



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**CLIVAGEM E INTERAÇÃO DE UM NOVO COMPLEXO DE
FERRO (II) COM DNA E PROTEÍNAS**

GISELLE GIOVANA AZZOLINI BUSSI

Florianópolis
DEZEMBRO/2010

Giselle Giovana Azzolini Bussi

**CLIVAGEM E INTERAÇÃO DE UM NOVO COMPLEXO DE
FERRO (II) COM DNA PLASMIDIAL E PROTEÍNAS**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Prof. Dr. Hernán Terenzi

Florianópolis
12/2010

Giselle Giovana Azzolini Bussi

**CLIVAGEM E INTERAÇÃO DE UM NOVO COMPLEXO DE
FERRO (II) COM DNA PLASMIDIAL E PROTEÍNAS**

Prof^a. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Hernán Terenzi
Orientador

Prof. Ademir Neves
Coorientador

Prof^a. Rosely Peralta

Prof^a. Herica Magosso

Florianópolis
DEZEMBRO/2010

**Para Marisa, Nilton, Zuriel e Thiago
com todo meu amor.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Nilton e Marisa, por todo apoio, amor e paciência. Por serem tão especiais e importantes e terem me ensinado a ser feliz. A meu irmão Zuriel por me aguentar e ser tão importante em minha vida.

Thiago, obrigada pelo incentivo, apoio, compreensão, críticas, discussões e por estar sempre ao meu lado, mesmo quando distante e principalmente por todo amor.

Ao professor Hernán Terenzi pela oportunidade, por ter me recebido no grupo e orientado este trabalho.

Ao professor Ademir pela co-orientação e ao pessoal do Labinc, em especial a Fernando Xavier pelo complexo utilizado.

Às minhas grandes e eternas amigas feitas em Florianópolis: Ju, Mara, Ricardo, Sheila (e família, obrigada pela acolhida!) e Camile. Obrigada por participarem de tudo em minha trajetória todos estes anos.

Às amigas que o curso me trouxe, em especial à Adrielle e Luiza, por todas as conversas “filosóficas” e pela amizade.

Às amigas “do oeste” Caro, Rute, Mara por sempre estarem presentes de alguma forma.

À minha prima Fernanda por me aturar no tempo que moramos juntas e por toda alegria e diversão de uma vida inteira de risadas.

Aos colegas de laboratório Javier, Carol, Angela, Pri, Gabi Muller, Gabi Ecco, Cami (vlw pela TRP), Patrícia, Jean e Manuel pelo apoio e pelos momentos de descontração. Em especial à Fran por todos os ensinamentos, paciência e incentivo. Também em especial a Tiago e Angélica, por todas as conversas, importantes e as nem tão importantes assim, pelo apoio, amizade e compreensão, principalmente na reta final.

À UFSC e ao Departamento de Química pela oportunidade e ensino de qualidade. Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	I
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	III
RESUMO.....	IV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
3. OBJETIVOS	7
3.1 Geral.....	7
3.2 Específicos	7
4. METODOLOGIA.....	8
4.1. Complexo metálico	8
4.2 DNA plasmidial	9
4.2.1 Testes de clivagem de DNA.....	9
4.2.2 Eletroforese em gel de Agarose.....	10
4.2.3 Ligantes de sulcos do DNA.....	12
4.2.4 Inibidores de radicais livres.....	13
4.2.4 Presença e Ausência de Oxigênio.....	13
4.2.6 Efeito da força iônica.....	13
4.2.7 Cinética de clivagem de DNA	13
4.3 Proteínas	14
4.3.1 Testes de clivagem de proteína	14
4.3.2 SDS-PAGE	14
4.4 Interações com DNA.....	16
4.4.1 Titulação espectrofotométrica.....	16
4.4.2 Desnaturação térmica de CT-DNA	16
4.4.3 Dicroísmo Circular (CD).....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1 DNA Plasmidial.....	17
5.1.1 Clivagem de DNA Plasmidial	17
5.1.2 Inibidores de radicais e ligantes de sulco	19
5.1.3 Presença e Ausência de Oxigênio	21

5.1.4 Força Iônica	22
5.1.5 Cinética de clivagem de DNA	23
5.2 Proteínas	24
5.3 Interação com DNA.....	25
5.3.1 Titulação Espectrofotométrica	25
5.3.2 Desnaturação Térmica de CT-DNA	26
5.3.3 Dicroísmo Circular	27
6. CONCLUSÕES.....	28
7. PERSPECTIVAS	30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
BSA	Albumina do soro bovino " <i>Bovine Serum Albumin</i> "
APS	Persulfato de Amônio
C	Citosina
Complexo 1	Complexo <i>tris-([1,2,5]-tiadiazolo-[3,4-f] - [1,10]-fenantrolina Ferro (II)) hexafluorofosfato</i>
CT-DNA	DNA de timo de bezerro " <i>Calf Thymus DNA</i> "
DC	Dicroísmo circular
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fe	Ferro
FI	Forma superenovelada do plasmídeo
FII	Forma circular aberta do plasmídeo
FIII	Forma linear do plasmídeo
G	Guanina
HSA	Albumina sérica humana
MPA	Ácido 3-mercaptopropiônico
pBSK II	Plasmídeo Bluescript SK II
pb	Pares de bases de DNA
PIPES	Ácido dietanosulfônico 1,4-piperazina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato sódico
T	Timina
TBAPF ₆	Hexafluorofosfato de tetrabutilamônio
tdzp	<i>([1,2,5]-tiadiazolo-[3,4-f] - [1,10]-fenantrolina</i>
TEMED	Tetrametil-etilenodiamina
TEMPO	<i>N</i> -oxil-2,2,6,6- tetrametilpiperidina
TFP	Terapia Foto Dinâmica
T _m	Temperatura de Desnaturação (Melting)
TRP	Transtirretina " <i>transthyretin related proteins</i> "

RESUMO

A interação entre compostos metálicos e biomoléculas tem sido alvo de importantes estudos na atualidade, devido a sua importância em processos bioquímicos e biotecnológicos, já que muitos desses complexos podem ser usados no desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas, como agentes antitumorais, no controle de doenças fúngicas e no desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas. Por isso, diversos complexos de metais de transição, como ferro(III), zinco(II) e cobre(II) e complexos de lantanídeos tiveram sua atividade como nucleases químicas descrita. Os estudos da ação de novos complexos sobre biomoléculas levam à determinação de seus mecanismos de ação, parâmetros cinéticos e interação, demonstrando se estes podem ter alguma atividade de interesse. Neste trabalho foi feita a caracterização da atividade de clivagem e interação do novo complexo de ferro, *tris-([1,2,5]-tiadiazolo-[3,4-f] - [1,10]-fenantrolina Ferro (II)) hexafluorofosfato* frente a moléculas de DNA e das proteínas BSA (Albumina do soro bovino) e TRP (transtirretina). Os resultados obtidos mostram que o complexo é capaz de clivar o DNA plasmidial em baixas concentrações (4 e 6 μM), pHs próximos ao fisiológico (7,0) e em 5 minutos de exposição à luz UV, porém não apresenta nenhuma atividade em condições de escuro. Estudos mecanísticos foram realizados e mostraram que este complexo degrada o DNA preferencialmente por seu sulco maior, de forma totalmente independente de oxigênio e provavelmente por uma oxidação direta das bases do DNA promovida pela forma excitada do complexo. As análises cinéticas mostraram que, em comparação com a degradação natural do DNA, a reação catalisada pelo complexo é $5,23 \times 10^8$ vezes mais rápida e que a atividade do complexo é aproximadamente 6.000 vezes maior quando este é exposto à luz. Ensaio com diferentes substratos foram realizados (proteínas BSA e TRP) e aparentemente o complexo não tem atividade de clivagem. Para analisar que tipo de interação há entre o complexo e o DNA foram realizados ensaios de titulação espectrofotométrica, espectros de dicroísmo circular, efeito da força iônica na clivagem e desnaturação térmica do DNA. Foi possível perceber que o aumento da força iônica presente no meio reacional inibe a atividade do complexo, indicando interações eletrostáticas entre complexo e DNA. Os ensaios de titulação espectrofotométrica e desnaturação térmica não permitiram determinar um tipo de interação, já que não houve alterações significativas na temperatura de desnaturação (T_m) do DNA, nem no espectro de UV do complexo. Finalmente, no espectro de Dicroísmo Circular, após a adição do complexo, houve uma diminuição drástica na intensidade das bandas positiva e negativa do DNA, o que indica uma diminuição no empilhamento das bases do DNA e também em sua helicidade, além disso, houve o surgimento de novas bandas e aparecimento de um ponto isodicroico que demonstra a alteração na conformação do DNA.

Palavras-chave: Nucleases sintéticas, complexos de ferro(II), clivagem de biomoléculas.

1. INTRODUÇÃO

O estudo de complexos metálicos capazes de interagir com DNA e proteínas é uma área de crescente interesse, devido ao fato de que muitos desses compostos podem ser usados para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas. Uma série de pesquisas sobre os efeitos desses compostos foi desencadeada mundialmente e vários complexos têm sido sintetizados e avaliados quanto a sua atividade antineoplásica (ROSENBERG et al., 1969; WHITTAKER et al., 1998). Compostos com essa capacidade são chamados de *nucleases sintéticas*.

As nucleases são enzimas capazes de clivar, ou cortar, a ligação fosfodiéster da molécula de DNA (SIGMAN; CHEN, 1990). Sua descoberta foi fundamental no desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, em técnicas de sequenciamento de DNA, mapeamento genético e mapeamento de cromossomos humanos. Por esta razão, cada vez mais se tem buscado o desenvolvimento e síntese de enzimas modelo (BASHKIN, 1999).

Além disso, alguns complexos têm sua atividade restrita à fotoindução, ou seja, apenas clivam biomoléculas quando irradiados por luz, o que os torna fortes candidatos a agentes para terapia fotodinâmica (TFD). Atualmente, novas drogas promissoras para a TFD têm sido sintetizadas como forma de tratamento não invasivo contra o câncer. A droga é fotoativada nas células tumorais, mantendo as células saudáveis inalteradas (ARMITAGE, 1998).

Complexos de Fe(II) fazem parte desta gama de compostos em estudo e muitos têm demonstrado alta atividade em relação à clivagem de biomoléculas (LIU et al., 2002; ROY et al., 2007; NEVES et al., 2010; WONG et al., 2010). Além disso, a fenantrolina e seus derivados são compostos que têm sido estudados por sua capacidade de interagir com DNA (PICH et al., 2009).

Deste modo, o presente trabalho elucidará a atividade de um novo complexo de Ferro, frente às moléculas de DNA e proteínas, seus mecanismos de ação e de interação com estas biomoléculas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os ácidos nucleicos são as moléculas responsáveis pelo controle dos processos metabólicos em todos os seres vivos e pela manutenção da hereditariedade. A estrutura do DNA (ácido desoxirribonucléico) é formada por duas cadeias de polinucleotídeos enoveladas em torno de um eixo na forma de uma dupla hélice, conforme desvendada, por James Watson e Francis Crick (1953) (Figura 1-A).

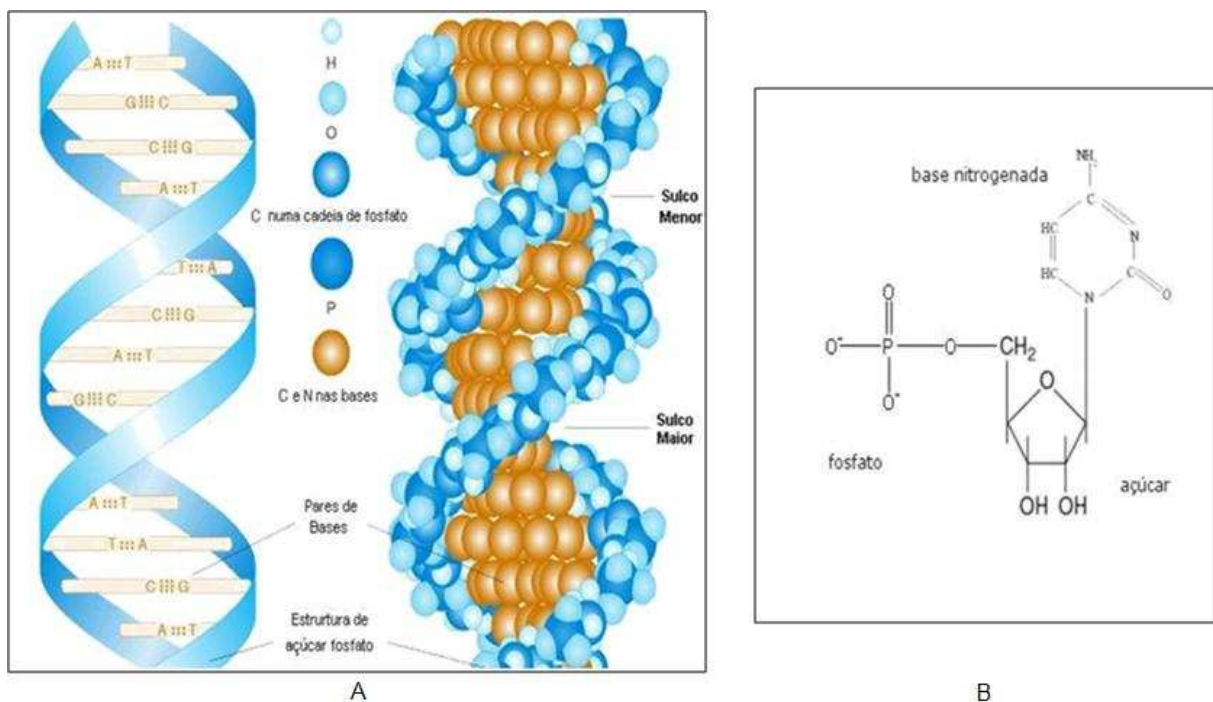


Figura 1. A - Estrutura em dupla hélice do DNA. B – Nucleotídeo (figura adaptada do site: <http://www.biomol.org> acessado em 21/11/2010.)

Os nucleotídeos são constituídos por uma base nitrogenada heterocíclica, uma pentose e um grupo fosfato (Figura 1-B). As sequências de bases contêm a informação genética, enquanto o açúcar e o fosfato têm um papel estrutural. As bases nitrogenadas são derivadas de anéis de purinas e pirimidinas. No DNA, as purinas são adenina (A) e guanina (G) e as pirimidinas são citosina (C) e timina (T) (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Além do DNA cromossômico, bactérias e alguns fungos podem apresentar uma ou mais moléculas circulares de DNA dupla fita muito menores que o DNA cromossômico. Essas moléculas ficam livres no citoplasma e recebem o nome de plasmídeos (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Os plasmídeos assumem diferentes formas após as quebras de suas fitas. Quando intactas, as fitas do DNA plasmidial estão altamente tensionadas, se mantendo na forma superenovelada (FI). Quando o plasmídeo superenovelado sofre uma ou mais quebras em uma das fitas há um afrouxamento em sua estrutura “super helicoidal” convertendo o plasmídeo para sua forma circular aberta (FII). No entanto, caso ocorra uma quebra dupla ou duas quebras simples o plasmídeo assume uma forma linear (FIII) (NAVARRO et al., 2003) (Figura 2 - A).

Essas formas são facilmente distinguíveis quando submetidas à eletroforese em gel de agarose (Figura 2 - B), pois possuem diferentes mobilidades eletroforéticas. A quantidade das formas pode ser distinguida pelo tamanho e intensidade luminosa da banda gerada no gel (densitometria) (OLIVEIRA, 2006). Sendo assim, a capacidade de clivar DNA por uma substância de interesse pode ser facilmente analisada por eletroforese em gel de agarose para identificação e quantificação das formas do plasmídeo.

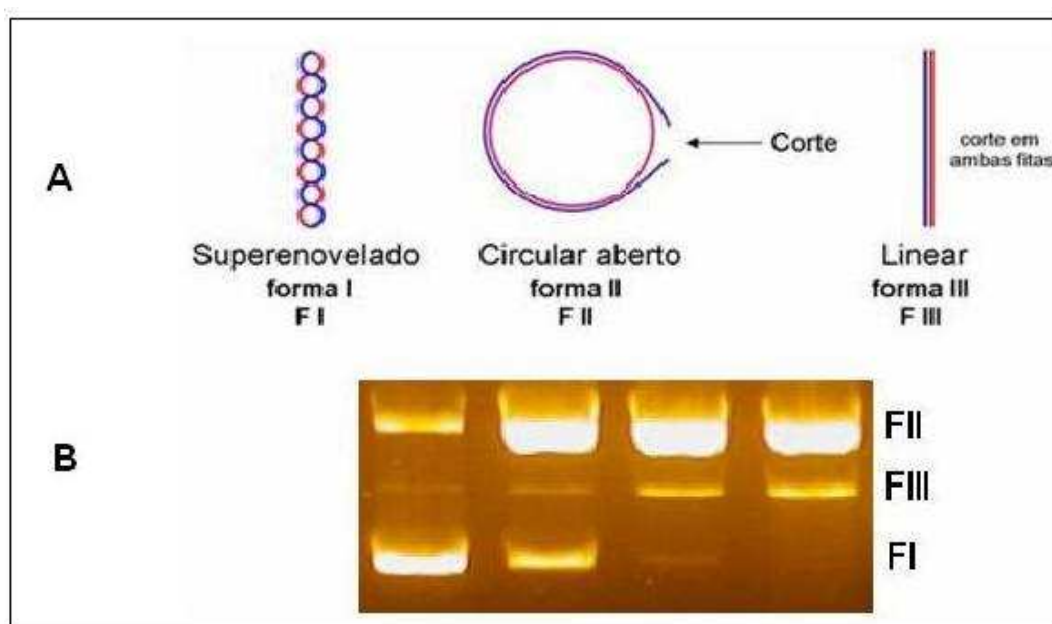


Figura 2. **A** – Diferentes formas do DNA plasmidial. **B** – Gel de agarose (0,8%) mostrando a separação das três formas distintas do plasmídeo visualizadas na forma de bandas: F I, F II e F III na ausência (controle) e presença de concentrações crescentes de um agente de clivagem (complexo) (B). Figura adaptada de Oliveira (2006) e Fischer (2007).

Moléculas sintéticas que clivem o DNA têm se destacado cada vez mais em várias técnicas biotecnológicas e são chamadas *nucleases sintéticas*.

Nucleases, conforme proposto por Sigman (1990): “São complexos de coordenação com atividade redox capazes de clivar ácidos nucléicos em condições fisiológicas, através de um ataque oxidativo no anel de ribose, ou desoxirribose”.

A clivagem de DNA ocorre normalmente por dois mecanismos: oxidativo e/ou hidrolítico. O mecanismo de hidrólise (Figura 3 – A) envolve geralmente o ataque nucleofílico do oxigênio de uma molécula de água ao fosfato ligado à pentose do ácido nucléico, gerando um fosfato intermediário pentacoordenado. Então ocorre uma ruptura da ligação fosfodiéster em P—O 5' ou P—O 3' dependendo do mecanismo de cada nuclease (BELOUSOFF et al., 2008). Já o mecanismo oxidativo (Figura 3 – B) ocorre conforme há a produção de radicais livres a partir de uma reação de oxi-redução entre o complexo metálico e oxigênio. Os radicais gerados se difundem no meio reacional e atacam preferencialmente a desoxirribose do DNA (TAN; WANG; ZHU, 2009). Além destes, alguns complexos atuam por outros mecanismos descritos, dependendo de diferentes meios reacionais, presença de agentes redutores ou de energia em diferentes comprimentos de onda (CHAKRAVARTY, 2006; LIU et al., 2008).

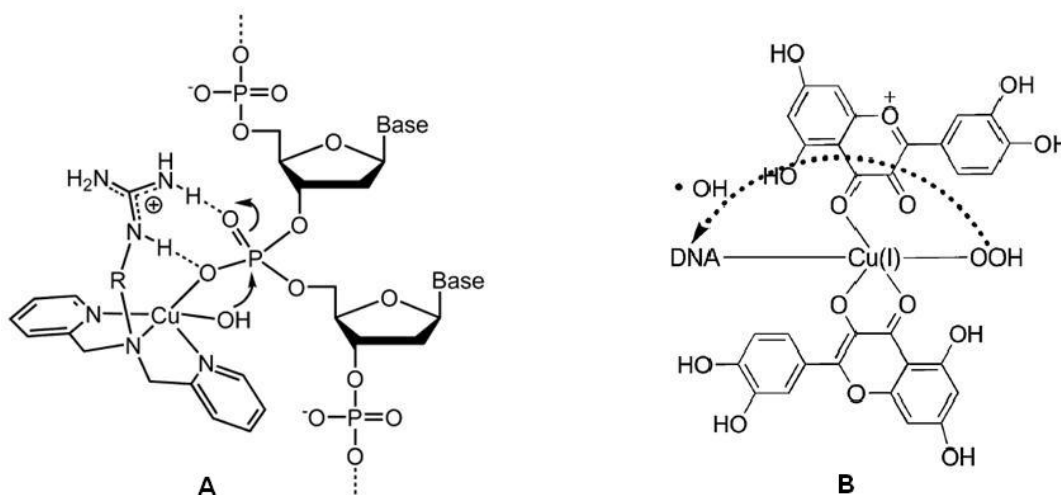


Figura 3. Mecanismos de clivagem de DNA: **A** – Hidrolítico (Figura retirada de Belousoff, 2008). **B** – Oxidativo (Figura retirada de Tan, 2009).

O papel dos metais nas nucleases varia de acordo com a estrutura do complexo, existindo fortes correlações entre a utilização de íons metálicos para aumento de afinidade da enzima por sítios específicos dos ácidos nucléicos e

estabilização dos grupos fosfato no esqueleto de ligações fosfodiéster (CONLAN; DUPUREUR, 2002).

Diversos complexos de metais de transição, como ferro(III), zinco(II) e cobre(II) e complexos de lantanídeos (NEVES et al., 2001; FISCHER, 2006; OLIVEIRA et al., 2007; SHENG et al., 2008) tiveram sua atividade como nucleases químicas descrita. Os ensaios com estes complexos ajudaram a entender não somente os mecanismos envolvidos em reações catalisadas por enzimas, como demonstraram propriedades que os tornam promissores agentes antitumorais (ROSENBERG et al., 1969), antimicrobianos (NAVARRO et al., 2003) ou atuando como nucleases e peptidases (MILOVIĆ; KOSTIĆ, 2002). Como exemplo, a Cisplatina (*cis* diaminodicloroplatina(II), *cis* [Pt(NH₃)₂Cl₂]), um complexo com comprovada atividade antitumoral (ROSENBERG et al., 1969).

Recentemente, tem sido estudada a interação de complexos metálicos com proteínas. Muitos complexos são citados na literatura como promissores agentes sintéticos capazes de clivar proteínas (DE OLIVEIRA et al., 2005; GOSWAMI et al., 2009; SASMAL et al., 2010), chamados de proteases. As proteínas utilizadas são geralmente escolhidas por serem de baixo custo e por sua fácil e rápida obtenção, como por exemplo a albumina sérica bovina (BSA), albumina sérica humana (HSA), lisozima de ovo de galinha, entre outras.

Alguns trabalhos mostram que um mesmo complexo pode ter atividade de nuclease e protease, aumentando as habilidades destes complexos, um fenômeno de 'promiscuidade catalítica' observado em enzimas, mas escassamente descrito em sistemas modelo sintéticos (OLIVEIRA, 2006; NEVES et al., 2010).

Além disso, alguns complexos têm sua atividade restrita à fotoindução, ou seja, clivam biomoléculas apenas quando irradiados por luz, o que os torna fortes candidatos a agentes para terapia fotodinâmica (TFD) (DAVIA et al., 2008; SUN et al., 2010) já que, desta forma, é possível controlar a ativação de seus estados reativos (OLSON et al., 1997). É importante ressaltar que estes complexos normalmente apresentam uma alta atividade de fotoclivagem de

DNA e alguns deles apresentam propriedades citotóxicas em algumas linhagens de células (MENON et al., 2004; ROY et al., 2007). Apesar de mostrar boa atividade, a maioria dos complexos age através de um mecanismo dependente de oxigênio, o que nem sempre é desejável, como em casos de células em hipóxia (BRADLEY et al., 2004), ou seja, com baixo teor de oxigênio.

A terapia fotodinâmica parte do princípio de que alguns compostos, após interação com luz, em comprimentos de onda adequados, produzem radicais capazes de interagir de alguma forma com as células. Este princípio foi descoberto por Raab (1900) ao verificar a morte de microorganismos tratados com corantes após expostos à luz. Originalmente a TFD foi desenvolvida visando ao tratamento do câncer em suas diversas formas. Porém, seu grande potencial em relação a outras doenças tem sido estudado cada vez mais. Nesse rol incluem-se a psoríase (LEVY, 1995), onde se têm atingido resultados promissores; remoção de verrugas na laringe, tratamento de micoses fungóides (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005) e destruição de infestações bacterianas resistentes a tratamentos tradicionais à base de antibióticos (ZANIN et al., 2005).

Em decorrência do relevante papel dos complexos metálicos como possíveis drogas terapêuticas, percebe-se a importância dos estudos de interação de complexos metálicos com DNA e proteínas, visando ao desenvolvimento de novas ferramentas moleculares.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a interação e clivagem de biomoléculas pelo novo complexo metálico tris-([1,2,5]-tiadiazolo-[3,4-f] - [1,10]-fenantrolina Ferro (II)) hexafluorofosfato **(1)**.

3.2 Específicos

- Verificar a capacidade de clivagem de DNA e proteínas pelo complexo **(1)** em diferentes condições, como: concentração do complexo, pH, tempo de exposição, influência de luz UV e temperatura;
- Avaliar o mecanismo de atuação do complexo na clivagem de DNA por meio da adição de sequestradores de radicais livres e de ligantes específicos do sulco menor e maior de DNA às reações e na presença e ausência de oxigênio.
- Calcular os parâmetros cinéticos das reações de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo.
- Determinar a interação do complexo com DNA por meio de técnicas como: titulação espectrofotométrica, desnaturação térmica e dicroísmo circular (CD).

4. METODOLOGIA

4.1. Complexo metálico

Os estudos de interação e clivagem de DNA e proteínas foram realizados com o complexo *tris*-([1,2,5]-tiadiazolo-[3,4-*f*] - [1,10]-fenantrolina Ferro (II)) hexafluorofosfato (Figura 4). Este complexo foi sintetizado por Fernando Xavier, sob orientação do professor Ademir Neves do grupo do *LABINC* - Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia – Departamento de Química - UFSC e gentilmente disponibilizado para os testes. A molécula consiste de um centro de FeII cercado por três unidades do ligante, com seis pontos de coordenação, numa estrutura octaédrica distorcida, descrita por de Souza e colaboradores (SOUZA et al., 2010).

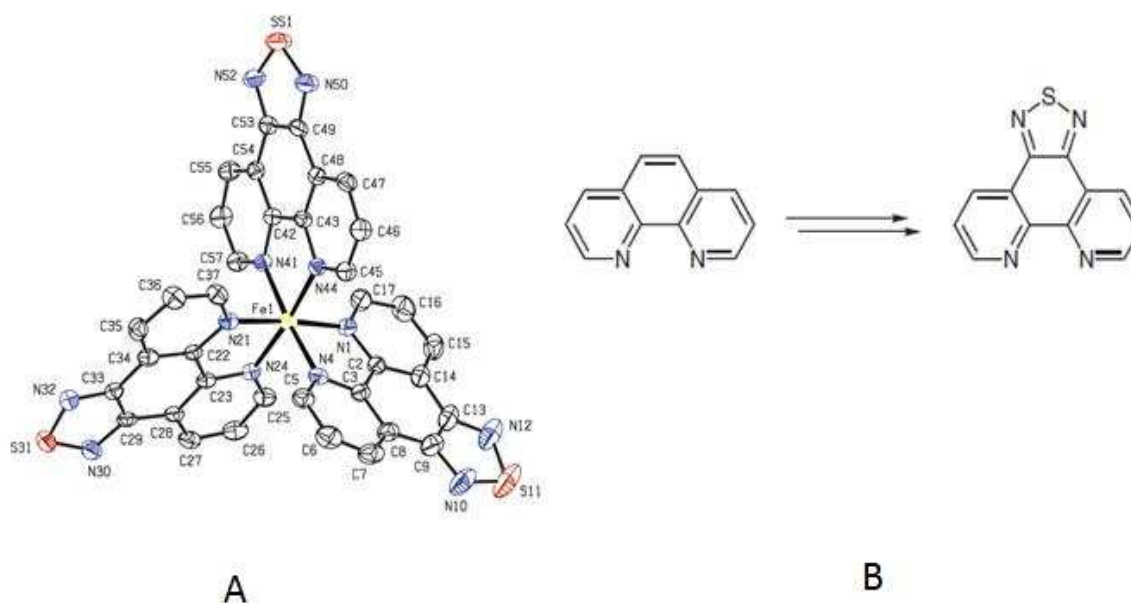


Figura 4. **A** - Estrutura cristalina do complexo *tris*-([1,2,5]-tiadiazolo-[3,4-*f*] - [1,10]-fenantrolina Ferro (II)) hexafluorofosfato. **B** - Ligante tdzp

O ligante tdzp foi sintetizado de acordo com o método descrito por Conte, Bortoluzzi e Gallardo (2007). O complexo *tris*-{[1,2,5] tiadiazolo-[3,4-*f*] - [1,10] fenantrolina (II) hexafluorofosfato (1) foi obtido pela adição de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e TBAPF_6 a uma solução de DMSO contendo o ligante. Dias depois, monocristais vermelho-escuros adequados para a análise de raios X foram obtidos.

4.2 DNA plasmidial

Foi utilizado como modelo de molécula de DNA o plasmídeo pBluescript® II SK(+) (pBSK-II), obtido comercialmente (Stratagene). Este foi inserido em células de *Escherichia coli* DH5 α competentes por choque térmico e realizada a extração de DNA plasmidial com um kit comercial, HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit, QIAGEN, seguindo protocolo padrão do fabricante (QIAGEN, 2001) (Figura 5).

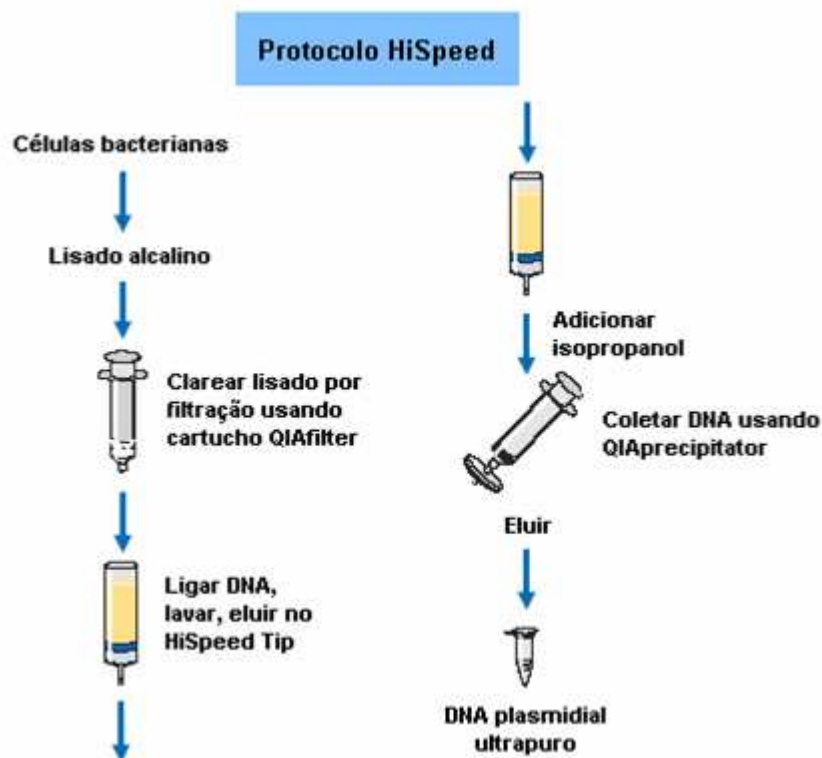


Figura 5: Esquema do método de extração de DNA do kit HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit, QIAGEN. Figura extraída de Oliveira (2006)

As amostras foram observadas em gel de agarose 0,8%. O DNA foi quantificado em um espectrofotômetro (Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience) e congelado até o uso.

4.2.1 Testes de clivagem de DNA

A capacidade do complexo de clivar DNA foi verificada através da incubação de diferentes concentrações do complexo com 350 ng de DNA superenovelado (pBSK-II), num volume final de reação de 20 μ L, o que corresponde a uma concentração de DNA de 26,5 μ M, em pares de bases (pb). Foram realizados ensaios em diferentes pH's, concentrações de complexo e

condições (escuro e luz UV 365 nm), até se determinar as concentrações finais de complexo ideais para os ensaios seguintes de 4 e 6 μM , pH 7,0 (tampão PIPES) e 5 minutos de exposição em luz UV (365nm). Nas mesmas condições determinadas para o complexo, foi feito um ensaio comparativo, utilizando apenas o ligante no lugar do complexo.

Também foi realizado um ensaio com adição do agente redutor MPA ao meio reacional, com o intuito de desvendar a influência da redução do Fe na atividade do complexo (NEVES et al., 2000).

Ao término do período de incubação as reações foram interrompidas pela adição de 5 μL de tampão de corrida 6X concentrado (EDTA 0,25 M, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01% - pH 8,0) e imediatamente resfriadas em gelo. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose.

4.2.2 Eletroforese em gel de Agarose

A agarose é um polissacarídeo extraído de certos gêneros de algas vermelhas do gênero *Rhodophyceae*. Este polissacarídeo consiste na repetição do dissacarídeo formado entre os resíduos de β -D-galactose (ligado pelas posições 1,3) e 3,6-anidro- α -L-galactose (ligado pelas posições 1,4), como representado na Figura 6 (A). A agarose quando dissolvida em água fervente e depois resfriada, forma um gel com o aspecto representado na Figura 6 (B). Neste processo são formadas duplas hélices que se unem lateralmente para formar filamentos relativamente finos, formando, assim, poros. Estes poros têm seu tamanho variado de acordo com a concentração do gel, ou seja, quanto mais concentrado em agarose, menor o tamanho dos poros. Devido a esta característica é possível relacionar o tamanho das moléculas de DNA (linear) com a concentração do gel de agarose, de maneira que se consiga uma separação eficiente.

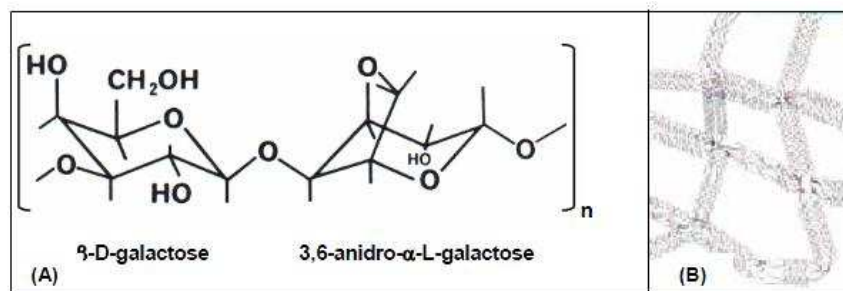


Figura 6. Estrutura da agarose. **(A)** Estrutura química da unidade de repetição da agarose; **(B)** Malha formada pelo gel polimerizado.

Porém, não só o tamanho da molécula de DNA é importante na separação num gel de agarose, mas também a forma desta molécula. As formas **F I**, **F II** e **F III** de um DNA plasmidial possuem o mesmo tamanho, porém migram com velocidades distintas quando submetidas a uma diferença de potencial, devido a diferenças na sua conformação ou compactação.

A preparação dos géis de agarose foi feita a partir da dissolução, sob aquecimento em forno de microondas, da quantidade necessária de agarose para um gel com concentração de 0,8 % (m/v), em tampão TBE 0,5 X (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM – pH 8,0). Após resfriamento da solução até aproximadamente 40°C, foi adicionado o brometo de etídio (concentração final de 0,3 µg/ml), a solução resultante foi despejada numa forma adequada para dar formato ao gel e adicionados pentes plásticos para formação dos poços para aplicação das amostras. Após o resfriamento total, os géis resultantes foram levados para uma cuba de eletroforese horizontal (modelo Horizon® 11-14, Life Technologies™ ou Sub-Cell® GT, BioRad) contendo tampão TBE 0,5 X (AUSUBEL et al., 1999).

Foram aplicados 20 µL de cada amostra nos poços do gel, Figura 7, em seguida foi aplicado uma tensão de 90V por aproximadamente 1 hora, ou até que a frente de migração (azul de bromofenol) atingisse o final do gel. As fontes de corrente contínua Life Technologies™ modelo 250 ou 250EX foram utilizadas.

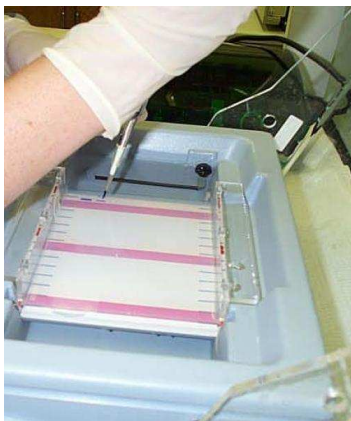


Figura 7: Cuba de eletroforese e aplicação da amostra no gel.

Os géis foram fotografados utilizando-se um sistema de fotodocumentação e as frações de cada forma foi quantificada por densitometria (Figura 8) utilizando o software KODAK Molecular Imaging Software 5.0 (Carestream Health USA). Os ensaios têm um controle negativo em condições iguais às misturas reacionais, porém sem adição do complexo.

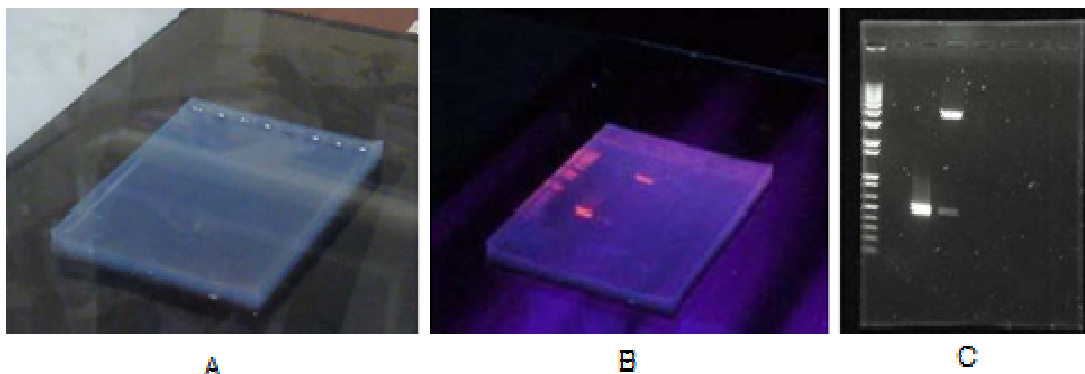


Figura 8: **A:** Gel de agarose contendo amostras, **B:** Gel depois de submetido à eletroforese, sobre luz UV para fotodocumentação. **C:** Imagem do gel obtida por equipamento de fotodocumentação.

4.2.3 Ligantes de sulcos do DNA

A distamicina e o verde de metila são moléculas que se ligam especificamente ao sulco menor e maior do DNA, respectivamente (VAN DYKE; HERTZBERG; DERVAN, 1982; KIM; NORDEN, 1993). A inibição da clivagem demonstra por qual dos dois sulcos ocorre a interação e consequente clivagem. Então, para verificar se o complexo atua por algum dos sulcos do DNA, este foi pré-tratado por 30 min. à temperatura ambiente com distamicina (50 μ M) e verde de metila (50 μ M) e posteriormente tratado com os complexos nas condições reacionais definidas.

4.2.4 Inibidores de radicais livres

Para tentar compreender o mecanismo de clivagem de DNA, foram realizadas reações de clivagem, adicionando a elas, uma série de inibidores de radicais (ROSSI et al., 2002), conforme descritos na literatura:

- NaN_3 (azida de sódio): sequestrador de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$);
- Enzima SOD (superóxido-dismutase): sequestrador do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$);
- KI (iodeto de potássio): inibidor da geração de peróxidos (R-O-OH) ;
- TEMPO (*N*-oxil-2,2,6,6- tetrametilpiperidina): sequestrador de radicais carbono- e metalo-centrados (MOHLER et al., 2005).

4.2.4 Presença e Ausência de Oxigênio

Com o intuito de verificar qual a influência do oxigênio molecular na clivagem de DNA pelo complexo foram realizados testes de clivagem, nas condições definidas, porém em ausência de Oxigênio, em “glove-bags” com argônio. As soluções foram desgaseificadas com bomba de vácuo e, em seguida, borbulhadas com argônio. Também foi realizado um controle positivo, com o complexo $\text{Fe}(\text{EDTA})^{-2}$ e agente redutor DTT em DNA, pois este complexo já é conhecido por clivar DNA somente em presença de oxigênio molecular (DHAR; CHAKRAVARTY, 2003).

4.2.6 Efeito da força iônica

O efeito da força iônica na clivagem de DNA plasmidial pelo complexo foi verificado pela adição de concentrações crescentes (0 a 300 mM) de Cloreto de Sódio (NaCl) e Perclorato de Lítio (LiClO_4) às misturas reacionais.

4.2.7 Cinética de clivagem de DNA

Para determinar os parâmetros cinéticos da clivagem de DNA pelo complexo, foram realizados ensaios em intervalos de tempo definidos e com variação da concentração do complexo. O tratamento dos dados foi realizado através do método de Lineweaver-Burke para a obtenção da constante catalítica (k_{cat}), velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) 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 ($f = k_{\text{cat}} / k_{\text{não catalisada}}$) e a eficiência catalítica ($E = k_{\text{cat}} / K_m$) (SREEDHARA; COWAN, 1998).

Também foi realizado um ensaio comparativo entre a atividade do complexo por 25 horas no escuro e 1 minuto em UV.

4.3 Proteínas

Nos ensaios de clivagem de proteína foram utilizadas as proteínas albumina sérica bovina (BSA) e TRP (transtirretina).

A proteína BSA foi obtida comercialmente (SIGMA - A-4503) e escolhida por se tratar de uma proteína bastante estudada e já caracterizada, além de ser comercialmente barata. A albumina é uma proteína monomérica que atua como carreadora de substâncias e compõe cerca de 50% do conteúdo protéico do soro sanguíneo.

A proteína TRP - transtirretina (*transthyretin related proteins*) foi purificada por nosso grupo (MATIOLLO et al., 2009) e foi escolhida para os ensaios por ser uma proteína menor que a BSA, possivelmente assim, permitindo uma melhor aproximação pelo complexo. TRPs são conhecidas por exercerem um papel na via de degradação de purinas e funcionarem como 5-hidroxi-isourato hidrolases (HIUHase) na via de degradação do ácido úrico

4.3.1 Testes de clivagem de proteína

Os ensaios com proteínas foram realizados assim como com DNA. As proteínas foram tratadas com diferentes concentrações do complexo em diferentes tempos de reação e de exposição à luz UV.

As reações de clivagem foram paradas pela adição do tampão de corrida 5x (Tris 100 mM, SDS 7%, glicerol 40%, β -mercaptoetanol 2% e azul de bromofenol 0,01% - pH 6,8) e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS – PAGE.

4.3.2 SDS-PAGE

Os géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) são fisicamente mais rígidos do que os géis de agarose. O gel é formado pela copolimerização radicalar da acrilamida com N,N'-metilenobisacrilamida, que é um agente de ligação

cruzada. Os radicais livres são gerados pela decomposição química do persulfato de amônio (APS), sendo então estabilizados pela adição de N,N,N',N'- tetrametiletenodiamina (TEMED). Em separações por SDS-PAGE a migração é determinada pelo peso molecular.

A metodologia empregada na preparação do gel é baseada no sistema descontínuo descrito por Laemmli (1970). Neste sistema as amostras atravessam um gel que é formado por duas zonas de composições distintas, o gel de empilhamento e o gel de separação. No gel de empilhamento a amostra é concentrada em uma banda estreita, devido à baixa concentração de poliacrilamida (poros grandes) e ao pH 6,8, mas quando esta atinge o gel de separação, que possui poros menores (maior concentração de poliacrilamida) e pH 8,8, as cadeias polipeptídicas presentes na amostra começam a ser separadas de acordo com seu peso molecular. Após a corrida, o gel foi depositado em uma solução de fixação, para corar as bandas, com o corante coomassie brilliant blue R250 (CBR-250)(MORRISSEY, 1981). A Figura 9 ilustra a técnica de SDS-PAGE.

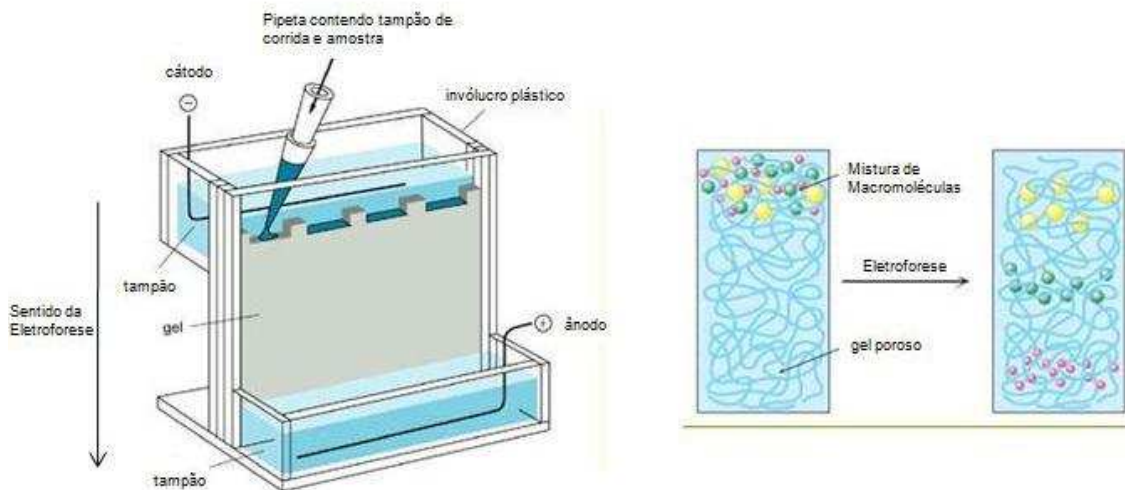


Figura 9: Ilustração da SDS – PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida).

Os géis foram fotografados por sistema de fotodocumentação e as frações da forma intacta das proteínas foram quantificadas por densitometria utilizando o software KODAK Molecular Imaging Software 5.0 (Carestream Health USA). Os ensaios têm um controle negativo em condições iguais às misturas reacionais, porém sem adição do complexo.

4.4 Interações com DNA

Os testes para avaliar as formas de interação do complexo com DNA foram efetuados com CT-DNA (Calf Timus DNA – DNA do timo de bezerro).

4.4.1 Titulação espectrofotométrica

Para analisar a interação do complexo com CT-DNA foram realizadas titulações espectrofotométricas. A reação foi preparada com tampão PIPES e concentração fixa do complexo (0,2 μ M) em uma cubeta. Obteve-se o espectro eletrônico UV-Vis do complexo na faixa de 200 a 400nm e suas alterações com a adição de concentrações crescentes de CT-DNA. Após um minuto de cada adição foi feita a medida espectrofotométrica.

4.4.2 Desnaturação térmica de CT-DNA

Para demonstrar se há a interação do complexo com DNA, foi observada a alteração causada pelo complexo no perfil de desnaturação térmica de CT-DNA. Foi obtido espectro UV-Vis de uma solução de CT-DNA e outra contendo [CT-DNA]/[Complexo] numa razão igual a 10 e com variação da temperatura de 1 grau por minuto de 40 a 90°C. Permitindo determinar a temperatura de desnaturação do DNA (T_m), pela transição hipercrômica (aumento da intensidade da absorção), na presença e na ausência do complexo.

4.4.3 Dicroísmo Circular (CD)

O dicroísmo circular é uma técnica utilizada para determinar a estrutura secundária de proteínas e a conformação helicoidal e empilhamento das bases do DNA (PROVENCHER; GLOECKNER, 1981; LIMA, 2008). Para tanto, foram determinados os espectros de luz polarizada de CT-DNA (100 μ M) e observadas as alterações causadas por concentrações crescentes de complexo, utilizando o espectropolarímetro JASCO (J-815) de dicroísmo circular.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DNA Plasmidial

5.1.1 Clivagem de DNA Plasmidial

Foram realizados ensaios utilizando DNA plasmidial em 25 mmol.L^{-1} de tampão PIPES pH 7,0 e em solução aquosa de água/DMSO 3:1. Sob essas condições, depois de cinco minutos de incubação, sob luz de 365 nm UV (12W), 22°C , uma solução $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do complexo foi capaz de clivar o DNA superenovelado para DNA circular (81,2%) e linear (6,5%) (Figura 10). Porém, esta reação no escuro, não mostrou qualquer possível clivagem de DNA plasmidial, mesmo após um período de incubação mais longo, 16 horas a 37°C .

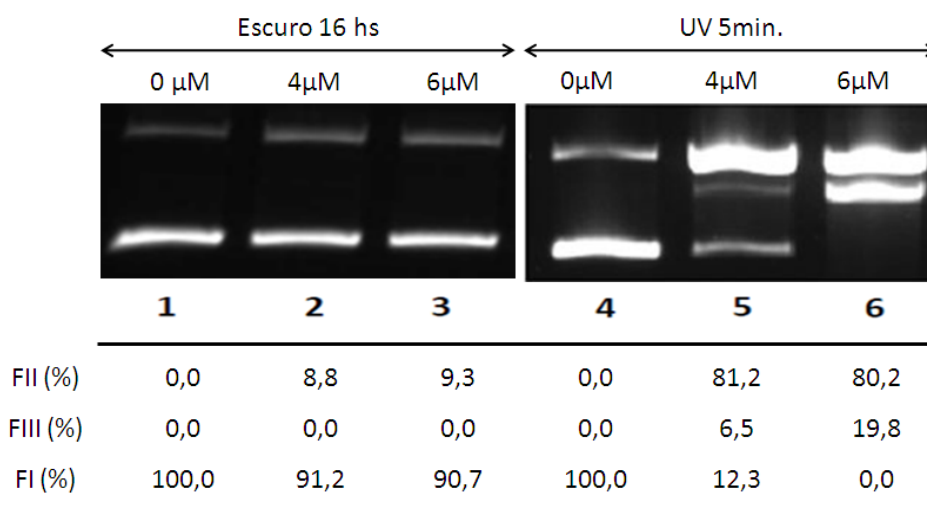


Figura 10: Atividade de **1** em 25 mmol L^{-1} tampão PIPES, pH 7.0 em $\text{H}_2\text{O/DMSO}$ (3 : 1 v/v) por 5 min. em temperatura ambiente sob luz UV de 365 nm. Poço 1: Controle DNA; Poços 2 e 3: reação (DNA + **1** - $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $6 \mu\text{mol L}^{-1}$) por 16 horas a 37°C . Poço 4: Controle DNA; Poços 5 e 6: reações (DNA + **1** - $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $6 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Como o ligante tdzp é um derivado da fenantrolina e esta tem sua capacidade de interagir com DNA já bastante conhecida (PICH et al., 2009), foi realizado um teste substituindo-se o complexo pelo ligante para verificar se este tem capacidade de clivagem de DNA (Figura 11). Pode-se perceber que o ligante possui capacidade de clivagem de DNA, porém muito inferior à do complexo, mostrando que o centro metálico tem muita influência na atividade de **1**.

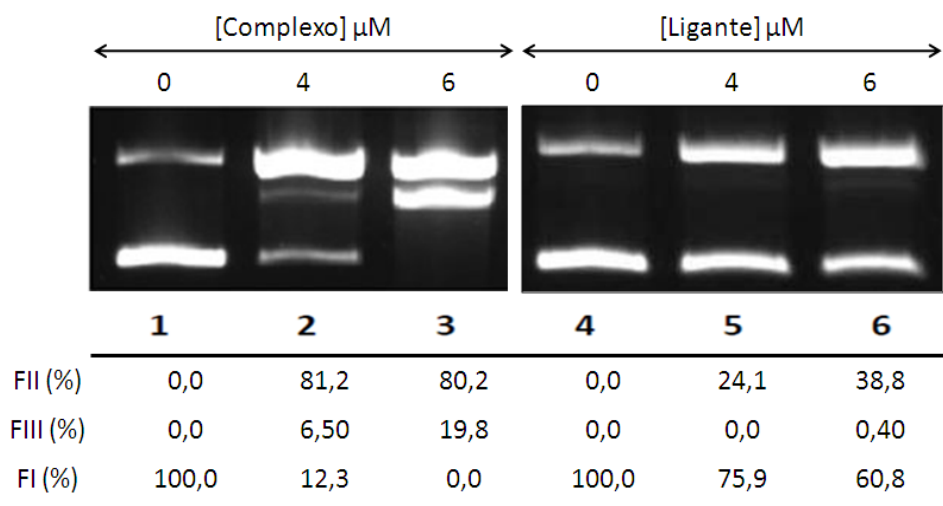


Figura 11: Atividade de **1** em 25 mmol L⁻¹ tampão PIPES, pH 7.0 em H₂O/DMSO (3 : 1 v/v). Poço 1: Controle DNA ; Poço 2 e 3: reações (DNA + **1** a 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 5 min. em temperatura ambiente sob luz UV de 365 nm. Poço 4: Controle DNA; Poços 5 e 6: reações (DNA + Ligante a 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 5 min. em temperatura ambiente sob luz UV de 365 nm.

O teste de clivagem utilizando o agente redutor MPA (60 $\mu\text{mol L}^{-1}$), por 1 hora, mostrou que mesmo com a presença do redutor não há clivagem do DNA pelo complexo em condições de escuro (Figura 12).

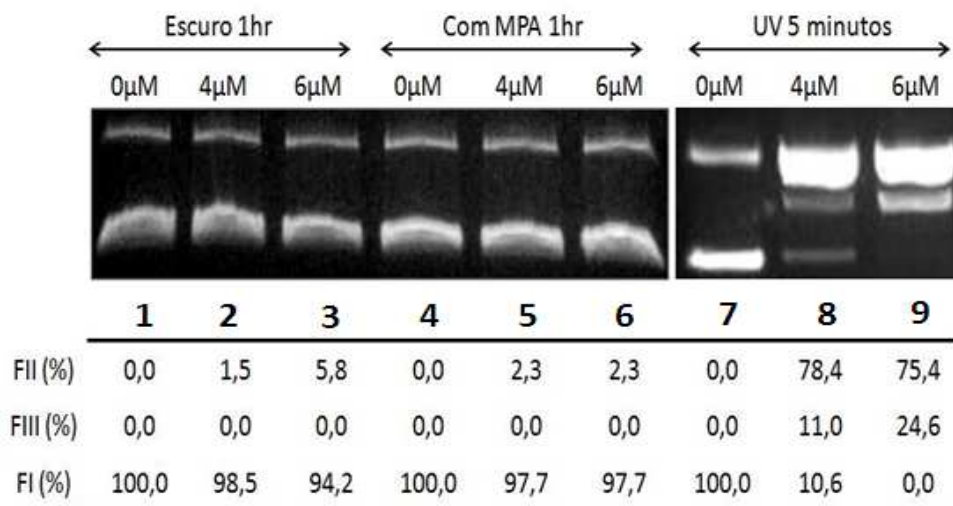


Figura 12: Atividade de **1** em 25 mmol L⁻¹ tampão PIPES, pH 7.0 em H₂O/DMSO (3 : 1 v/v). Poço 1: Controle DNA; Poço 2 e 3: reações (DNA + **1** a 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 1 hora 37°C. Poço 4: Controle DNA; Poços 5 e 6: reações (DNA + MPA + **1** a 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 1 hora a 37°C. Poço 7: Controle DNA ; Poços 8 e 9: reações (DNA + **1** a 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 5 min. em temperatura ambiente sob luz UV de 365 nm.

5.1.2 Inibidores de radicais e ligantes de sulco

A investigação do mecanismo da reação de fotoclivagem do DNA mostrou que não houve inibição da atividade por Distamicina, enquanto Verde de Metila inibiu a clivagem, indicando uma preferência considerável do complexo pelo sulco maior do DNA (Figura 13).

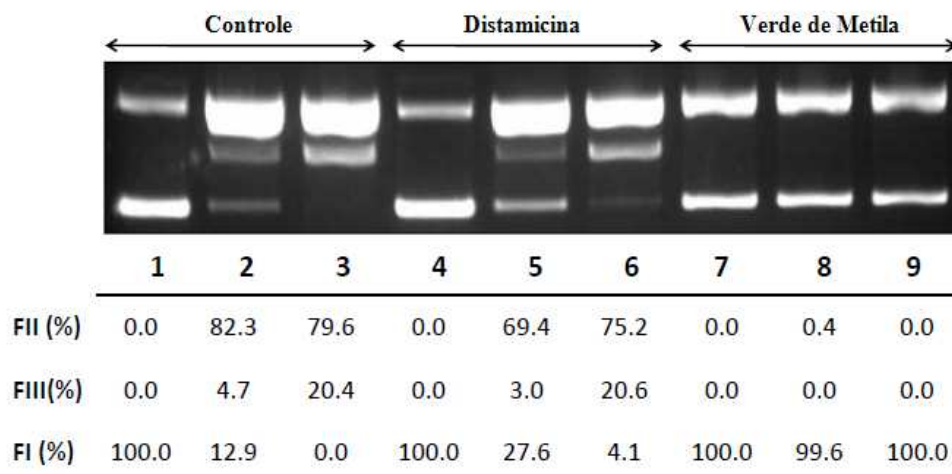


Figura 13: Influência dos ligantes dos sulcos do DNA ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) na atividade clivagem de DNA de **1** em 25 mmol L^{-1} tampão PIPES, pH 7.0 em $\text{H}_2\text{O/DMSO}$ (3 : 1 v/v) por 5 min. em luz UV light (365 nm) e temperatura ambiente. Poços 1, 2 e 3: Controle, DNA + **1** ($4 \mu\text{mol L}^{-1}$) e DNA + **1** ($6 \mu\text{mol L}^{-1}$), respectivamente. Poços 4, 5 e 6: Controle com Distamicina, DNA + Distamicina + **1** ($4 \mu\text{mol L}^{-1}$) e DNA + Distamicina + **1** ($6 \mu\text{mol L}^{-1}$), respectivamente; Poços 7, 8 e 9: Controle com Verde de Metila, DNA + Verde de Metila + **1** ($4 \mu\text{mol L}^{-1}$) e DNA + Verde de Metila + **1** ($6 \mu\text{mol L}^{-1}$), respectivamente.

A adição de sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ROS) como NaN_3 , superóxido dismutase (SOD) e KI não inibiu a fotoclivagem (Figura 14).

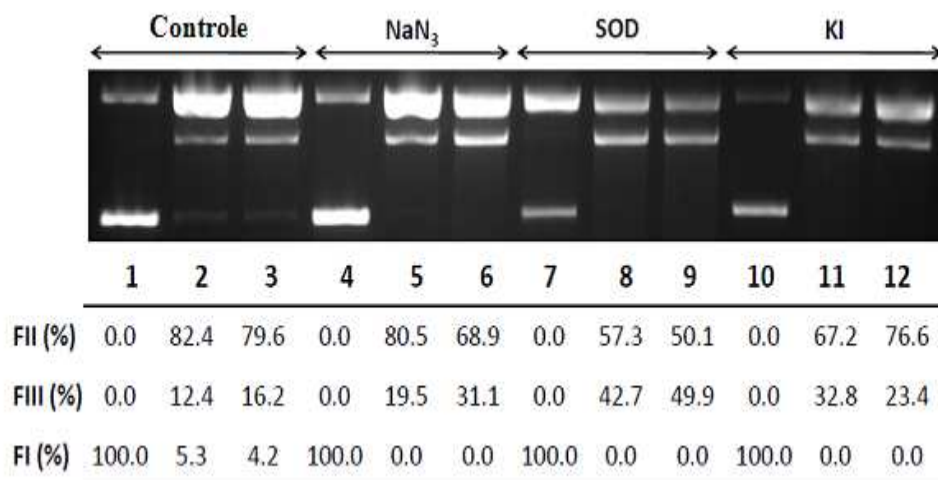


Figura 14: Atividade de clivagem de DNA por 1 em ausência (poços 1-3) ou presença (poços 4-12) de diferentes sequestradores de espécies reativas de oxigênio em 25 mmol L⁻¹ tampão PIPES, pH 7.0 em H₂O/DMSO (3 : 1 v/v) por 5 min. em luz UV 365 nm e temperatura ambiente. Poços 1, 4, 7 e 10: Controles (DNA); Poços 2, 5, 8 e 11: DNA + 1 (4 μmol L⁻¹); Poços 3, 6, 9 e 12: DNA + 1 (6 μmol L⁻¹). Os compostos usados como sequestradores: Poços 4-6: NaN₃ (500 μmol L⁻¹); Poços: 7-9: SOD (15 unidade para volume final de 20 μmol L⁻¹); Poços 10-12: KI (500 μmol L⁻¹).

Para investigar a possível participação de outros radicais sobre o processo de clivagem, experimentos adicionais foram conduzidos na presença de 2,2,6,6-tetrametil-1 piperdinoxil (TEMPO) e pode-se verificar que a quantidade de DNA clivado diminuiu consideravelmente, sugerindo que radicais metalo ou carbono centrados desempenham um papel fundamental na clivagem foto-induzida do DNA pelo complexo (Figura 15).

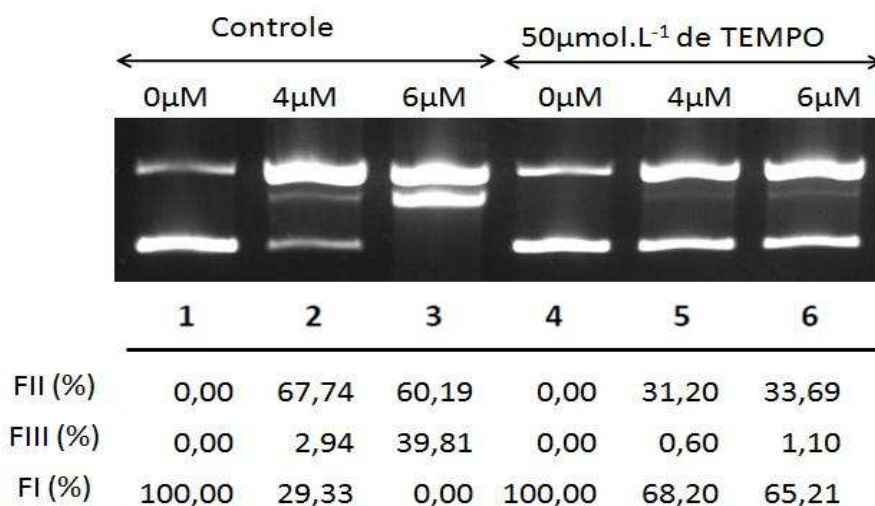


Figura 15: Atividade de clivagem de DNA de **1** em ausência (poços 1-3) ou presença (poços 4-6) do inibidor TEMPO em 25 mmol L⁻¹ tampão PIPES, pH 7.0 em H₂O/DMSO (3 : 1 v/v) por 5 min. em luz UV 365 nm e temperatura ambiente. Poços 1,e 4: Controle DNA; Poços 2 e 5: DNA + **1** (4 $\mu\text{mol L}^{-1}$); Poços 3 e 6: DNA + **1** (6 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

5.1.3 Presença e Ausência de Oxigênio

Em atmosfera livre de oxigênio a atividade do complexo não é reduzida indicando um mecanismo de clivagem totalmente independente do oxigênio. (Figura 16).

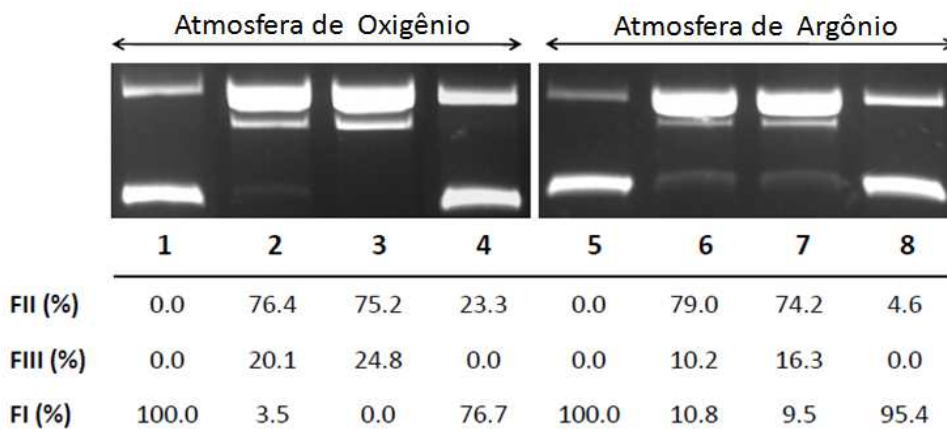


Figura 16: Atividade de clivagem de DNA de **1** em 25 mmol L⁻¹ tampão PIPES, pH 7.0 em H₂O/DMSO (3 : 1 v/v) em presença (poços 1 a 4) e ausência de Oxigênio (poços 5 a 8) por 5 min. em luz UV 365 nm e temperatura ambiente. Poços 1 e 5: Controle DNA. Poços 2 e 6: reações (DNA + **1** a 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Poços 3 e 7: reações (DNA + **1** a 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Poços 4 e 8: 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Fe-EDTA + 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ DTT.

Os ensaios em que foi adicionado o inibidor TEMPO ao teste em atmosfera de Argônio nota-se a inibição na atividade de **1** foi alta, indicando que em atmosfera inerte, radicais metalo ou carbono centrados têm papel essencial na atividade de fotoclivagem de DNA pelo complexo. (Figura 17)

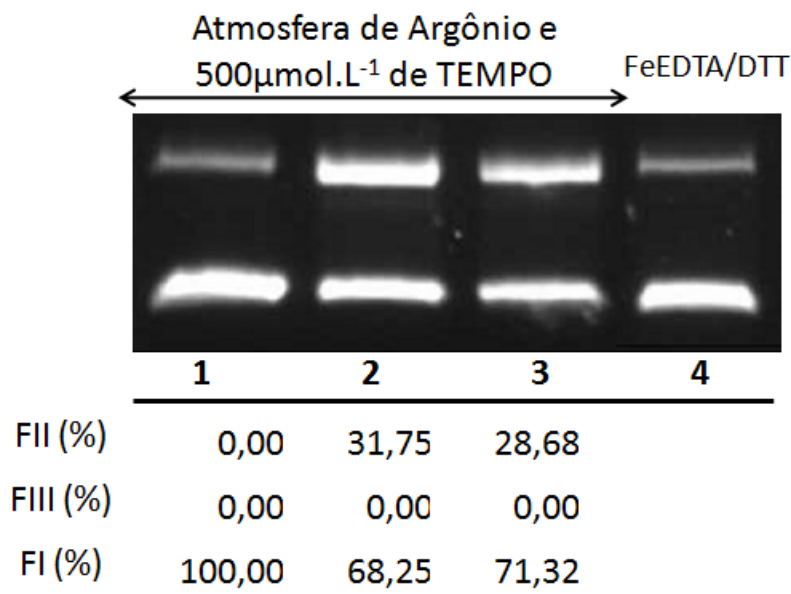


Figura 17: Atividade de clivagem de DNA de **1** em 25 mmol L^{-1} tampão PIPES, pH 7.0 em $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (3 : 1 v/v) e ausência de Oxigênio por 5 min. em luz UV 365 nm e temperatura ambiente. Poço 1: Controle DNA. Poços 2 e 3: reações (DNA + **1** a 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Poços 5: 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Fe-EDTA + 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DTT.

5.1.4 Força Iônica

Finalmente, o efeito da força iônica na fotoclivagem DNA foi determinado pela observação da diminuição da atividade em concentrações crescentes dos sais NaCl e LiClO_4 (ATKINS; PAULA, 2008). A inibição da atividade do complexo foi mais acentuada pelo sal NaCl, porém há inibição com ambos os sais, sugerindo que há a contribuição de interações eletrostáticas na clivagem foto-induzida do DNA (Figura 18).

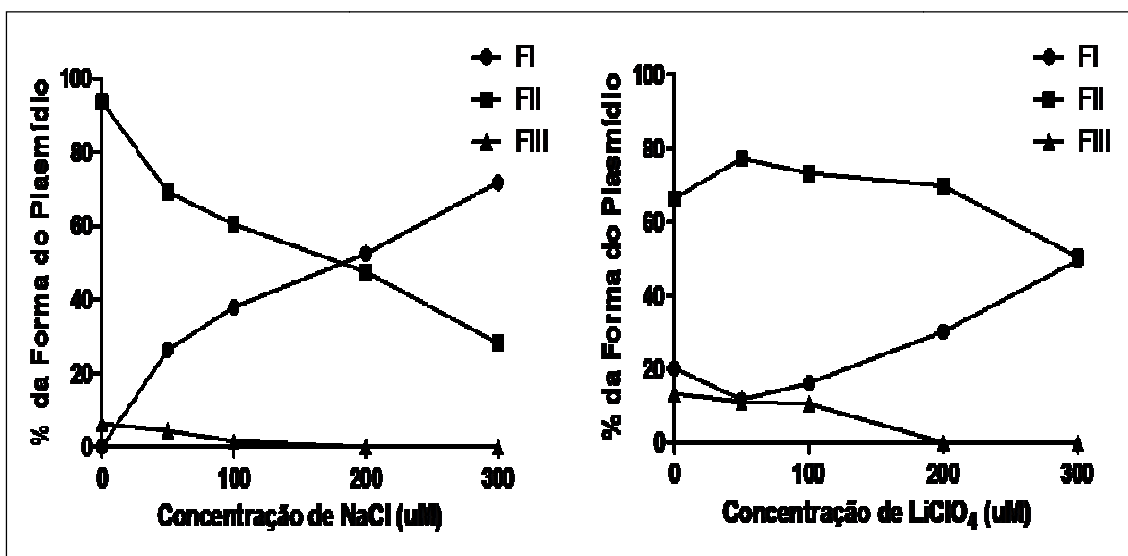


Figura 18: Efeito da força iônica na atividade de fotoclivagem de DNA do complexo **1** em 25 mmol L^{-1} tampão PIPES, pH 7.0 em $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (3 : 1 v/v) por 5 min. em luz UV (365 nm) e

temperatura ambiente e acréscimo de concentrações crescentes de sal: 0, 50, 100, 200 e 300 mmol.L⁻¹.

Com base em todos os resultados obtidos e os mecanismos considerados pode-se propor que o mecanismo de ação deste complexo sobre a molécula de DNA é uma oxidação direta das bases do DNA promovida pelo estado excitado do composto, causado por sua irradiação com luz UV (Figura 19).

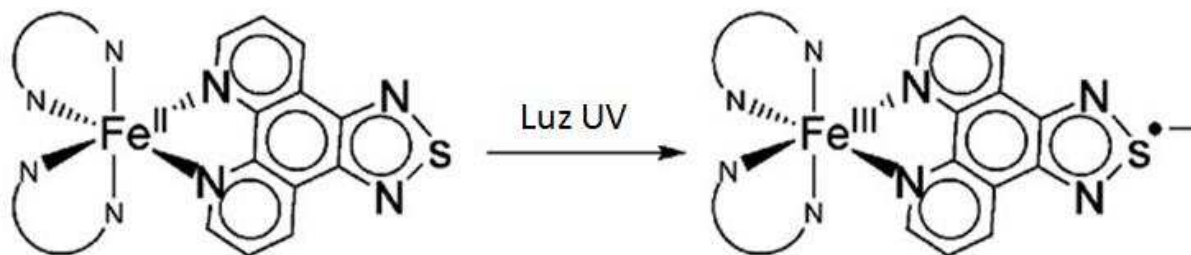


Figura 19: Proposta de radical formado no estado excitado do complexo, induzido por luz UV 365nm. Figura extraída de (DE SOUZA et al., 2010)

5.1.5 Cinética de clivagem de DNA

Para os ensaios cinéticos, utilizando-se os cálculos de pseudo-Michaelis-Menten, os parâmetros cinéticos encontrados ($k_{cat} = 18,86 \text{ h}^{-1}$) mostram que o complexo apresenta uma taxa de aumento de cerca de $5,23 \times 10^8$ vezes da reação não catalisada de clivagem de DNA ($k = 3,6 \times 10^{-8} \text{ h}^{-1}$). Além disso, a eficiência catalítica é $6,6 \times 10^7 \text{ h}^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ e o tempo de meia vida estimado do DNA superenovelado, em presença de 1 é de 2,2 min.

O experimento realizado no escuro, na ausência e na presença do complexo, comparando 25 horas de escuro com 1 minuto de exposição à luz UV, indicou que a atividade do complexo é aproximadamente 6.000 vezes maior quando exposto à luz. (Figura 20).

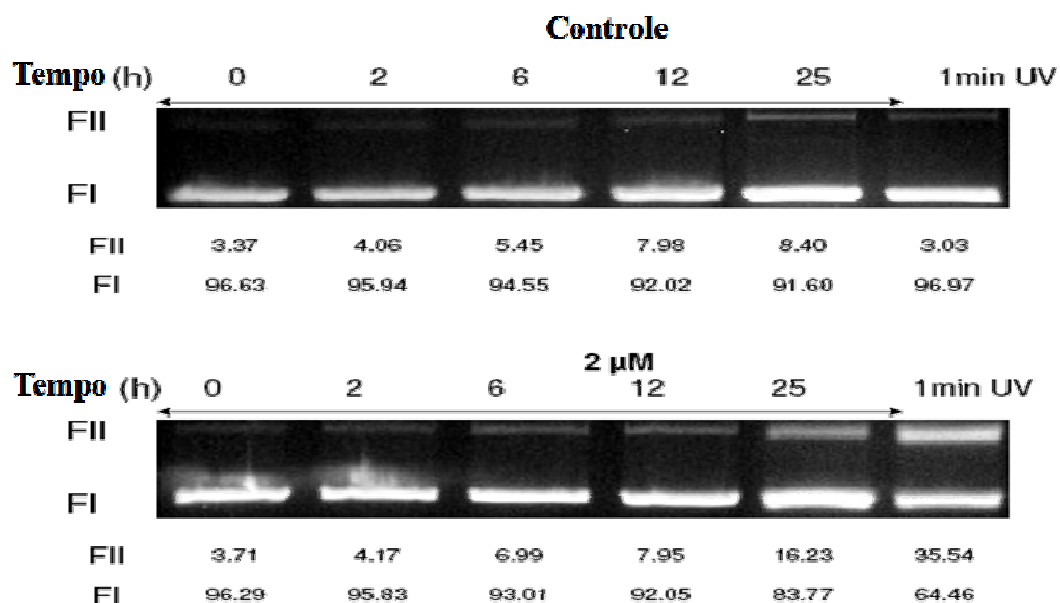


Figura 20: Comparação da foto clivagem de DNA pelo complexo em 25mmol.L⁻¹ tampão PIPES pH 7,0 , em ausência e presença de 1, em diferentes tempos de escuro e 1 minuto de UV 365nm.

5.2 Proteínas

A capacidade de 1 em clivar proteínas foi analisada em condições semelhantes às dos ensaios em DNA, porém, as concentrações de complexo utilizadas foram muito maiores (320, 480 e 680 μmol L⁻¹). Levando-se em consideração que a luz UV também degrada as proteínas (controles), o complexo parece não ter habilidade para clivar proteínas (Figuras 21 e 22), tanto em condições de escuro quanto após exposição à luz UV 365nm por 20 minutos.

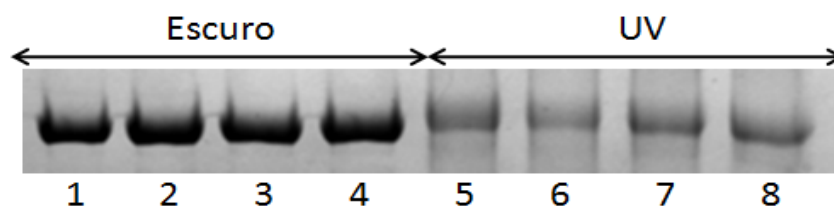


Figura 21: Atividade de 1 sobre BSA (15μmol.L⁻¹) em 25 mmol L⁻¹ tampão PIPES, pH 7.0 em condições de escuro (Poços 1 a 4) e por 20 min. sob luz UV de 365 nm em temperatura ambiente (Poços 5 a 8). Poços 1 e 5: Controle BSA ; Poços 2 e 6: reação (BSA + 1 - 320 μmol L⁻¹). Poços 3 e 7: reação (BSA + 1 a 480 μmol L⁻¹). Poços 4 e 8: reação (BSA + 1 a 680 μmol L⁻¹).

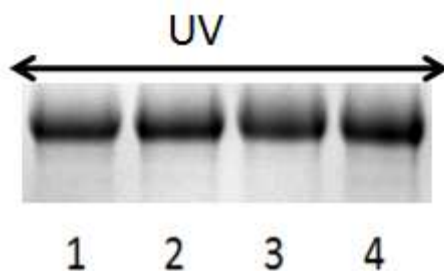


Figura 2: Atividade de **1** sobre TRP ($15\mu\text{mol.L}^{-1}$) em 25 mmol L^{-1} tampão PIPES, pH 7.0 em por 20 min. sob luz UV de 365 nm em temperatura ambiente. Poços 1: Controle TRP ; Poços 2, 3 e 4: reação (TRP + **1** - $320\mu\text{mol L}^{-1}$, $480\mu\text{mol L}^{-1}$ e $680\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente).

5.3 Interação com DNA

Para que ocorra a clivagem, primeiramente deve ocorrer algum tipo de interação entre o complexo e o DNA. Normalmente, essa interação ocorre por três principais modos: intercalação, ligação nos sulcos do DNA ou interações eletrostáticas.

5.3.1 Titulação Espectrofotométrica

O espectro de absorção eletrônica de **1** em DMSO/H₂O 25: 75 (v / v) mostra uma banda muito intensa em 305 nm e duas outras bandas centradas em 526 nm e 411 nm (SOUZA et al., 2010). A primeira banda pode ser atribuída a transferências de carga do tipo $\pi\text{-}\pi^*$ e as outras duas a transferência de carga metal-ligante (TCML $d_{\text{Fe}} \rightarrow p\pi^*$) (SHRIVER; ATKINS, 2003). Como as bases do DNA absorvem na faixa do UV, em torno de 260nm, a titulação foi realizada na faixa de 200 a 400nm.

Após a adição de concentrações crescentes de CT-DNA não foram observadas alterações significativas no espectro de absorção (Figura 23), não permitindo que seja calculada constante de ligação entre DNA e complexo, nem permitindo que se determine que tipo de interação ocorre.

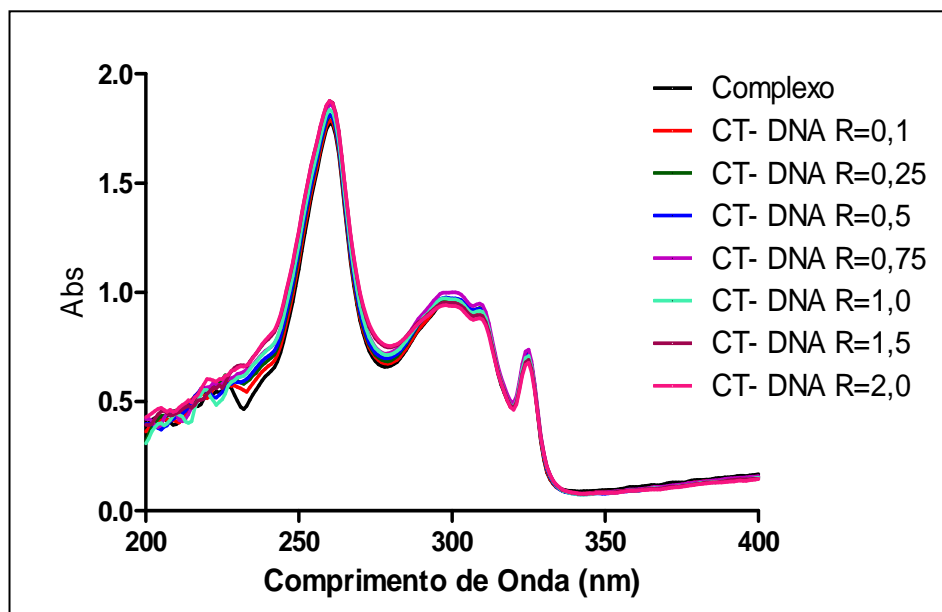


Figura 23. Titulação espectrofotométrica do complexo (20 μM) na ausência e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (0,2 a $10\mu\text{mol.L}^{-1}$) em 25mmol.L^{-1} tampão PIPES pH 7,0.

5.3.2 Desnaturação Térmica de CT-DNA

O ensaio de desnaturação térmica do DNA não permitiu determinar o tipo de interação complexo-DNA, pois após adição do complexo, a T_m do DNA não variou de forma considerável ($< 1^\circ\text{C}$) (Figura 24).

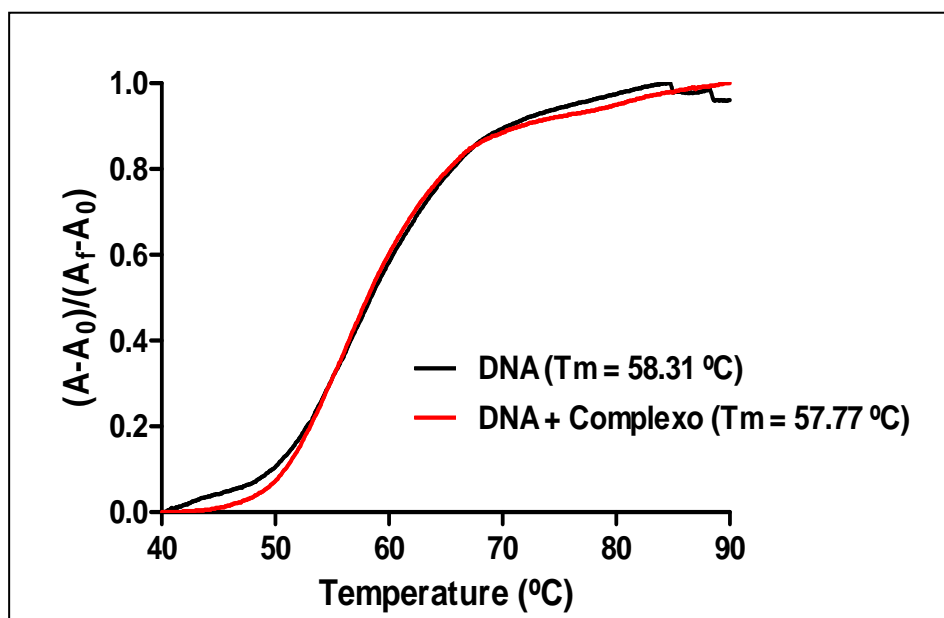


Figura 24. Titulação espectrofotométrica do complexo (20 μM) na ausência e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (0,2 a $10\mu\text{mol.L}^{-1}$) em 25mmol.L^{-1} tampão PIPES pH 7,0.

5.3.3 Dicroísmo Circular

O espectro de DC do CT-DNA livre apresenta uma banda positiva em 275 nm, atribuída ao empilhamento entre as bases nitrogenadas, e uma banda negativa em 245 nm atribuída à helicidade direita da forma B do DNA (PROVENCHER; GLOECKNER, 1981). Desta forma, com a adição de concentrações crescentes do complexo **1** à solução de CT-DNA, nota-se uma diminuição significativa na intensidade de ambas as bandas (Figura 25), o que sugere que a interação com o complexo está provocando uma mudança de conformação de B-DNA para Z-DNA, comportamento típico de complexos ligantes dos sulcos do DNA. Além disso, há o aparecimento de novas bandas e consequente formação de um ponto isodiricóico (FRANKLIN; TREADWAY; BARTON, 1998).

Embora a dupla hélice se mantenha globalmente intacta, uma forte torção negativa pode resultar em modificações locais da estrutura secundária do DNA, originando regiões desemparelhadas, estruturas cruciformes, Z-DNA, e H-DNA. Estas bandas podem indicar que, além da forma superenovelada, o DNA pode estar assumindo outras conformações. Por exemplo, a quebra, química ou enzimática, de uma ligação fosfodiéster em uma das cadeias permite que a cadeia quebrada gire sobre a cadeia intacta, dissipando assim o *stress* imposto (LIMA, 2008).

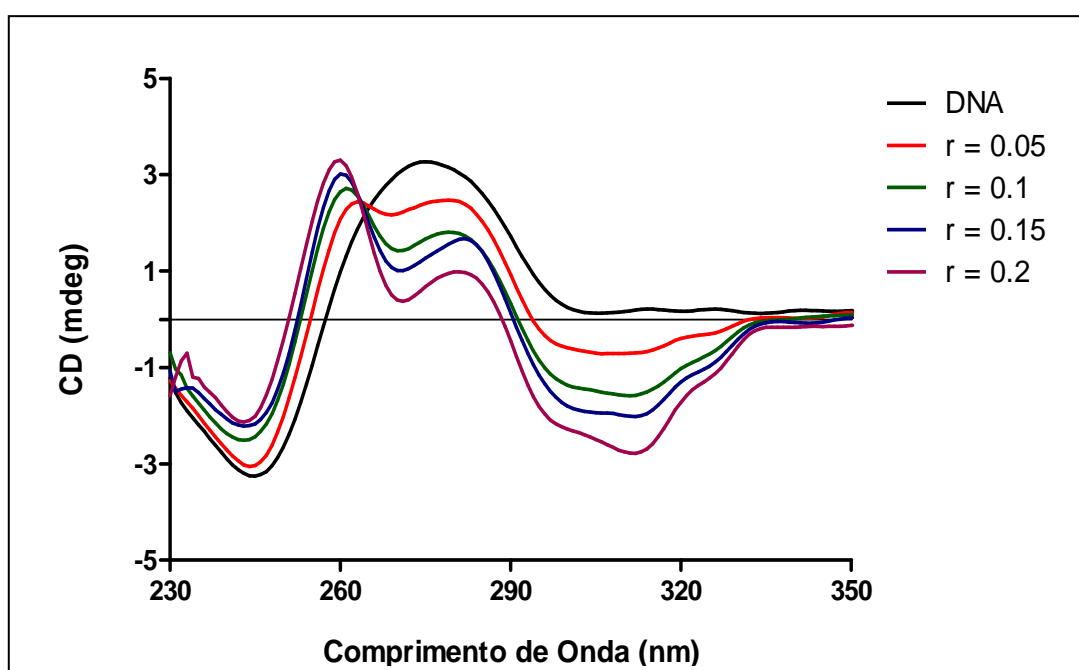


Figura 25. Espectros de Dicroísmo Circular CT-DNA (100 μM) na ausência e na presença de concentrações crescentes de complexo em 25mmol.L⁻¹ tampão PIPES pH 7,0.

6. CONCLUSÕES

O complexo metálico em estudo, o complexo tris- $\{[1,2,5]$ tiadiazolo- $[3,4-f]$ - $[1,10]$ fenantrolina (II) hexafluorofosfato foi capaz de clivar o DNA plasmidial em baixas concentrações e em condições próximas a fisiológica (pH 7,0), a 37 °C, porém, somente se irradiado por luz UV 365nm.

Na investigação do mecanismo, os ensaios com os ligantes dos sulcos do DNA indicam que o complexo tem preferência pelo sulco maior do DNA e ao utilizar os captadores de radicais e atmosfera livre de oxigênio, pode-se perceber que sua atividade independe de espécies reativas de oxigênio, ocorrendo provavelmente por uma oxidação direta das bases do DNA promovida pela forma excitada do complexo.

As análises cinéticas mostraram que, em comparação com a degradação natural do DNA, a reação catalisada pelo complexo é $5,23 \times 10^8$ vezes mais rápida e o tempo de meia vida estimado do DNA superenovelado, em presença do complexo é de 2,2 min. Também se determinou que a atividade do complexo é aproximadamente 6.000 vezes maior quando este é exposto à luz.

Ao se utilizar as proteínas BSA e TRP como substratos, o complexo não tem atividade de clivagem.

Nos ensaios para determinar a interação do complexo com DNA pode-se perceber que o aumento da força iônica presente no meio reacional inibe a atividade do complexo, indicando que interações eletrostáticas entre complexo e DNA são imprescindíveis para que ocorra a fotoclivagem do DNA.

Os ensaios de titulação espectrofotométrica e desnaturação térmica não permitiram determinar um tipo de interação, já que não houve alterações significativas na temperatura de desnaturação (T_m) do DNA, nem no espectro de UV do complexo.

Finalmente, no espectro de DC, após a adição do complexo, houve uma diminuição drástica na intensidade das bandas positiva e negativa do DNA, o que indica uma diminuição no empilhamento das bases do DNA e também em

sua helicidade, além disso, houve o surgimento de novas bandas e aparecimento de um ponto isodicroico que demonstra a alteração na conformação do DNA.

7. PERSPECTIVAS

Podem ser realizados mais estudos com este complexo, com outros tipos de DNA (linear simples fita, polinucleotídeos) para verificar a existência de especificidade por algum desses substratos.

Ensaio em outros comprimentos de onda.

Deve-se verificar se há interação do complexo com proteínas através da técnica de dicroísmo circular.

Realizar ensaios de clivagem de proteína, utilizando outra técnica para corar os géis de poliacrilamida com o intuito de melhor visualizar a formação de bandas características de clivagem.

Pode se iniciar ensaios celulares, como a análise do ciclo celular por citometria de fluxo e determinação de viabilidade e contagem de células em presença do complexo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMITAGE, B. Photocleavage of nucleic acids. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1171-1200, 1998.

ATKINS, P.; PAULA, J. **Físico-Química**. Rio de Janeiro: LTC. 2008.

AUSUBEL, F. M. et al. **Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology**. New York: Wiley. 1999.

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.

BELOUSOFF, M. J. et al. Synthesis, X-Ray Crystal Structures, and Phosphate Ester Cleavage Properties of bis(2-Pyridylmethyl)amine Copper(II) Complexes with Guanidinium Pendant Groups. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 19, p. 8641-8651, 2008.

BRADLEY, P. M. et al. Direct DNA Photocleavage by a New Intercalating Dirhodium(II/II) Complex: Comparison to Rh₂(μ-O₂CCH₃)₄. **Inorganic Chemistry**, v. 43, n. 8, p. 2450-2452, 2004.

CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 78, n. 1, p. 1-6, 2005.

CHAKRAVARTY, A. R. Photocleavage of DNA by copper(II) complexes. **Journal of Chemical Sciences**, v. 118, n. 6, p. 443-453, 2006.

CONLAN, L. H.; DUPUREUR, C. M. Multiple Metal Ions Drive DNA Association by PvuII Endonuclease. **Biochemistry**, v. 41, n. 50, p. 14848-14855, 2002.

CONTE, G.; BORTOLUZZI, A. J.; GALLARDO, H. [1,2,5]Thiadiazolo[3,4-f][1,10]phenanthroline (III) as a Building Block for Organic Materials. **ChemInform**, v. 38, n. 15, p. no-no, 2007.

DAVIA, K. et al. A porphyrin-ruthenium photosensitizer as a potential photodynamic therapy agent. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 11, n. 5, p. 584-586, 2008.

DE OLIVEIRA, M. C. B. et al. Hydrolytic protein cleavage mediated by unusual mononuclear copper(II) complexes: X-ray structures and solution studies. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 921-929, 2005.

DE SOUZA, B. et al. Oxygen-independent photonuclease activity of a new iron(II) complex. **Chemical Communications**, v. 46, n. 19, p. 3375-3377, 2010.

DHAR, S.; 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.

FISCHER, F. L. *Complexos de lantanídeos como agentes para clivagem de DNA plasmidial*. (2006). 64 f. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FRANKLIN, S. J.; TREADWAY, C. R.; BARTON, J. K. A Reinvestigation by Circular Dichroism and NMR: Ruthenium(II) and Rhodium(III) Metallointercalators Do Not Bind Cooperatively to DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 20, p. 5198-5210, 1998.

GOSWAMI, T. K. et al. Photoinduced DNA and protein cleavage activity of ferrocene-appended l-methionine reduced schiff base copper(II) complexes of phenanthroline bases. **Organometallics**, v. 28, n. 7, p. 1992-1994, 2009.

KIM, S. K.; NORDEN, B. Methyl green: A DNA major-groove binding drug. **FEBS Letters**, v. 315, n. 1, p. 61-64, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 259, p. 680-685, 1970.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos. 1995.

LEVY, J. G. Photodynamic therapy. **Trends in Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 14-18, 1995.

LIMA, J. M. *Efeito do grau de superenrolamento de plasmídeos na sua estabilidade estrutural e função biológica*. (2008). - Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.

LIU, C. et al. 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 binuclear transition metal complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 913-922, 2002.

LIU, Y. et al. Ru(II) Complexes of New Tridentate Ligands: Unexpected High Yield of Sensitized $^1\text{O}_2$. **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 375-385, 2008.

MATIOLLO, C. et al. A transthyretin-related protein is functionally expressed in *Herbaspirillum seropedicae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 387, n. 4, p. 712-716, 2009.

MENON, E. L. et al. Phototoxicity against Tumor Cells and Sindbis Virus by an Octahedral Rhodium Bisbipyridyl Complex and Evidence for the Genome as a Target in Viral Photoinactivation. **Inorganic Chemistry**, v. 43, n. 17, p. 5373-5381, 2004.

MILOVIĆ, N. M.; KOSTIĆ, N. M. Palladium(II) complexes, as synthetic peptidases, regioselectively cleave the second peptide bond "upstream" from methionine and histidine side chains. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 17, p. 4759-4769, 2002.

MOHLER, D. L. et al. DNA cleavage by the photolysis of cyclopentadienyl metal complexes: Mechanistic studies and sequence selectivity of strand scission by $\text{CpW}(\text{CO})_3\text{CH}_3$. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 9093-9102, 2005.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, p. 307-310, 1981.

NAVARRO, M. et al. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, n. 4, p. 364-369, 2003.

NEVES, A. et al. Catalytic promiscuity: Catecholase-like activity and hydrolytic DNA cleavage promoted by a mixed-valence Fe^{III}Fe^{II} complex. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 7, p. 1201-1212, 2010.

NEVES, A. et al. A new bis(μ -alkoxo) diiron(III) complex and its implications regarding the number of Fe(III)-phenolate bonds and the redox potential in uteroferrin. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 5, p. 707-712, 2000.

NEVES, A. et al. Hydrolytic DNA cleavage promoted by a dinuclear iron(III) complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 4, n. 8, p. 388-391, 2001.

OLIVEIRA, I. R. W. Z. D. et al. Biomimetic sensor based on a novel copper complex for the determination of hydroquinone in cosmetics. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 122, n. 1, p. 89-94, 2007.

OLIVEIRA, M. C. B. *Nucleases Sintéticas: Caracterização bioquímica e mecanismo de ação sobre DNA*. (2006). (Tese de doutorado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

OLSON, E. J. C. et al. First observation of the key intermediate in the 'light-switch' mechanism of [Ru(phen)₂dppz]²⁺. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 47, p. 11458-11467, 1997.

PICH, C. T. et al. Avaliação da interação com DNA e atividade nucleásica dos compostos metálicos fotoativados Fe(II)dpq, Fe(II)dpq-qx e Fe(II)dppz derivados do composto Fe(II)fenantrolina. In: 55 Congresso Brasileiro de Genética, Ribeirão Preto. 2009.

PROVENCHER, S. W.; GLOECKNER, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. **Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 33-37, 1981.

QIAGEN. **HiSpeed™ Plasmid Purification Handbook**. 2001.

RAAB, O.; . Ueber die Wirkung fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien. **Z Biol** 1900.

ROSENBERG, B. et al. Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents [24]. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385-386, 1969.

ROSSI, L. M. et al. Hydrolytic activity of a dinuclear copper(II,II) complex in phosphate diester and DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 337, p. 366-370, 2002.

ROY, M. et al. Ternary iron(III) complex showing photocleavage of DNA in the photodynamic therapy window. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4368-4370, 2007.

SASMAL, P. K. et al. Photocytotoxic oxovanadium(IV) complexes showing light-induced DNA and protein cleavage activity. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 849-859, 2010.

SHENG, X. et al. DNA binding, cleavage, and cytotoxic activity of the preorganized dinuclear zinc(II) complex of triazacyclononane derivatives. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 490-498, 2008.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**. Porto Alegre: Bookman. 2003.

SIGMAN, D. S.; CHEN, C. B. Chemical nucleases: New reagents in molecular biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 59, p. 207-236, 1990.

SOUZA, B. et al. Oxygen-independent photonuclease activity of a new iron(II) complex. **Chemical Communications**, v. 46, n. 19, p. 3375-3377, 2010.

SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Efficient catalytic cleavage of DNA mediated by metalloaminoglycosides. **Chemical Communications**, n. 16, p. 1737-1738, 1998.

SUN, Y. et al. Dinuclear Cu(II) Hypocrellin B Complexes with Enhanced Photonuclease Activity. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 21, p. 10108-10116, 2010.

TAN, J.; WANG, B.; ZHU, L. DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper(II) complex: Potential mechanism of its antitumor properties. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 727-739, 2009.

VAN DYKE, M. W.; HERTZBERG, R. P.; DERVAN, P. B. Map of distamycin, netropsin, and actinomycin binding sites on heterogeneous DNA: DNA cleavage-inhibition patterns with methidiumpropyl-EDTA-Fe(II). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 18 I, p. 5470-5474, 1982.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.

WHITTAKER, J. et al. The interaction of DNA-targeted platinum phenanthridinium complexes with DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 26, p. 6, 1998.

WONG, Y. L. et al. Mononuclear iron(III) complexes supported by tripodal N3O ligands: Synthesis, structure and reactivity towards DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 363, n. 6, p. 1246-1253, 2010.

ZANIN, I. C. J. et al. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 324-330, August 2005 2005.