem a relação $[\text{DNA}]/[\text{FeZnOAc}]$, 10 mM PIPES pH 6,5 a temperatura ambiente com uma concentração do complexo de $80 \mu\text{M}$. Gráfico inserido na figura mostra a relação $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) \times [\text{DNA}]$.

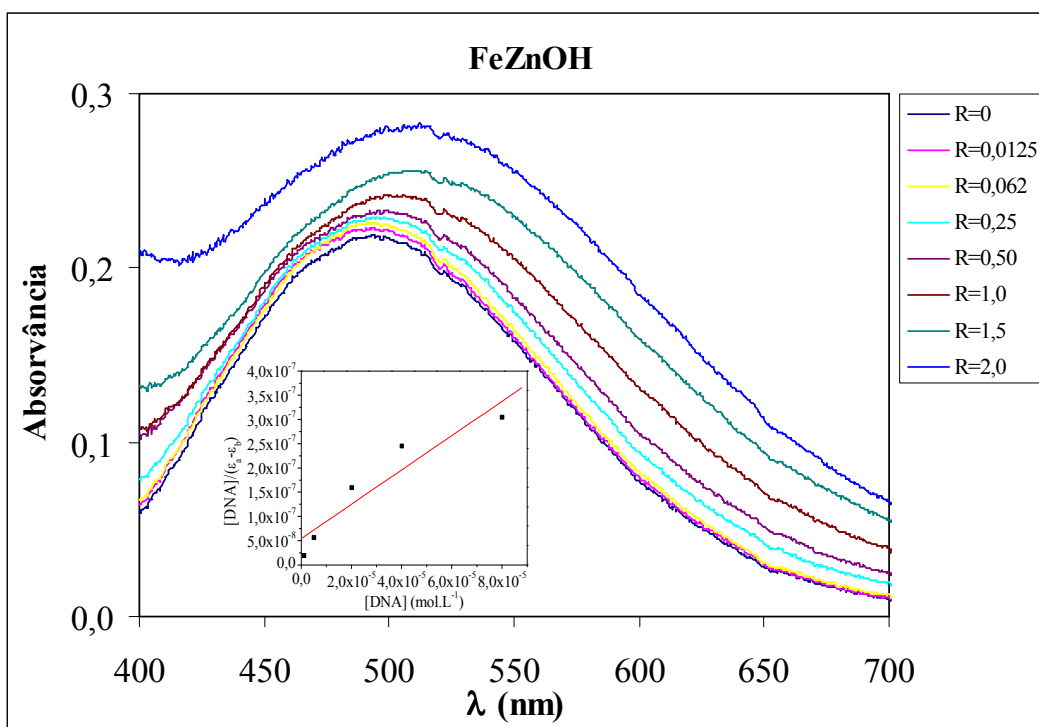


Figura 44. Titulação espectrofotométrica UV-Vis do complexo FeZnOH com DNA plasmidial pBSK II. A figura mostra o espectro de absorção corrigido do complexo na ausência ($R=0$) e na presença ($R= 0.0125$ a 2) de quantidades crescentes de DNA. Os valores de R correspondem a relação $[DNA]/[FeZnOH]$, 10 mM PIPES pH 6,5 a temperatura ambiente com uma concentração do complexo de $80 \mu\text{M}$. Gráfico inserido na figura mostra a relação $[DNA]/(\epsilon_a-\epsilon_f) \times [DNA]$.

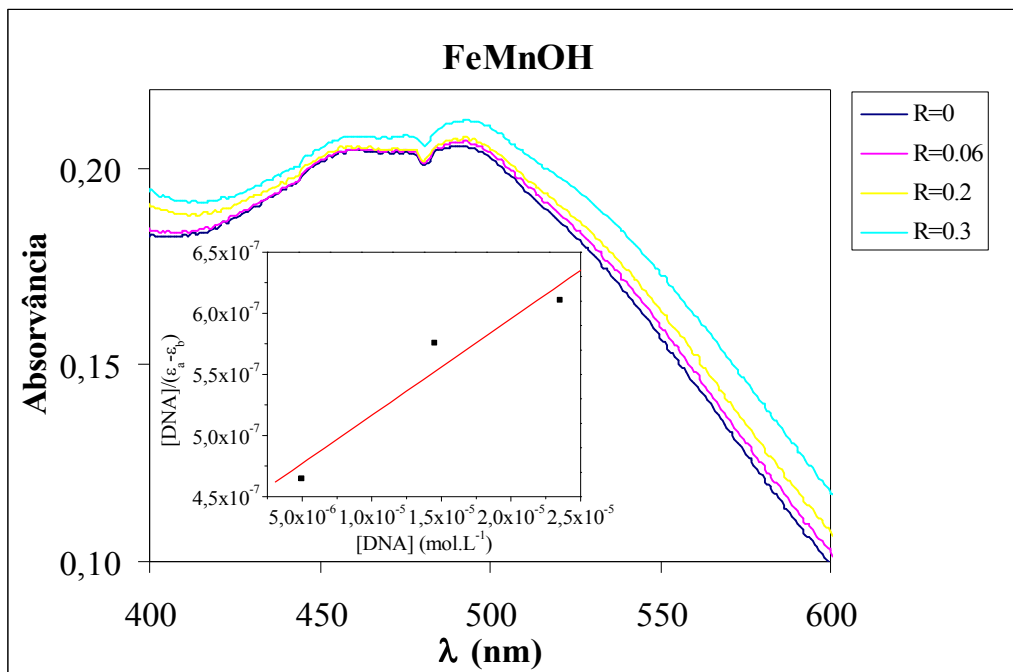


Figura 45. Titulação espectrofotométrica do complexo FeMnOH com CT-DNA. A figura mostra o espectro de absorção corrigido do complexo na ausência ($R=0$) e na presença ($R=0.06, 0.2$ e 0.3) de quantidades crescentes de CT-DNA. Os valores de R correspondem a relação $[DNA]/[FeMnOH]$, 25 mM PIPES pH 7,0 a temperatura ambiente com uma concentração do complexo de 80 μM . Gráfico menor inserido na figura $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) \times [DNA]$.

A diferença nos valores da força de ligação não reflete a diferença de atividade na clivagem do DNA demonstrada nas reações de cinética dos complexos FeCu. Supostamente o complexo com maior constante de ligação apresentaria maior atividade, mas neste caso ocorre o inverso: o complexo com maior K_b tem atividade menor (FeCuOH) comparado ao complexo de maior atividade da série (FeCuOAc) apesar de ambos os complexos apresentarem o mesmo centro metálico. O mesmo ocorre com os complexos FeZn pois complexo FeZnOH apesar de ter a maior constante de ligação da série de complexos apresentou a menor atividade frente a clivagem do DNA.

Este resultado só vem confirmar a idéia de que não somente o centro metálico influencia na reatividade, mas outros fatores devem estar envolvidos na hidrólise do DNA e que a força de ligação ao DNA não é determinante na eficiência de clivagem do DNA.

Os valores das constantes de ligação intrínseca encontradas para os complexos analisados apesar de serem menores que intercalantes clássicos como o brometo de etídio, apresentam ordem de grandeza similar ou superior quando comparados a outros complexos metálicos (Tabela 3).

Tabela 3. Constante de ligação intrínseca (K_b) e constante de associação cinética (K_{ass}) dos complexos metálicos $Fe^{III}M^{II}$ e comparação com outros compostos.

Complexo	$K_b M^{-1}$	$K_{ass} M$	Ref.
FeZnOH	$7,0 \times 10^4$	$3,81 \times 10^4$	*
FeZnOAc	$5,5 \times 10^4$	$6,79 \times 10^4$	*
FeCuOH	$4,4 \times 10^4$	$3,36 \times 10^4$	*
FeNiOAc	$3,0 \times 10^4$	-	*
FeCuOAc	$2,94 \times 10^4$	$2,53 \times 10^4$	*
FeMnOH	$1,98 \times 10^4$	$1,53 \times 10^4$	*
[Cu(II)(Hist)-(Tyr)]	$2,7 \times 10^2$	-	[96]
[Cu(II)(Hist)-Trp]	$2,2 \times 10^2$	-	[96]
Cu₂BMXD	$7,0 \times 10^5$	-	[8]
CuMFF	$1,5 \times 10^4$	-	[8]
[Ru(cyclam)(phi)].(ClO₄)₂	5×10^4	-	[72]
[Mn(Im)₆]^{II}	$4,44 \times 10^3$	-	[86]
Brometo de Etídeo	$7,0 \times 10^7$	-	[70]

*Complexos analisados neste trabalho

4.7. Teste com Distamicina

O tratamento do plasmídeo pBSKII com distamicina antes da adição dos complexos produziu diferentes conseqüências à clivagem do DNA.

Os complexos FeCu tiveram a atividade parcialmente inibida pela adição de Distamicina (Figuras 46 e 47). Como a inibição é parcial pode-se concluir que os complexos não se ligam preferencialmente ao sulco menor revelando pouca especificidade com relação ao local de ligação das moléculas de complexo ao DNA.

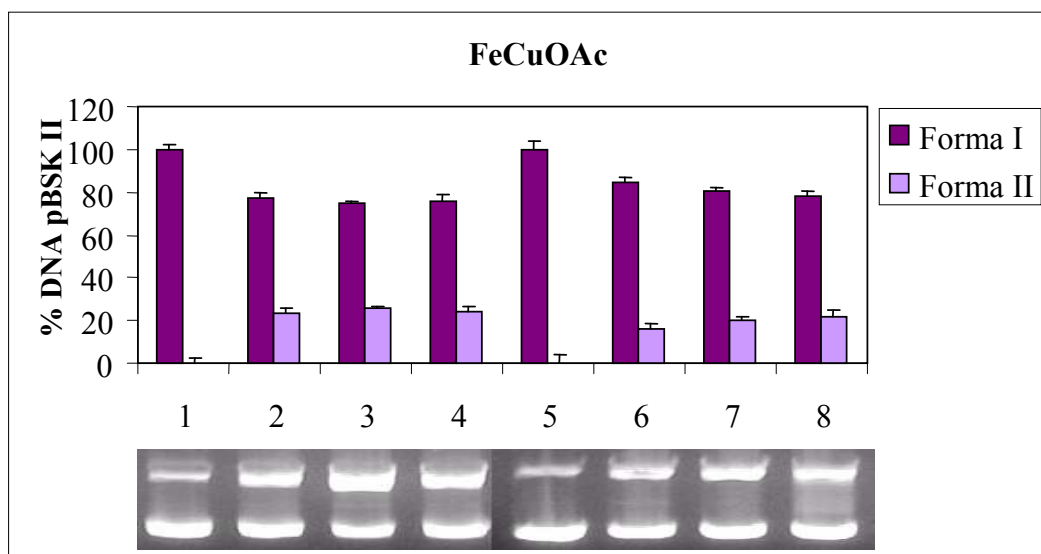


Figura 46. Teste de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo FeCuOAc na ausência (linhas 1-4) e na presença (linhas 5-8) do reagente intercalante Distamicina [50 μ M final]. Linha 1 e 5 controle com DNA pBSK II [50 μ M pb final]; linhas 2 e 6 DNA+ 10 μ M FeCuOAc; linhas 3 e 7 DNA+ 20 μ M FeCuOAc; linhas 4 e 8 DNA+ 40 μ M FeCuOAc. Todas as reações foram incubadas por 6 horas a 37 °C em 25 mM MOPS pH 7,0.

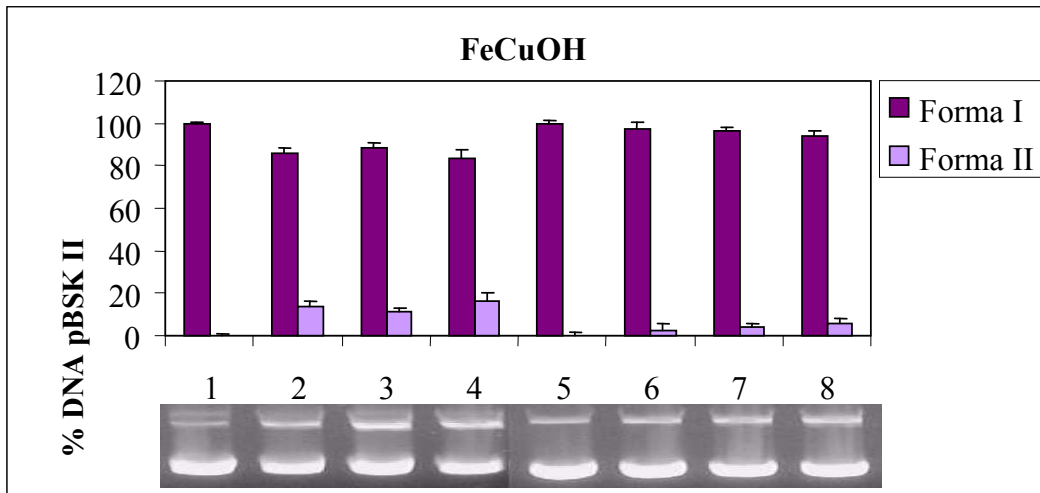


Figura 47. Teste de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo FeCuOH na ausência (linhas 1-4) e na presença (linhas 5-8) do intercalante Distamicina [50 μM final]. Linha 1 e 5 controle com DNA pBSK II [50 μM pb final]; linhas 2 e 6 DNA+ 10 μM FeCuOH; linhas 3 e 7 DNA+ 20 μM FeCuOH; linhas 4 e 8 DNA+ 40 μM FeCuOH. Todas as reações foram incubadas por 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ em 25 mM PIPES pH 6,0.

Nas Figuras 48, 49 e 50 estão mostrados os resultados dos géis e da quantificação das bandas de DNA (Forma I e II) dos experimentos com Distamicina para os complexos FeZnOAc, FeZnOH e FeMnOH. Nestes complexos pode ser observado um aumento significativo da atividade dos complexos quando o DNA é previamente tratado com a Distamicina.

Inicialmente poderia-se pensar que os complexos estão interagindo com o DNA pelo sulco maior, mas o mais provável é que a Distamicina ao se ligar ao sulco menor modifica a estrutura do DNA de tal modo que aumente a capacidade de ligação do complexo ao DNA.^[74, 76]

Isto demonstra que os complexos metálicos analisados interagem de maneira diversa no DNA, como já indicavam os resultados anteriores da titulação espectrofotométrica.

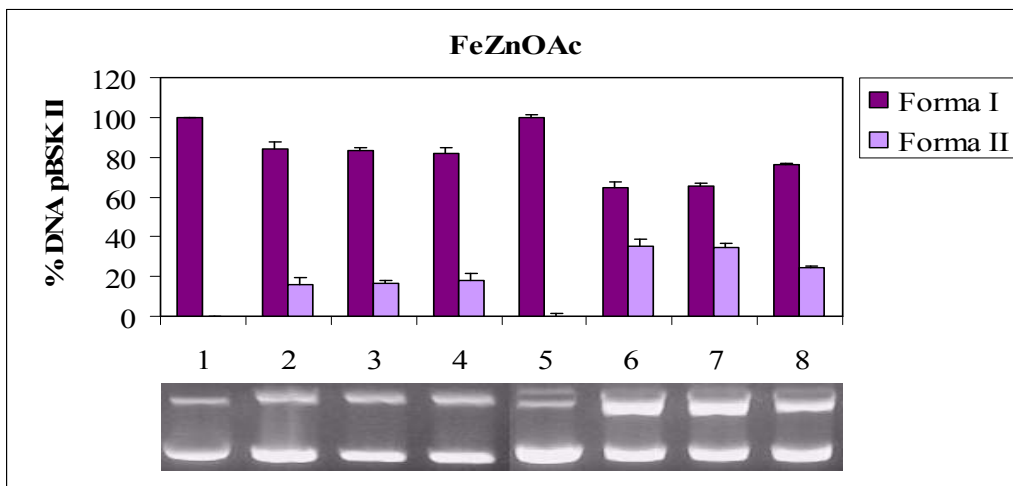


Figura 48. Estudo de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo FeZnOAc na ausência (linhas 1-4) e na presença (linhas 5-8) de Distamicina. Linha 1 e 5 controle com DNA pBSK II ; linhas 2 e 6 DNA+ 10 μ M FeZnOAc; linhas 3 e 7 DNA+ 20 μ M FeZnOAc; linhas 4 e 8 DNA+ 40 μ M FeZnOAc. Todas as reações foram incubadas por 6 horas a 37 °C em 10 mM PIPES pH 6,5.

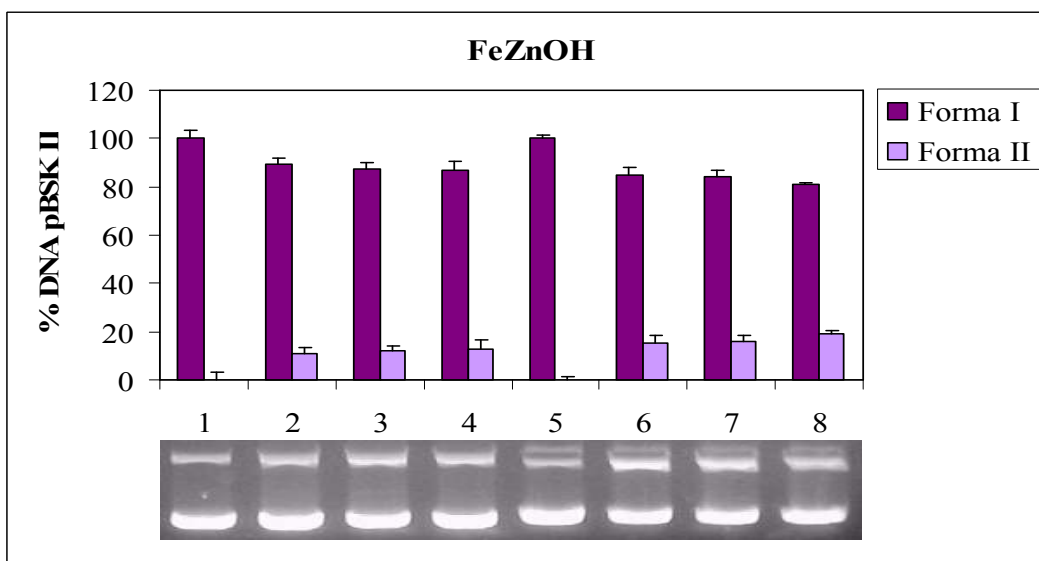


Figura 49. Estudo de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo FeZnOH na ausência (linhas 1-4) e na presença (linhas 5-8) de Distamicina [50 μ M final]. Linha 1 e 5 controle com DNA pBSK II [50 μ M final]; linhas 2 e 6 DNA+ 10 μ M FeZnOH; linhas 3 e 7 DNA+ 20 μ M FeZnOH; linhas 4 e 8 DNA+ 40 μ M FeZnOH. Todas as reações foram incubadas por 6 horas a 37 °C em 10 mM PIPES pH 6,5.

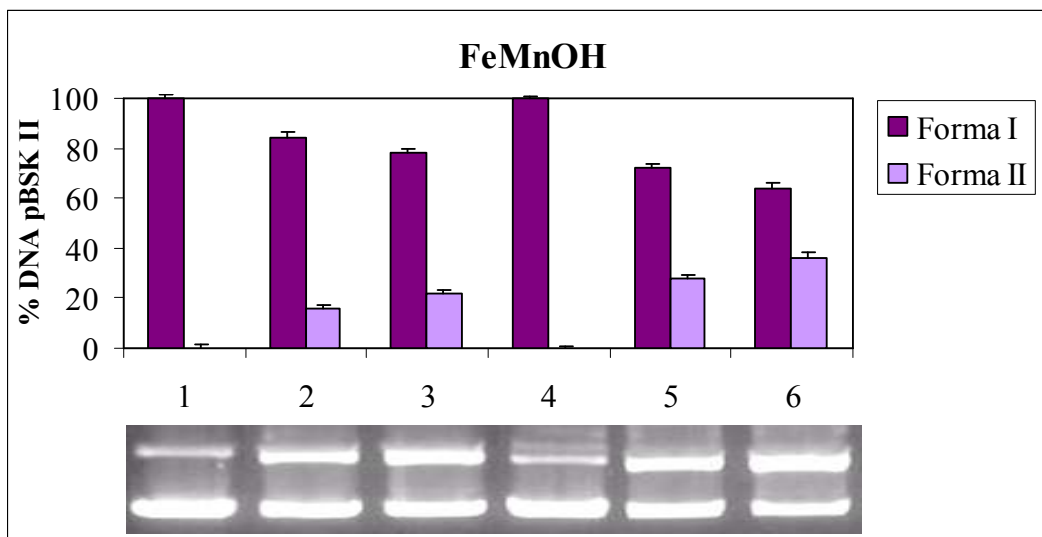


Figura 50. Análise de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo FeMnOH na ausência (linhas 1-3) e na presença (linhas 4-6) do reagente intercalante Distamicina [50 μM final]. Linha 1 e 4 controle com DNA pBSK II [50 μM pb final]; linhas 2 e 5 DNA+ 10 μM FeMnOH; linhas 3 e 6 DNA+ 20 μM FeMnOH. Todas as reações foram incubadas por 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ em 25 mM HEPES pH 7,0.

5. CONCLUSÕES

Desta série de complexos biomiméticos das PAPs os complexos FeCuOAc, FeCuOH, FeZnOAc, FeZnOH e FeMnOH, foram capazes de clivar o DNA plasmidial em condições próximas à fisiológica (variação de pH 6,0 a 7,0) a 37 °C em baixas concentrações dos complexos (a partir de 2,5 µM).

Os testes realizados na presença de captadores de radicais livres e na ausência de oxigênio indicam que todos os complexos atuam na clivagem do DNA através de um mecanismo hidrolítico.

O complexo FeNiOAc não foi capaz de hidrolisar o DNA, no entanto foi demonstrada sua habilidade em se ligar por intercalação com a molécula de DNA a ponto de alterar a migração da banda da Forma I.

Os testes cinéticos mostraram que o complexo FeCuOAc é o mais ativo da série na clivagem do DNA, seguido pelos complexos FeMnOH, FeZnOAc, FeCuOH e FeZnOH.

Os complexos FeMOAc são mais ativos que seus homólogos isoestruturais FeMOH. As diferenças na atividade dos complexos podem estar relacionadas não somente com os diferentes centros metálicos mas também com pequenas diferenças na estruturas dos complexos que apresentam a mesma composição do centro metálico.

Os complexos interagem com a molécula de DNA de modos distintos. Esta diferença de interação fica evidenciada nos resultados obtidos nos experimentos de titulação espectrofotométrica onde os complexos FeCuOH, FeCuOAc e FeNiOAc se ligam ao DNA de modo intercalativo clássico enquanto os complexos FeZnOAc, FeZnOH e FeMnOH se ligam ao DNA por interações eletrostáticas e/ou intercalação. O complexo FeZnOH tem o maior valor da constante de ligação $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}$, enquanto

para os demais complexos o valor desta constante decresce no sentido FeZnOAc, FeCuOH, FeNiOAc, FeCuOAc e FeMnOH.

Os testes com Distamicina ressaltam os comportamentos de interação diferenciados para os complexos, sendo que a atividade dos complexos FeZnOAc, FeZnOH e FeMnOH foi grandemente aumentada com adição previa da distamicina.

Os complexos FeCuOAc, FeCuOH, FeZnOAc, FeZnOH e FeMnOH, constituem uma série de complexos com grande potencial para serem utilizados como nucleases sintéticas.

6. PERSPECTIVAS

O potencial desta série de complexos estudos é imenso, mas ainda são necessários mais estudos para determinação do mecanismo de clivagem destes complexos com o DNA. Estudos com DNA linear dupla fita, linear simples fita, e polinucleotídeos deve ser realizado com o objetivo de verificar se existe especificidade por algum dos substratos.

A determinação dos sítios de clivagem também é importante que seja realizada. Tentativas iniciais de se determinar os locais de clivagem foram feitas com estes complexos utilizando-se sondas marcadas radiativamente, porém não foi possível determinar um local de clivagem específico. Experimentos de “Footpring” foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, e todos os complexos inibiram a clivagem do DNA linear dupla fita pela DNase I aleatoriamente na seqüência. Devem ser realizados testes em diferentes condições (pH, tampão, concentração de complexo) com outras sondas ou com DNA plasmidial marcado radiativamente.

A obtenção de cristais dos complexos ligados a pequenos nucleotídeos também é um dado importante que irá elucidar como estas moléculas interagem e determinar o possível mecanismo de ligação.

Testes iniciais com os complexos FeCuOAc e FeCuOH mostraram a capacidade destes complexos clivarem proteínas, enquanto que os complexos FeZnOAc, FeZnOH, FeMnOH e FeNiOAc não demonstraram tal habilidade. Os resultados não foram apresentados neste trabalho pois exigem que mais estudos envolvendo esta série de complexos metálicos e sua atividade frente a proteínas ou pequenos peptídeos deve ser investigada mais detalhadamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WATSON, J. D. e CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. **Nature**, v. 171, p. 737-738, 1953.
2. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. e COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. segunda ed.: São Paulo, Sarvier Editorade Livros Médicos,1995. 839 p.
3. BLACKBURN, G. M. e GAIT, M. J. **Nucleic Acids in Chemistry and Biology**.ed.: New York, Oxford University Press,1997. 528 p.
4. HÖRNER, R. **Estudo de compostos capazes de clivar o DNA**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 238 p., 2003.
5. RAO, B. K. S. e STEIN, R. First evidence on induced topological changes in supercoiled DNA by an aluminium D-aspartate complex. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 8, p. 823-830, 2003.
6. SERBAN, D.; BENEVIDES, J. M. e THOMAS, G. J. DNA secondary structure and Raman markers of supercoiling i Escherichia coli plasmid pUC 19. **Biochemistry**, v. 41, p. 847-843, 2002.
7. NAVARRO, M.; CISNEROS-FAJARDO, E. J.; FERNANDEZ-MESTRE, M.; ARRIECHE, D. e MARCHAN, E. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)₂]BF₄. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, p. 364-369, 2003.
8. OLIVEIRA, M. C. B. **Nucleases Sintéticas: Caracterização bioquímica e mecanismo de ação sobre DNA**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, Tese de doutorado em Química, 119 p., 2006.
9. BASHKIN, J. K. Hydrolysis of phosphates, esters and related substrates by models of biological catalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 6, p. 752-758, 1999.
10. MISHRA, N. **Nucleases: Molecular Biology and Applications**.ed., Wiley Publisher,2002. 344 p.

11. MUTH, G. W.; HENNELLY, S. P. e HILL, W. E. Using a targeted chemical nuclease to elucidate conformational changes in the *E. coli* 30S ribosomal subunit. **Biochemistry**, v. 39, n. 14, p. 4068-4074, 2000.
12. OTT, R. e KRÄMER, R. DNA hydrolysis by inorganic catalysts. **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 52, p. 761-767, 1999.
13. SUH, J. Synthetic artificial peptidases and nucleases using macromolecular catalytic systems. **Accounts of Chemical Research**, v. 36, n. 7, p. 562-570, 2003.
14. KORUPOJU, S. R.; MANGAYARKARASI, N.; ZACHARIAS, P. S.; MIZUTHANI, J. e NISHIHARA, H. Synthesis, structure, and DNA cleavage activity of new trinuclear Zn₃ and Zn₂Cu complexes of a chiral macrocycle: structural correlation with the active center of P1 nuclease. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 16, p. 4099-4101, 2002.
15. KIMURA, E. Dimetallic hydrolases and their models. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 2, p. 207-213, 2000.
16. KARSTEN, P.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; STRÄHLE, J. e MAICHLE-MÖSSMER, C. Synthesis, structure and catalase-like activity of a new dinuclear mixed valence Mn^{II}Mn^{III} complex containing an unsymmetric N₅O₂ donor ligand. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 5, p. 434-438, 2002.
17. GERDEMANN, C.; EICHEN, C. e KREBS, B. The crystal structure of Cathecol Oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 3, p. 183-191, 2002.
18. ALBEDYHL, S.; AVERBUCH-POUCHOT, M. T.; BELLE, C.; KREBS, B.; PIERRE, J. L.; SAINT-AMAN, E. e TORELLI, S. Dinuclear Zinc(II)-Iron(III) and Iron(II)-Iron(III) complexes as model for Purple Acid phosphatases. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 1457-1464, 2001.
19. LANZMASTER, M. **Desenvolvimento de modelos estruturais e funcionais para as Fosfatases Ácidas Púrpuras**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, Tese de Doutorado, 171 p., 2003.
20. BRITO, M. A. **Análogos sintéticos para a estrutura do sítio ativo das fosfatases ácidas púrpuras**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, Tese de doutorado em Químicap., 1994.

21. KRAMER, R. Bioinorganic models for the catalytic cooperation of metal ions and functional groups in nuclease and peptidase enzymes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 182, n. 1, p. 243-261, 1999.
22. HEGG, E. L. e BURSTYN, J. N. Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 173, n. 1, p. 133-165, 1998.
23. COWAN, J. A. Chemical nucleases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 6, p. 634-642, 2001.
24. SREEDHARA, A. e COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 337-347, 2001.
25. LIU, C.; WANG, M.; ZHANG, T. e SUN, H. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 248, p. 147-168, 2004.
26. CHAO, H.; MEI, W.-J.; HUANG, Q.-W. e JI, L.-N. DNA binding studies of ruthenium(II) complexes containing asymmetric tridentate ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 92, p. 165-170, 2002.
27. NOVAKOVA, O.; CHEN, H.; VRANA, O.; RODGER, A.; SADLER, P. J. e BRABEE, V. DNA interactions of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media. **Biochemistry**, v. 42, n. 39, p. 11544-11554, 2003.
28. WHITTAKER, J.; MCFADYEN, W. D.; BAGULEY, B. C. e MURRAY, V. The interaction of DNA-targeted platinum phenanthridinium complexes with DNA in human cells. **Anti-Cancer Drug Design**, v. 16, n. 16, p. 81-89, 2001.
29. ZHANG, H.; LIU, C.-S.; BU, X.-H. e YANG, M. Synthesis, crystal structure, cytotoxic activity and DNA-binding properties of the copper (II) and zinc (II) complexes with 1-[3-(2-pyridyl)pyrazol-1-ylmethyl]naphthalene. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 1119-1125, 2005.

30. ZHU, L. e KOSTIC, N. M. Sequence-dependent cleavage of albumins with palladium(II) complexes: role of serine residue in controlling the high regioselectivity of protein cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 339, p. 104-110, 2002.
31. KAMINSKAIA, N. V. e KOSTIC, N. M. New selectivity in peptide hydrolysis by metal complexes. Platinum(II) complexes promote cleavage of peptides next to the tryptophan residue. **Inorganic Chemistry**, v. 40, n. 10, p. 2368-2377, 2001.
32. MILOVIC, N. M. e KOSTIC, N. M. Palladium(II) complexes, as synthetic peptidases, regioselectively cleave the second peptide bond upstream from methionine and histidine side chains. **Journal of American Chemical Society**, v. 124, n. 17, p. 4759-4769, 2002.
33. RANA, T. M. e MEARES, C. F. Transfer of Oxygen from an Artificial Protease to Peptide Carbon During Proteolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v. 88, n. 23, p. 10578-10582, 1991.
34. BURANAPRAPUK, A.; LEACH, S. P.; KUMAR, C. V. e BOCARSLY *, J. R. Protein cleavage by transition metal complexes bearing amino acid substituents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1387, n. 1-2, p. 309-316, 1998.
35. BRANUM, M. E.; TIPTON, A. K.; ZHU, S. e QUE, L. J. Double-strand hydrolysis of plasmid DNA by dicerium complexes at 37°C. **Journal of American Chemical Society**, v. 123, n. 9, p. 1898-1904, 2001.
36. LIU, C.; YU, S.; LI, D.; LIAO, Z.; SUN, X. e XU, H. DNA hydrolytic cleavage by the diiron(III) complex $\text{Fe}_2(\text{DTPB})(\mu\text{-O})(\mu\text{-Ac})\text{Cl}(\text{BF}_4)_2$: Comparison with other transition metal complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 913-922, 2002.
37. NEVES, A.; TERENCEZI, H.; HÖRNER, R.; HORN JR., A.; SZPOGANICZ, B. e SUGAI, J. Hydrolytic DNA cleavage promoted by a dinuclear iron(III) complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 4, n. 8, p. 388-391, 2001.
38. ZHU, L.; SANTOS, O.; KOO, C. W.; RYDSTEIN, M.; PAPE, L. e CANARY, J. W. Geometry-dependent phosphodiester hydrolysis catalyzed by binuclear copper complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 7912-7920, 2003.

39. ROSSI, L. M.; NEVES, A.; HÖRNER, R.; TERENCEZI, H.; SZPOGANICZ, B. e SUGAI, J. Hydrolytic activity of a dinuclear copper (II,II) complex in phosphate diester and DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 337, p. 366-370, 2002.
40. JEUNG, C.-S.; KIM, C. H.; MIN, K.; SUH, S. W. e SUH, J. Hydrolysis of plasmid DNA catalyzed by Co(III) complex of cyclen attached to polystyrene. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 2401-2404, 2001.
41. HAMILTON, A. D. e KIRBY, A. J. Model systems -- Artificial models of protein function. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 6, p. 623-625, 2001.
42. COX, R. S.; SCHENK, G.; MITIC, N.; GAHAN, L. R. e HENGGE, A. C. Diesterase Activity and Substrate Binding in Purple Acid Phosphatases. **Journal of American Chemical Society**, v. 129, n. 31, p. 9550-9551, 2007.
43. TWITCHETT, M. B. e SYKES, A. G. Structure, properties and reactivity of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ and the $\text{Zn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ Purple Acid Phosphatases. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 2105-2115, 1999.
44. BECK, J. L.; MCCONACHIE, L. A.; SUMMORS, A. C.; ARNOLD, W. N.; DE JERSEY, J. e ZERNER, B. Properties of a purple phosphatase from red kidney bean: a zinc-iron metalloenzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 869, p. 61-68, 1986.
45. KLABUNDE, T.; STRÄTER, N.; FRÖHLICH, R.; WITZEL, H. e KREBS, B. Mechanism of Fe(III)-Zn(II) Purple Acid Phosphatase based on crystal structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 259, p. 737-748, 1996.
46. BECK, J. L.; DURACK, M. C. A.; HAMILTON, S. E. e DE JERSEY, J. Irreversible inactivation of purple acid phosphatase by hydrogen peroxide and ascorbate. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 73, p. 245-252, 1999.
47. SCHENK, G.; GAHAN, L. R.; CARRINGTON, L. E.; MITIC, N.; VALIZADEH, M.; HAMILTON, S. E.; DE JERSEY, J. e GUDDAT, L. W. Phosphate forms an unusual tripodal complex with the Fe-Mn center of sweet potato purple acid phosphatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v. 102, n. 2, p. 273-278, 2005.

48. SCHENK, G.; GE, Y.; CARRINGTON, L. E.; WYNNE, C. J.; SEARLE, I. R.; CARROLL, B. J.; HAMILTON, S. E. e DE JERSEY, J. Binuclear metal centers in plant purple acid phosphatase: Fe-Mn in sweet potato and Fe-Zn in soybean. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 370, n. 2, p. 183-189, 1999.
49. HAYMAN, A. R. e COX, T. M. Purple Acid Phosphatase of the human macrophage and osteoclast: characterization, molecular properties and crystallization of the recombinant di-iron-oxo protein secreted by baculovirus-infected insect cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 2, p. 1294-1300, 1994.
50. ORTLUND, E.; LACOUNT, M. W. e LEBIODA, L. Crystal structures of Human Prostatic Acid Phosphatase in complex with a phosphate ion and α -benzylaminobenzylphosphonic acid update the mechanistic picture and offer new insights into inhibitor design. **Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 383-389, 2003.
51. MITIC, N.; SMITH, S. J.; NEVES, A.; GUDDAT, L. W.; GAHAN, L. R. e SCHENK, G. The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 106, p. 3338-3363, 2006.
52. DIKIY, A.; FUNHOFF, E. G.; AVERILL, B. A. e CIURLI, S. New insights into the mechanism of Purple Acid Phosphatase through ^1H NMR spectroscopy of the recombinant human enzyme. **Journal of American Chemical Society**, v. 124, n. 47, p. 13974-13975, 2002.
53. NEVES, A.; BRITO, M. A.; DRAGO, V.; GRIESAR, K. e HAASE, W. A new asymmetric N_5O_2 -donor binucleating ligand and its first $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ complex as a model for the redox properties of uteroferin. **Inorganica Chimica Acta**, v. 237, p. 131-135, 1995.
54. NEVES, A.; BRITO, M. A.; VENCATO, I.; DRAGO, V.; GRIESAR, K. e HAASE, W. $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ and $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ Complexes as Synthetic Analogues for the Oxidized and reduced Forms of Purple Acid Phosphatases. **Inorganic Chemistry**, v. 35, p. 2360-2368, 1996.
55. KARSTEN, P.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; LANZMASTER, M. e DRAGO, V. Synthesis, Structure, Properties and Phosphatase-Like Activity of the First Heterodinuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}$ Complex with the Unsymmetric Ligand H_2BPBPMP as a Model for the PAP in Sweet Potato. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 18, p. 4624-4626, 2002.

56. LANZNASTER, M.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B. e SCHWINGEL, E. New Fe^{III}Zn^{II} complex containing a single terminal Fe-O_{phenolate} bond as a structural and functional model for the active site of red kidney bean purple acid phosphatase. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 22, p. 5641-5643, 2002.
57. BATISTA, S. C.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; VENCATO, I.; PERALTA, R. A.; SZPOGANICZ, B.; AIRES, V. V. E.; TERENCEZI, H. e SEVERINO, P. C. Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical Fe^{III}Ni^{II} model complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 6, p. 1161-1165, 2003.
58. SCARPELLINI, M.; NEVES, A.; HÖRNER, R.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B.; ZUCCO, C.; SILVA, R. A. N.; DRAGO, V.; MANGRICH, A. S.; ORTIZ, W. A.; PASSOS, W. A. C.; OLIVEIRA, M. C. B. e TERENCEZI, H. Phosphate Diester Hydrolysis and DNA Damage Promoted by New *cis*-Aqua/Hydroxy Copper(II) Complexes Containing Tridentate Imidazole-rich Ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 25, p. 8353-8365, 2003.
59. LANZNASTER, M.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; AIRES, V. V. E.; SZPOGANICZ, B.; TERENCEZI, H.; SEVERINO, P. C.; FULLER, J. M.; DREW, S. C.; GAHAN, L. R.; HANSON, G.; RILEY, M. J. e SCHENK, G. A new heterobinuclear Fe^{III}Cu^{II} complex with a single terminal Fe^{III}-O(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 10, p. 319-332, 2005.
60. VERGE, F.; LEBRUN, C.; FONTECAVE, M. e MÉNAGE, S. Hydrolysis of phosphodiester by diiron complexes: Design of nonequivalent iron sites in Purple Acid Phosphatase models. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 499-507, 2003.
61. WILLIAMS, N. H.; LEBUIS, A.-M. e CHIN, J. A Structural and Functional Model of Dinuclear Metallophosphatases. **Journal of American Chemical Society**, v. 121, n. 14, p. 3341-3348, 1999.
62. THAN, R.; FELDMANN, A. A. e KREBS, B. Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 182, p. 211-241, 1999.
63. SCHENK, G.; BOUTCHARD, C. L.; CARRINGTON, L. E.; NOBLE, C. J.; MOUBARAKI, B.; MURRAY, K. S.; DE JERSEY, J. e HANSON,

G. A Purple Acid Phosphatase from sweet potato contains an antiferromagnetically coupled binuclear Fe-Mn center. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 22, p. 19084-19088, 2001.

64. AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. D.; SMITH, J. A. e STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**. 3^a ed., John Wiley & Sons, 1995.

65. SREEDHARA, A.; FREED, J. D. e COWAN, J. A. Efficient inorganic deoxyribonucleases. Greater than 50-million-fold rate enhancement in enzyme-like DNA cleavage. **Journal of American Chemical Society**, v. 122, n. 37, p. 8814-8824, 2000.

66. MAZERA, D. J. **Estudo da atividade de degradação de DNA por um complexo mononuclear contendo a unidade estrutural *cis*-(H₂O)₂**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, Dissertação (Mestrado em Química), 82 p., 2002.

67. GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M.; ALZUET, G.; BORRÁS, J.; MACÍAS, B.; DEL OLMO, M.; LIU-GONZALEZ, M. e SANZ, F. Nuclease activity of [Cu(sulfathiazolato) (benzimidazole)]2MeOH. 2 2 Synthesis, properties and crystal structure. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 89, p. 29-35, 2002.

68. BREZOVA, V.; VALKO, M.; BREZA, H.; MORRIS, H.; TELSER, J.; DVORANOVA, D.; KAISEROVA, K.; VARECKA, L.; MAZUR, M. e LEIBFRITZ, D. Role of radicals and singlet oxygen in photoactivated DNA cleavage by the anticancer drug Camptothecin: An electron paramagnetic resonance study. **Journal of Physical Chemistry**, v. 107, p. 2415-2425, 2003.

69. SIGMAN, D. S.; MAZUMBER, A. e PERRIN, D. M. Chemical nucleases. **Chemical Reviews**, v. 23, p. 2295-2316, 1993.

70. MAHADEVAN, S. e PALANIANDAVAR, M. Spectroscopic and voltammetric studies on Copper complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolines bound to calf thymus DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 693-700, 1998.

71. NIKOLIS, N.; METHENITIS, C. e PNEUMATIKAKIS, G. Studies on the interaction of altromycin B and its platinum(II) and palladium(II) metal complexes with calf thymus DNA and nucleotides. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 95, n. 2-3, p. 177-193, 2003.

72. CHAN, H.-L.; LIU, H.-Q.; TZENG, B.-C.; YOU, Y.-S.; PENG, S.-M.; YANG, M. e CHE, C.-M. Syntheses of ruthenium(II) quinonediimine complexes of cyclam and characterization of their DNA-binding activities and cytotoxicity. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 3161-3171, 2002.
73. SELVAKUMAR, B.; RAJENDIRAN, V.; MAHESWARI, P. U.; STOECKLI-EVANS, H. e PALANIANDAVAR, M. Structures, spectra, and DNA-binding properties of mixed ligand copper(II) complexes of iminodiacetic acid: The novel role of diimine co-ligands on DNA conformation and hydrolytic and oxidative double strand DNA cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 316-330, 2006.
74. TAYLOR, A.; WEBSTER, K. A.; GUSTAFSON, T. A. e KEDES, L. The anti-cancer agent distamycin A displaces essential transcription factors and selectively inhibits myogenic differentiation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 169, p. 61-72, 1997.
75. UYTTERHOEVEN, K.; SPONER, J. e MEERVELT, L. V. Two 1 : 1 binding modes for distamycin in the minor groove of d(GGCCAATTGG). **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 2868-2877, 2002.
76. FERRER, S.; BALLESTEROS, R.; SAMBARTOLOMÉ, A.; GONZÁLEZ, M.; ALZUET, G.; BORRÁS, J. e LIU, M. Syntheses, crystal structures, and oxidative DNA cleavage of some Cu(II) complexes of 5-amino-3-pyridin-2-yl-1,2,4-triazole. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1436-1446, 2004.
77. XIA, C.; JIANG, N.; ZHANG, J.; CHEN, S.; LIN, H.; TAN, X.; YUE, Y. e YU, X. The conjugates of uracil-cyclen Zn(II) complexes: Synthesis, characterization and their interaction with plasmid DNA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 5756-5764, 2006.
78. NEVES, A.; LANZMASTER, M.; BORTOLUZZI, A. J.; PERALTA, R. A.; CASELLATO, A.; CASTELLANO, E. E.; HERRALD, P.; RILEY, M. J. e SCHENK, G. An Unprecedented $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}$ Complex that Mimics the Structural and Funcional Properties of Purple Acid Phosphatases. **Journal of American Chemical Society**, v. 129, n. 24, p. 7486-7487, 2007.

79. BOSEGGIA, E.; GATOS, M.; LUCATELLO, L.; MANCIN, F.; MORO, S.; PALUMBO, M.; SISSI, C.; TECILLA, P.; TONELLATO, U. e ZAGOTTO, G. Toward efficient Zn(II)-based Artificial Nucleases. **Journal of American Chemical Society**, v. 126, n. 14, p. 4543-4549, 2004.

80. NG, C. H.; ONG, H. K.; KONG, C. W.; TAN, K. W.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; YAMIN, B. M. e NG, S. W. Factors affecting the nucleolytic cleavage of DNA by (N,N'-ethylenediaminediacetato)metal(II) compelxes, M(edda). Crystal structure of Co(edda). **Polyhedron**, v. 25, p. 3118-3126, 2006.

81. XIANG, Q.; ZHANG, J.; LIU, P.; XIA, C.; ZHOU, Z.; XIE, R. e YU, X. Dinuclear macrocyclic polyamine zinc(II) complexes: Syntheses, characterization and their interaction with plasmid DNA. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 1661-1669, 2005.

82. OTERO, L.; SMIRCICH, P.; VIEITES, M.; CIGANDA, M.; SEVERINO, P. C.; TERENCEZI, H.; CERECETTO, H.; GAMBINO, D. e GARAT, B. DNA conformational changes and cleavage by ruthenium (II) nitrofurylsemicarbazone complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, p. 74-79, 2007.

83. KEMSLEY, J. N.; ZALESKI, K. L.; CHOW, M. S.; DECKER, A.; SHISHOVA, E. Y.; WASINGER, E. C.; HEDMAN, B.; HODGSON, K. O. e SOLOMON, E. I. Spectroscopic studies of the interaction of ferrous Bleomycin with DNA. **Journal of American Chemical Society**, v. 125, n. 36, p. 10810-10821, 2003.

84. ABRESCIA, N. G. A. e HUYNH-DINH, T. Nickel-guanine interactions in DNA: crystal structure of nickel-d[CGTGTACACG]₂. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 7, p. 195-199, 2002.

85. SAMBROOK, J.; FRISTSH, E. F. e MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

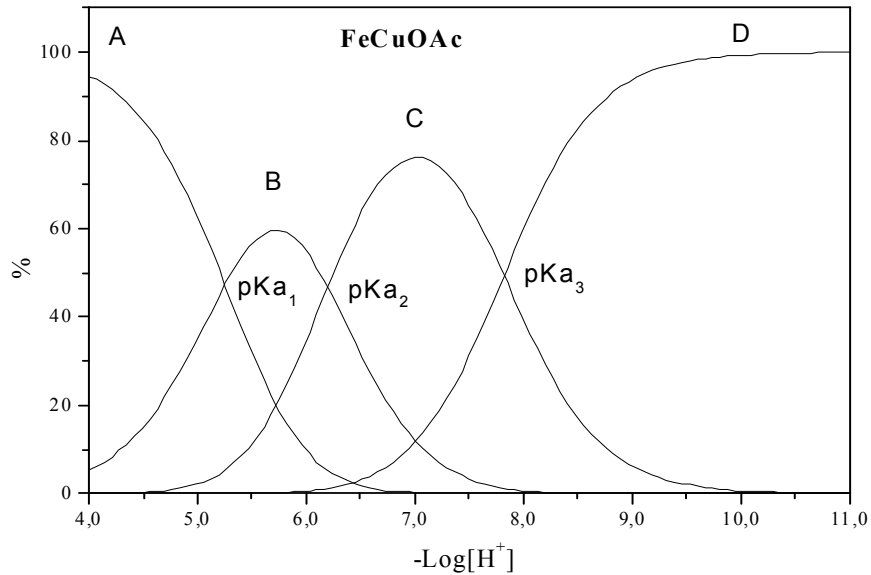
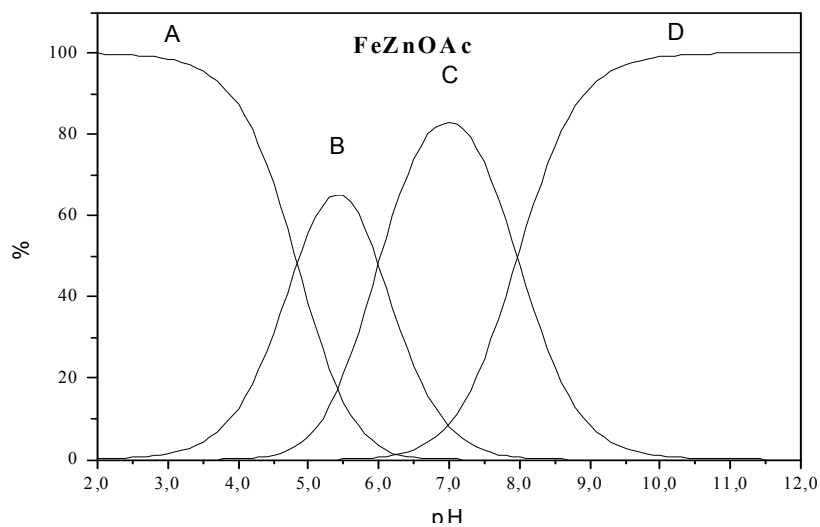
86. ZHANG, S.-S.; NIU, S.-Y.; QU, B.; JIE, G.-F.; XU, H. e DING, C.-F. Studies on the interaction mechanism between hexakis(imidazole) manganese(II) terephthalate and DNA and preparation of DNA electrochemical sensor. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 2340-2347, 2005.

87. WANG, Y. e OKABE, N. Synthesis, structure and DNA binding of ternary transition metal complexes M(II)L with the 2,2'-bipyridylamine (L= p-HB, M= Co, Ni, Cu and Zn). **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, p. 3407-3416, 2005.
88. LENG, F.; GRAVES, D. e CHAIRES, J. B. Chemical cross-linking of ethidium to DNA by glyoxal. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1442, p. 71-81, 1998.
89. DHAR, S. e CHAKRAVARTY, A. R. Efficient visible light induced nuclease activity of a ternary mono-1,10-phenanthroline copper(II) complex containing 2-(methylthio)ethylsalicylaldehyde. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 8, p. 2483-2485, 2003.
90. HUMPHREYS, K. J.; KARLIN, K. D. e ROKITA, S. E. Targeted strand scission of DNA substrates by a tricopper(II) coordination complex. **Journal of American Chemical Society**, v. 124, n. 27, p. 8055-8066, 2002.
91. FRELON, S.; DOUKI, T.; FAVIER, A. e CADET, J. Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide. **Chemical Research Toxicology**, v. 16, n. 2, p. 191-197, 2003.
92. MACBETH, C. E.; GOLOMBEK, A. P.; YOUNG JR, V. G.; YANG, C.; KUCZERA, K.; HENDRICH, M. P. e BOROVNIK, A. S. O₂ activation by nonheme iron complexes: A monomeric Fe(III)-Oxo complex derived from O₂. **Science**, v. 289, p. 938-941, 2000.
93. GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M.; ALZUET, J.; BORRÁS, J.; MACÍAS, B. e CASTIÑEIRAS, A. Oxidative cleavage of DNA by a new ferromagnetic linear trinuclear copper(II) complex in the presence of H₂O₂/sodium ascorbate. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 9, p. 2992-2998, 2003.
94. OLIVEIRA, M. C. B.; COUTO, M. S. R.; SEVERINO, P. C.; FOPPA, T.; MARTINS, G. T. S.; SZPOGANICZ, B.; PERALTA, R. A.; NEVES, A. e TERENCEZI, H. Nucleic acid cleavage by a Cu(II) polyaza macrocyclic complex. **Polyhedron**, v. 24, p. 495-499, 2005.
95. TAMILARASAN, R. e MCMILLIN, D. R. Photophysical studies of copper phenanthrolines bound to DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 29, n. 15, p. 2798-2802, 1990.

96. REDDY, P. R.; RAO, K. S. e SATYANARAYANA, B. Synthesis and DNA cleavage properties of ternary Cu(II) complexes containing histamine and amino acids. **Tetrahedron Letters**, v. 47, p. 7311-7315, 2006.
97. ZENG, Y.-B.; YANG, N.; LIU, W.-S. e TANG, N. Synthesis, characterization and DNA-binding properties of La(III) complex of chrysin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, p. 258-264, 2003.
98. SONG, Y.; WU, Q.; YANG, P.; LUAN, N.; WANG, L. e LIU, Y. DNA binding and cleavage activity of Ni(II) complex with all-trans retinoic acid. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 1685-1691, 2006.
99. DENG, H.; LI, J.; ZHENG, K.; YANG, Y.; CHAO, H. e JI, L.-N. Synthesis, characterization, structures and DNA-binding properties of complexes $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})]^{2+}$ (L=ptdb, ptda and ptdp) with asymmetric intercalative ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, p. 3430-3440, 2005.
100. PASTERNAK, R. F.; GIBBS, E. J. e VILAFRANCA, J. J. Interactions of porphyrins with nucleic acids. **Biochemistry**, v. 22, n. 10, p. 2406-2414, 1983.
101. LIU, F.; MEADOWS, K. A. e MCMILLIN, D. R. DNA-Binding Studies of $\text{Cu}(\text{bcp})_2$ and $\text{Cu}(\text{dmp})_2$: DNA elongation without intercalation of $\text{Cu}(\text{bcp})_2$. **Journal of American Chemical Society**, v. 115, n. 15, p. 6699-6704, 1993.

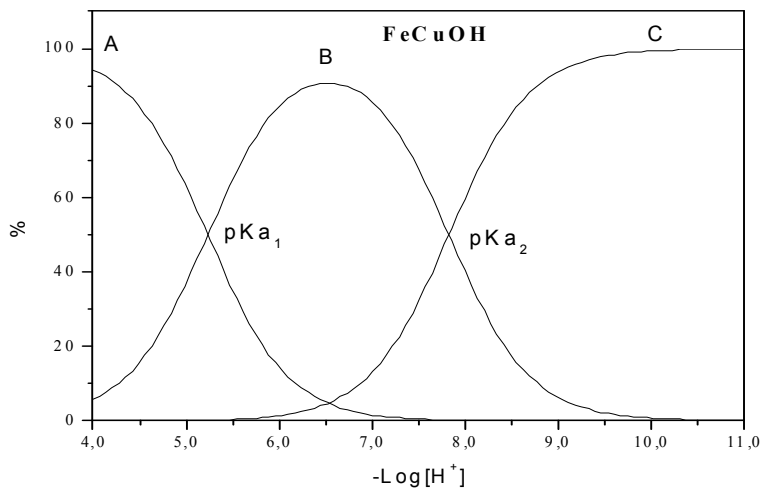
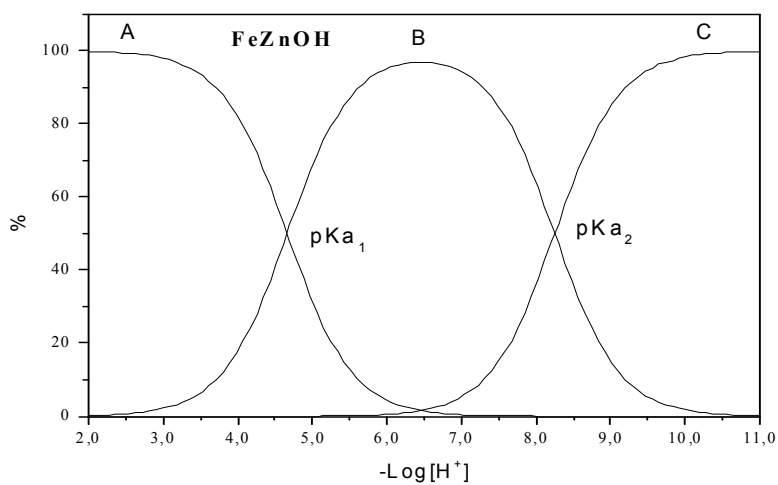
ANEXOS

ANEXO 1



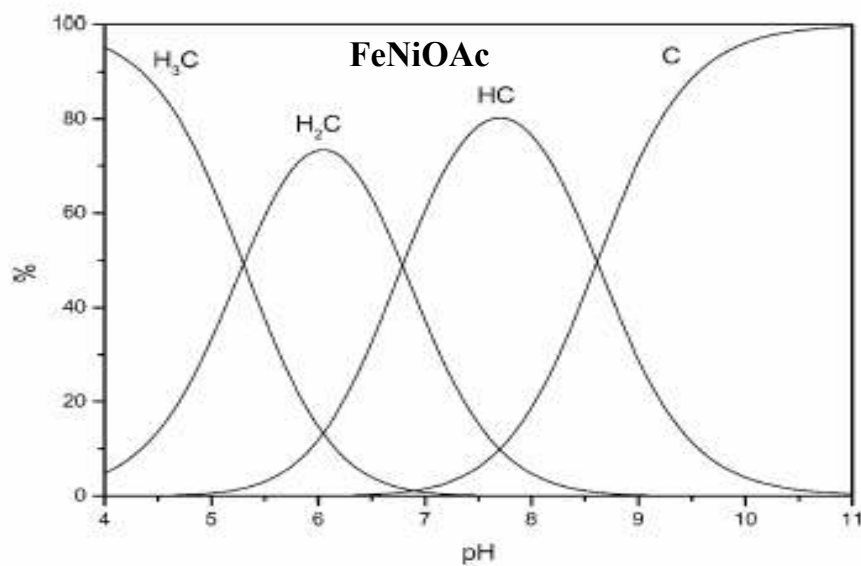
Curvas de distribuição das espécies para os complexos FeZnOAc (acima) e FeCuOAc (abaixo) em função do pH, onde **A** = $(\text{H}_2\text{O})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, **B** = $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OAc})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, **C** = $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$ e **D** = $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH})$. [19, 56, 59]

ANEXO 2



Curvas de distribuição das espécies para os complexos FeZnOH (acima) e FeCuOH (abaixo), onde **A** = $(\text{H}_2\text{O})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$, **B** = $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH}_2)$ e **C** = $(\text{HO})\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-OH})\text{M}^{\text{II}}(\text{OH})$.^[19]

ANEXO 3



Curvas de distribuição das espécies para o complexo FeNiOAc, onde **H₃C** = (H₂O)Fe^{III}(μ-OAc)Ni^{II}(OH₂), **H₂C** = (HO)Fe^{III}(μ-OAc)Ni^{II}(OH₂), **HC** = (HO)Fe^{III}(μ-OH)Ni^{II}(OH₂) e **C** = (HO)Fe^{III}(μ-OH)Ni^{II}(OH).^[57]

ARTIGOS PUBLICADOS



Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical Fe^{III}Ni^{II} model complex

Suzana Cimara Batista ^a, Ademir Neves ^{a,*}, Adailton J. Bortoluzzi ^a, Ivo Vencato ^a, Rosely A. Peralta ^a, Bruno Szpoganicz ^a, Veronika V.E. Aires ^a, Hernán Terenzi ^b, Patricia Cardoso Severino ^b

^a *LABINC Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, BR-88040-900 Florianópolis – SC, Brazil*

^b *Laboratório de Expressão Gênica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, BR-88040-900 Florianópolis – SC, Brazil*

Received 2 April 2003; accepted 26 June 2003

Published online: 12 July 2003

Abstract

A new heterodinuclear mixed valence complex [Fe^{III}Ni^{II}(BPBPMP)(OAc)₂ClO₄ **1** with the unsymmetrical N₅O₂ donor ligand 2-bis[[(2-pyridylmethyl)-aminomethyl]-6-((2-hydroxybenzyl)(2-pyridylmethyl))-aminomethyl]-4-methylphenol (H₂BPBPMP) has been synthesized and characterized. **1** crystallizes in the monoclinic system, space group *P2₁/n*, *a* = 12.497(2), *b* = 18.194(4), *c* = 16.929(3) Å, *β* = 94.11(3)°, *V* = 3839.3(12) Å³ and has an Fe^{III}Ni^{II}(μ-phenoxo)-bis(μ-carboxylato) core. Solution studies of **1** indicate that a pH-induced change in the bridging acetate occurs and the formation of an active [(OH)Fe^{III}(μ-OH)Ni^{II}(OH₂)⁺ species as the catalyst for phosphate diester hydrolysis and DNA interaction is proposed. In addition, the results presented here suggest that Ni^{II} would be a good candidate as a substitute of M^{II} in purple acid phosphatases.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Crystal Structure; Dinuclear Fe^{III}Ni^{II} complex; Unsymmetric ligand; Phosphatase-like activity; DNA interaction; Cyclic voltammetry

1. Introduction

There has been great interest in the synthesis of heterodinuclear Fe^{III}M^{II} complexes, because these molecules might be useful as model complexes for the active site of dinuclear metalloenzymes such as purple acid phosphatases (PAPs). Heterodinuclear Fe^{III}Zn^{II} and Fe^{III}Mn^{II} PAPs have been isolated from plants while those containing a homodinuclear Fe^{III}Fe^{II} center are found in animals [1]. PAPs are efficient catalysts for the hydrolysis reaction of a wide range of activated phosphoric acid esters and anhydrides, like ATP, at a pH range from 4 to 7. In these Fe^{III}M^{II} enzymes the

Fe^{III} and M^{II} metal centers show quite different coordination environments. In the kidney bean PAP, the best described plant enzyme, (resolution 2.65 Å) [2], the Fe^{III} ion is coordinated by a tyrosine, a histidine, and an aspartate, and the zinc by two histidines and an asparagine. The Fe^{III}Zn^{II} ions are bridged by a monodentate carboxylate group of an aspartate and by a modeled μ-hydroxo group. Terminal aqua and hydroxo ligands, which were also modeled, complete the coordination spheres of the Zn^{II} and Fe^{III} ions, respectively. Crystal structures of PAPs from rat [3], pig [4], and sweet potato [5] have also been determined more recently. It is important to emphasize that the two chemically distinct environments around the Fe^{III} and M^{II} centers are very likely essential for the catalytic properties of this enzyme [6]. However, although both metals seem to be essential for catalysis, their individual roles remain a matter of controversy. Thus, according to the first proposed mechanism, during

* Corresponding author. Tel.: +55-48-3319219; fax: +55-48-331-9711.

E-mail address: ademir@qmc.ufsc.br (A. Neves).

Mauricio Lanznaster · Ademir Neves
Adailton J. Bortoluzzi · Veronika V. E. Aires
Bruno Szpoganicz · Hernán Terenzi
Patricia Cardoso Severino · Julie M. Fuller
Simon C. Drew · Lawrence R. Gahan
Graeme R. Hanson · Mark J. Riley · Gerhard Schenk

A new heterobinuclear Fe^{III}Cu^I complex with a single terminal Fe^{III}–O(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases

Received: 25 November 2004 / Accepted: 17 February 2005 / Published online: 21 April 2005
© SBIC 2005

Abstract A novel heterobinuclear mixed valence complex [Fe^{III}Cu^I(BPBPMP)(OAc)₂]ClO₄, **1**, with the unsymmetrical N₂O₂ donor ligand 2-bis[(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-6-[(2-hydroxybenzyl)(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-4-methylphenol (H₂BPBPMP) has been synthesized and characterized. A combination of data from mass spectrometry, potentiometric titrations, X-ray absorption and electron paramagnetic

resonance spectroscopy, as well as kinetics measurements indicates that in ethanol/water solutions an [Fe^{III}–(μ)OH–Cu^IOH₂]⁺ species is generated which is the likely catalyst for 2,4-bis(dinitrophenyl)phosphate and DNA hydrolysis. Insofar as the data are consistent with the presence of an Fe^{III}-bound hydroxide acting as a nucleophile during catalysis, **1** presents a suitable mimic for the hydrolytic enzyme purple acid phosphatase. Notably, **1** is significantly more reactive than its isostructural homologues with different metal composition (Fe^{III}M^{II}, where M^{II} is Zn^{II}, Mn^{II}, Ni^{II}, or Fe^{II}). Of particular interest is the observation that cleavage of double-stranded plasmid DNA occurs even at very low concentrations of **1** (2.5 μM), under physiological conditions (optimum pH of 7.0), with a rate enhancement of 2.7×10⁷ over the uncatalyzed reaction. Thus, **1** is one of the most effective model complexes to date, mimicking the function of nucleases.

Electronic Supplementary Material Supplementary material is available for this article at <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-005-0635-7>.

M. Lanznaster · A. Neves (✉) · A. J. Bortoluzzi
V. V. E. Aires · B. Szpoganicz
LABINC Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia,
Departamento de Química,
Universidade Federal de Santa Catarina,
Campus Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil
E-mail: ademir@qmc.ufsc.br
Fax: +55-48-3319711

H. Terenzi · P. C. Severino
Laboratório de Expressão Gênica,
Departamento de Bioquímica,
Universidade Federal de Santa Catarina,
Campus Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

S. C. Drew · G. R. Hanson
Centre for Magnetic Resonance,
The University of Queensland, St. Lucia,
QLD, 4072, Australia

J. M. Fuller · L. R. Gahan · M. J. Riley · G. Schenk
Department of Chemistry,
School of Molecular and Microbial Sciences,
The University of Queensland, St. Lucia,
QLD, 4072, Australia
E-mail: schenk@uq.edu.au
Fax: +61-3365-4273

Keywords Heterobinuclear Fe^{III}Cu^I complex · Purple acid phosphatase · Phosphate diester hydrolysis · DNA cleavage · EPR · XAS

Abbreviations 2,4-BDNPP: 2,4-Bis(dinitrophenyl)phosphate · n-Bu₄NPF₆: Tetrabutylammonium hexafluorophosphate · HBPMP: 2,6-Bis[bis(2-pyridylmethyl)amino]methyl]-4-methylphenol · DMSO: Dimethylsulfoxide · EPR: Electron paramagnetic resonance · EXAFS: Extended X-ray absorption fine structure · H₂BPBPMP: 2-Bis[(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-6-[(2-hydroxybenzyl)(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-4-methylphenol · MES: 2-Morpholinoethanesulfonic acid · MOPS: 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid · PAP: Purple acid phosphatase · XAS: X-ray absorption spectroscopy